

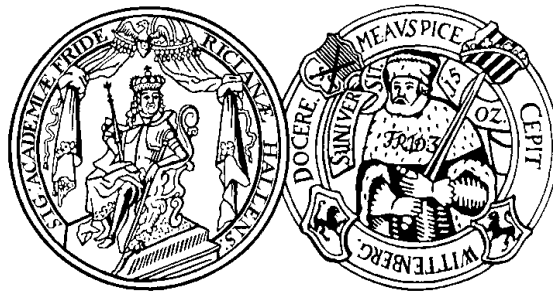
Zur Spezifität des Organelltransports kerncodierter Proteine der Mitochondrien und Plastiden

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

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



von Bianca Baudisch
geboren am 31.08.1981 in Halle (Saale)

Gutachter:

1. Prof. Dr. R.B. Klösgen
2. Prof. Dr. I. Heilmann
3. Prof. Dr. W. Löffelhardt

Tag der Verteidigung: 18.06.2012

SUMMARY

Plant cells harbour two types of endosymbiotic organelles, notably mitochondria and plastids. As a consequence of the endosymbiotic gene transfer, the majority of their proteins is in both cases encoded in the nucleus and post-translationally "re"-imported into the respective target organelle. The corresponding targeting signals (presequences or transit peptides) are in most instances specific for a single of these organelles. However, in recent years more and more proteins were identified which exhibit dual targeting properties, i.e. they can be transported into both mitochondria and plastids.

The focus of this thesis is the identification of new members of such dual targeted proteins as well as the characterisation of targeting properties of several dual targeted proteins.

In order to use organelles with an essentially identical physiological background for *in organello* transport experiments we established a method to isolate intact mitochondria and chloroplasts simultaneously from a single pulping of pea leaves. The functionality of the isolated mitochondria and chloroplasts is demonstrated by *in organello* transport experiments, which yield results identical to those obtained with independently isolated organelles. With slight modifications, the method was successfully applied to organelles from potato and spinach, which implies that it may be generally applicable to organelles from many species.

We have investigated the targeting properties of several dual targeted proteins. A combination of three different experimental strategies demonstrated that cytochrome c_1 of potato, a component of the respiratory electron transport chain, is imported not only into mitochondria, but also into plastids, although a function of this protein in chloroplasts is not likely. The unexpected dual targeting behaviour of cytochrome c_1 shows that functionality of a given protein within an organelle is not necessarily a prerequisite for its import. Furthermore, we have also identified α -MPP2, one of the two isoforms of the substrate binding subunit of mitochondrial processing peptidase of *Arabidopsis thaliana*, as a novel member of the class of nuclear-encoded organelle proteins with dual targeting properties. As demonstrated by *in organello* transport experiments and by *in vivo* localisation studies employing fluorescent chimeric reporter proteins, the N-terminal region of the α -MPP2 precursor comprises transport signals for the import into mitochondria as well as into chloroplasts. Using N-terminal as well as C-terminal truncations of the dual transit peptide of α -MPP2 we have demonstrated an unusual architecture of this transport signal, suggesting a composition of three functionally separated domains.

In order to detect further proteins with dual targeting properties we screened the database of *A. thaliana* with TargetP prediction program and have identified a set of candidate genes encoding such proteins. A selection of these candidate proteins was experimentally analysed by combined *in organello* and *in vivo* studies. Our results show an unexpected high number of dual targeted proteins suggesting that dual targeting is an abundant phenomenon.

ZUSAMMENFASSUNG

Pflanzenzellen beherbergen zwei Organellen mit endosymbiontischen Ursprung: die Mitochondrien und Plastiden. Als Folge des endosymbiontischen Gentransfers ist die Mehrheit mitochondrieller und plastidärer Proteine im Zellkern codiert, die nach der Synthese im Cytosol "zurück" in das entsprechende Zielorganell transportiert wird. Die dafür notwendigen Transportsignale (Präsequenzen oder Transitpeptide) sind in den meisten Fällen spezifisch für eines dieser Organellen. Dennoch wurden in den letzten Jahren mehr und mehr Proteine mit *dual targeting*-Charakter identifiziert, die die Kompetenz besitzen sowohl in die Mitochondrien als auch in die Plastiden transportiert zu werden.

Der Fokus dieser Arbeit liegt auf der Identifizierung neuer Vertreter von Proteinen mit solch einer dualen Lokalisierung sowie auf der Charakterisierung der Transporteigenschaften dieser Proteine.

Um Organellen mit einem identischen physiologischen Hintergrund für *in organello* Transportexperimente zu verwenden, wurde eine Methode zur simultanen Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus einem Homogenat von Erbsenblättern etabliert. Die Funktionalität der isolierten Mitochondrien und Chloroplasten wurde mittels *in organello* Transportexperimente getestet und nachgewiesen, dass kein Unterschied zu einzeln präparierten Organellen besteht. Mit einigen Modifizierungen konnte die Methode erfolgreich auf die Präparation beider Organellen von Spinat- und Kartoffelpflanzen angewendet werden, was zeigt, dass diese Isolierungsmethode generell für Organellen anderer Pflanzenarten geeignet ist.

Die Transporteigenschaften von verschiedenen Proteinen mit dualer Lokalisierung wurden analysiert. Dabei konnten drei unabhängige experimentelle Ansätze zweifelsfrei belegen, dass Cytochrom c_1 aus Kartoffel, eine Komponente der Elektronentransportkette in der oxydativen Phosphorylierung, nicht nur in die Mitochondrien sondern auch in die Plastiden transportiert wird, obwohl eine Funktion dieses Proteins in den Chloroplasten unwahrscheinlich ist. Das unerwartete *dual targeting* des Cytochrom c_1 demonstriert, dass eine Funktion in einem Organell nicht zwangsläufig eine Voraussetzung für den Import ist. Darüber hinaus konnte die α -MPP2, eine der beiden Isoformen der Substrat-bindenden Untereinheit der mitochondriellen Prozessierungspeptidase von *Arabidopsis thaliana*, als weiterer neuer Vertreter der dualen Proteine identifiziert werden. Sowohl *in organello* Experimente als auch *in vivo* Lokalisierungsstudien haben gezeigt, dass der N-terminale Bereich der α -MPP2 das Transportsignal für den Transport in die Mitochondrien und Chloroplasten enthält. Deletionskonstruktionen des dualen Transitpeptids der α -MPP2 belegen die ungewöhnliche Architektur dieses Transitpeptids und legen eine Zusammensetzung von drei funktionell distinkten Domänen nahe.

Um weitere Proteine mit dualer Lokalisierung zu detektieren, wurde die Datenbank von *A. thaliana* mit Hilfe des Vorhersageprogramms TargetP analysiert und eine Vielzahl von potentiell dualen Proteinen identifiziert. Eine Auswahl dieser Kandidatenproteine wurde experimentell mittels *in organello* Analysen untersucht, die durch *in vivo* Lokalisierungsstudien komplementiert wurden. Die Ergebnisse zeigen eine unerwartete Häufigkeit an dualen Proteinen, die darauf hinweisen, dass *dual targeting* ein abundantes Phänomen des Proteintransports präsentiert.

INHALT

SUMMARY	i
ZUSAMMENFASSUNG	ii
INHALT	iii
ABBILDUNGEN & TABELLE	vi

EINLEITUNG

1	Die Pflanzenzelle	2
1.1	Pflanzen-Mitochondrien	2
1.2	Plastiden	3
1.3	Die Endosymbiose: die Entstehung der Mitochondrien und Chloroplasten	4
2	Transitpeptide vermitteln den Proteintransport zu den Organellen	4
3	Intrazelluläre Proteinsortierung.....	6
4	Proteintransport in die endosymbiontischen Organellen	8
4.1	Architektur und Dynamik der Rezeptoren der äußeren Hüllmembranen.....	8
4.2	Die Sortierung des Passagiers innerhalb der Organellen	9
4.3	Die Freisetzung des reifen Proteins.....	10
5	Proteine mit zwei Bestimmungsorten in der Zelle	12
5.1	Mechanismen des <i>dual targeting</i>	12
5.2	Duale Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten.....	13
6	Zielstellung.....	14
PUBLIKATIONEN UND MANUSKRIPTE DIESER ARBEIT		15
WEITERE PUBLIKATIONEN		16

KAPITEL 1

1	Simultane Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Pflanzengewebe.....	18
1.1	Zusammenfassung.....	18
1.2	Artikel.....	19

KAPITEL 2

2	<i>Dual targeting</i> des mitochondrialen Proteins Cytochrom <i>c</i> ₁	26
2.1	Zusammenfassung.....	26
2.2	Artikel.....	27
	SUPPLEMENTARY DATA	37

KAPITEL 3

3	Die duale Lokalisierung einer Prozessierungspeptidase wird durch ein Transitpeptid mit ungewöhnlicher Architektur vermittelt	39
3.1	Zusammenfassung.....	39
3.2	Artikel.....	41
	SUPPLEMENTARY DATA	51
3.3	Ergänzende Experimente und Ergebnisse.....	53
3.3.1	Transportweg dualer Proteine in die Organellen.....	53
3.3.2	Einfluss des Translationssystems auf die Organellespezifität dualer und monospezifischer Proteine.....	57
3.3.3	Transport dualer Proteine in die Organellen in Abhängigkeit von der Zeit	60

KAPITEL 4

4	Die Ausnahme bestätigt die Regel? - <i>Dual targeting</i> kerncodierter Proteine der endosymbiontischen Organellen	63
4.1	Zusammenfassung.....	63
4.2	Manuskript	66
	ABSTRACT	66
	INTRODUCTION	67
	RESULTS.....	67
	DISCUSSION	72
	METHODS	74
	FIGURES AND FIGURE LEGENDS	76
	TABLES	81
	REFERENCES	82

DISKUSSION

1	Mitochondrien und Chloroplasten können simultan in hoher Reinheit präpariert werden.....	86
2	Die mitochondriellen Proteine Cytochrom c_1 und α -MPP2 werden auch in die Chloroplasten transportiert	87
3	Der Transport dualer Proteine in die Organellen erfolgt über den generellen Importweg	88
4	<i>Dual targeting</i> ist ein hoch abundantes Phänomen.....	90
5	Welche Faktoren beeinflussen die intrazelluläre Sortierung?	91
5.1	Sequenzmerkmale und Architektur des dualen Transitpeptids.....	91
5.2	Regulation des Proteintransports durch Modifizierung des Transitpeptids.....	93
5.3	Cytosolische Faktoren sowie der reife Proteinanteil können die Verteilung der Proteine regulieren ..	95
6	Die Rolle des <i>dual targeting</i> in der Evolution des Proteintransports.....	96
REFERENZEN.....		100

ANHANG

GLOSSAR & ABKÜRZUNGEN	109
DANKSAGUNG	111
ERKLÄRUNG.....	112
LEBENS LAUF	113

ABBILDUNGEN

Abb. 1:	Mitochondrien und Plastiden in Blattgewebe von <i>Arabidopsis thaliana</i>	3
Abb. 2:	Schema der Transitpeptide kerncodierter mitochondrieller und plastidärer Proteine.	5
Abb. 3:	Schema des Transports kerncodierter Proteine in die Mitochondrien und Chloroplasten.	7
Abb. 4:	Lokalisierung der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) in verschiedenen Organismen. .	11
Abb. 5:	Mechanismen des <i>dual targeting</i>	13
Abb. 6:	OEC33 inhibiert spezifisch den Proteintransport in die Chloroplasten.	54
Abb. 7:	Cyt1 reduziert sowohl den mitochondrialen als auch den plastidären Import.	56
Abb. 8:	Die Synthese in WGE kann zu importinkompetenten Translationsprodukten führen.	57
Abb. 9:	WGE enthält Transport-inhibierende Komponenten.....	59
Abb. 10:	Der Import in beide Organellen erfolgt mit ähnlicher Kinetik.	60
Abb. 11:	Die Untereinheiten der MPP sind in den Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert.	88
Abb. 12:	Duale Transitpeptide haben keine streng konservierten Aminosäuresequenzen.	92
Abb. 13:	Das Transitpeptid der α -MPP aus Pflanzen ist signifikant länger als das der α -MPP aus Hefe.	93
Abb. 14:	Mitochondrielle Proteine aus Maus können in Chloroplasten importiert werden.....	98

TABELLE

Tab. 1:	Übersicht der <i>in silico</i> ermittelten Proteine, die mittels <i>in vivo</i> und <i>in organello</i> Transportexperimente analysiert wurden.	64
---------	--	----

1 Die Pflanzenzelle

In der Pflanzenzelle sind verschiedene Reaktionsräume durch Membranen abgegrenzt. Zu diesen zählen unter anderem Plastiden, Mitochondrien, der Zellkern, die Vakuole, das Endoplasmatisches Retikulum, Peroxisomen und der Golgi-Apparat. Da diese Membranen für einige Stoffe unüberwindbare Barrieren darstellen, können Stoffwechselprozesse separiert und somit unter optimierten und definierten Bedingungen ablaufen. Diese Reaktionsräume ermöglichen dabei nicht nur die Trennung von verschiedenen Stoffwechselwegen sondern auch die Speicherung von Stoffen. Die einzelnen Zellkompartimente sind durch das Cytoplasma funktionell miteinander verbunden und können über spezielle Transporter bzw. Proteintransportkomplexe Metabolite, Ionen sowie Proteine untereinander austauschen und so die Membran(en) überwinden.

1.1 Pflanzen-Mitochondrien

Mitochondrien sind in allen eukaryotischen Zelltypen anzutreffen und besitzen, abhängig vom Gewebetyp bzw. Entwicklungszustand, eine vielseitige Morphologie. Durchschnittlich weisen diese Organellen eine Länge von 2-8 μm sowie einen Durchmesser von 0,2-1 μm auf. Charakteristisch für Mitochondrien ist deren bemerkenswerte hohe Mobilität und Dynamik, die mittels mikroskopischer Verfahren dokumentiert werden kann (Logan, 2006). Da Mitochondrien farblos sind, werden diese Organellen meist mit speziellen Fluoreszenzfarbstoffen (z.B. chimäre Fluoreszenzproteinkonstruktionen) angefärbt und sind somit im Fluoreszenz-Mikroskop zu beobachten (Abb. 1). Dieser Organelltyp ist von zwei unabhängigen Membransystemen umgeben, wodurch das Mitochondrium in zwei Subkompartimente gegliedert ist: den nicht-plasmatischen Intermembranraum zwischen äußerer und innerer Membran sowie den plasmatischen Innenraum, die Matrix. Die innere Membran ist zur Oberflächenvergrößerung stark gefaltet und bildet sogenannte Cristae (von lateinisch *crista*, "Kamm") aus, die als komplexe lamellare Strukturen vorliegen können (Frey and Mannella, 2000). Die innere Membran ist der Ort der oxydativen Phosphorylierung, die mit der Synthese des energiereichen Adenosintriphosphats (ATP) einhergeht (Saraste, 1999). Für die ATP-Synthese sind Reduktionsäquivalente notwendig, die durch verschiedene Stoffwechselwege in den Mitochondrien (bspw. Zitronensäurezyklus, Fettsäureoxidation, Teile des Harnstoffzyklus) bereitgestellt werden. Durch viele zusätzliche Stoffwechselwege (z. B. Photorespiration), die bei nicht-pflanzlichen Organismen fehlen, beherbergen Pflanzen-Mitochondrien schätzungsweise bis zu 3000 Proteine (Millar et al., 2005), wovon ca. 400 Proteine bereits experimentell nachgewiesen wurden in *Arabidopsis thaliana* (Heazlewood et al., 2004). Im Gegensatz dazu besitzen Hefe-Mitochondrien ca. 750 experimentell ermittelte Proteine (Sickmann et al., 2003).

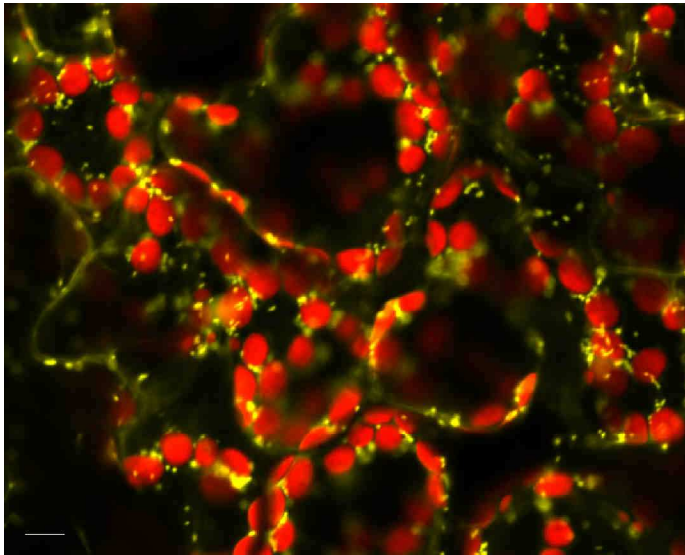


Abbildung 1: Mitochondrien und Plastiden in Blattgewebe von *Arabidopsis thaliana*.

Fluoreszenzmikroskopische Analyse mittels CLSM von Blättern transgener *Arabidopsis*-Pflanzen, die durch den Gentransfer mittels *Agrobacterium tumefaciens* mit der codierenden Sequenz für das gelb fluoreszierende Protein (EYFP), fusioniert an einem mitochondriellen Transitpeptid, transformiert wurden. Durch dieses Transitpeptid wird das EYFP in die Mitochondrien dirigiert und folglich sind die Mitochondrien durch EYFP markiert (*gelber Kanal*). Die Chloroplasten sind durch die Autofluoreszenz des Chlorophylls detektierbar (*roter Kanal*). Der Größenbalken entspricht 10 μm .

1.2 Plastiden

Plastiden sind Zellorganellen, die hauptsächlich in phototrophen Organismen vorkommen und sich in höheren Pflanzen, je nach Gewebetyp und Entwicklungszustand, hinsichtlich Funktion und Morphologie deutlich voneinander unterscheiden (López-Juez, 2007). Der bekannteste Vertreter der Plastiden ist der Chloroplast, der vorrangig im Mesophyllgewebe grüner Blätter anzutreffen ist. Die Chloroplasten höherer Pflanzen sind elliptisch geformt und weisen eine Länge von 10 μm sowie einen Durchmesser von 5-8 μm auf. Im Gegensatz zu den Mitochondrien sind die Chloroplasten durch das eingelagerte Chlorophyll relativ einfach mittels mikroskopischer Analysen zu visualisieren, das bei Anregung mit energiereichem Licht als rote Fluoreszenz wahrnehmbar ist (Abb. 1). Die Chloroplasten sind ähnlich wie die Mitochondrien von zwei voneinander unabhängigen Membransystemen umgeben, der äußeren und der inneren Hüllmembran. Zusätzlich beinhalten die Chloroplasten ein internes, abgeschlossenes Membransystem, die Thylakoide, das als Grana-Stapel oder Stroma-Thylakoide angeordnet ist. Somit sind im Chloroplasten drei distinkte Subkompartimente zu finden: der Intermembranraum zwischen beiden Hüllmembranen, der stromale Raum und das Thylakoidlumen. An der Thylakoidmembran findet der photosynthetische Elektronentransport statt, der zur Synthese von energiereichem ATP sowie Reduktionsäquivalenten beiträgt. Darüber hinaus sind die Chloroplasten der zentrale Ort der Kohlenstoff-, Schwefel- und Stickstoff-Fixierung sowie der Lipidsynthese. Zur Erfüllung dieser vielseitigen Aufgaben beherbergen die Chloroplasten eine Vielzahl an Proteinen. Die Vorhersagen für die Größe des plastidären Proteoms variieren von 1900 bis 3600 Proteine (Abdallah et al., 2000; Baginsky and Gruissem,

2004). Tatsächlich konnten für *A. thaliana* bisher 1200 Proteine experimentell nachgewiesen werden (van Wijk and Baginsky, 2011).

1.3 Die Endosymbiose: die Entstehung der Mitochondrien und Chloroplasten

Mitochondrien und Plastiden sind wahrscheinlich durch die Integration freilebender Eubakterien in eine Wirtszelle entstanden, ein Ereignis, das als Endosymbiose bezeichnet wird (Margulis, 1971). Ob diese Wirtszelle bereits ein Eukaryot war, ist ungeklärt (Dyall et al., 2004). Es wird angenommen, dass die Aufnahme eines aeroben α -Proteobakteriums zu der Entwicklung von Mitochondrien führte (Gray, 1999), wohingegen Chloroplasten durch die Integration eines phototrophen Cyanobakteriums in eine heterotroph lebende, eukaryotische Zelle mit bereits etablierten Mitochondrien entstanden sind (Douglas, 1998; McFadden, 1999). Sowohl die Mitochondrien als auch die Plastiden haben aufgrund ihres endosymbiontischen Ursprungs als einzige Organellen ein eigenes Genom, weshalb sie einen Teil der organelleigenen Proteine selbst synthetisieren können. Allerdings ist aufgrund des massiven Gentransfers vom Symbionten zum Zellkern der Großteil der mitochondriellen und plastidären Proteine im Kerngenom codiert, weshalb diese Proteine nach der Synthese im Cytosol in die Organellen zurücktransportiert werden (Martin and Herrmann, 1998; Bock and Timmis, 2008).

2 Transitpeptide vermitteln den Proteintransport zu den Organellen

Der Großteil der mitochondriellen und plastidären Proteine sind kerncodiert (95 %) und werden nach der Synthese an den Ribosomen im Cytosol zum Bestimmungsort transportiert. Das Ziel dieser Proteine ist in einem spezifischen Transportsignal innerhalb des Polypeptides festgelegt, das als eine Art Adresse fungiert (Schatz and Doberstein, 1996). Somit enthalten diese Signale die Informationen für den Transport des Proteins zum Zielorganell, für die Erkennung durch Rezeptoren an der Organelloberfläche, für die Translokation über die Hüllmembran(en) und für die abschließende Sortierung innerhalb des Organells (Abb. 2). In den meisten Fällen stromaler bzw. Matrix-lokalisierter Proteine ist dieses Transportsignal N-terminal lokalisiert (die Gesamtheit aus N-terminalem Transportsignal und reifem Protein entspricht dem Vorläuferprotein) und wird nach dem Transport in das Organell abgespalten wodurch das reife Protein freigesetzt wird. Im Gegensatz dazu können Transportsignale auch intern im reifen Proteinanteil enthalten sein, die nach der Translokation nicht abgespalten werden, z. B. bei Proteinen der mitochondriellen bzw. plastidären Hüllmembran (zusammengefasst in Schleiff and Becker, 2011).

Diese **N-terminalen Transportsignale der Mitochondrien und Plastiden** werden traditionell als Präsequenzen (mitochondrielle Transportsignale) bzw. als Transitpeptide (plastidäre Transportsignale) bezeichnet, jedoch werden im Folgenden beide Arten von Signalen unter dem Begriff Transitpeptid zusammengefasst. Diese Transitpeptide gewährleisten eine effiziente und spezifische Sortierung der kerncodierten Vorläuferproteine wodurch die importierten Proteine (z. B. Proteine der Photosynthese oder

Atmungskette) die Funktionalität des jeweiligen Organells sicherstellen können. Analysen zeigen, dass sowohl mitochondrielle, als auch plastidäre Transitpeptide sehr heterogen sind. So variieren u. a. die Längen mitochondrieller Transitpeptide sehr stark, z. B. wurden in *Arabidopsis* Transitpeptid-Längen von 19-109 Aminosäuren, in von Reis 18-117 Reste und in Hefe von 6-122 Aminosäuren identifiziert (Huang et al., 2009). Plastidäre Transitpeptide umfassen Längen von 13-146 Resten (Glaser and Soll, 2004). Dennoch sind durchschnittlich die Transitpeptide der Mitochondrien (42 Aminosäuren) kürzer als die der Plastiden (58 Aminosäuren) (Glaser and Soll, 2004). Abgesehen von vielen Gemeinsamkeiten in der Aminosäurezusammensetzung mitochondrieller und plastidärer Transitpeptide zeigen Mitochondrien-spezifische Signale einen erhöhten Anteil an Arginin (von Heijne, 1986; Pujol et al., 2007), der mutmaßlich einen Teil der Erkennungsstelle für die Prozessierungspeptidase (siehe Einleitung, Abschnitt 4.3) darstellt (Huang et al., 2009). Plastidäre Transitpeptide weisen, ebenso wie die mitochondriellen Transitpeptide vermehrt hydroxylierte Aminosäuren auf (von Heijne, 1989), die bei plastidären Vorläuferproteinen durch eine cytosolische Kinase phosphoryliert werden können (Martin et al., 2006). Jedoch sind keine konservierten Mitochondrien- oder Plastiden-spezifischen Sequenzmotive bisher gefunden worden (Bruce, 2001; Schleiff and Becker, 2011). Die variablen Längen beider Transitpeptide sowie die wenig konservierten Sequenzmotive sind ein Indiz dafür, dass von den Rezeptoren an der Organelloberfläche offensichtlich eher strukturelle bzw. physikochemische Eigenschaften der Transitpeptidsequenzen erkannt werden anstelle spezieller Sequenzmotive. So haben mitochondrielle Transitpeptide die Neigung amphipathische α -Helices auszubilden. Solch eine amphipathische α -Helix enthält auf der einen Seite der Helix hydrophobe Aminosäuren und auf der anderen Seite hydrophile Aminosäuren und ist als essentielles Merkmal für den Transport in Mitochondrien beschrieben (von Heijne, 1986). Für plastidäre Transitpeptide konnte bisher keine Sekundärstruktur identifiziert werden (von Heijne and Nishikawa, 1991). Stattdessen weisen diese Transitpeptide einen charakteristischen dreiteiligen Aufbau auf: eine ungeladene N-terminale Region, gefolgt von einem mittleren hydrophilen Bereich, sowie einer C-terminalen Region mit dem Potential amphiphile β -Strukturen zu bilden (von Heijne et al., 1989).

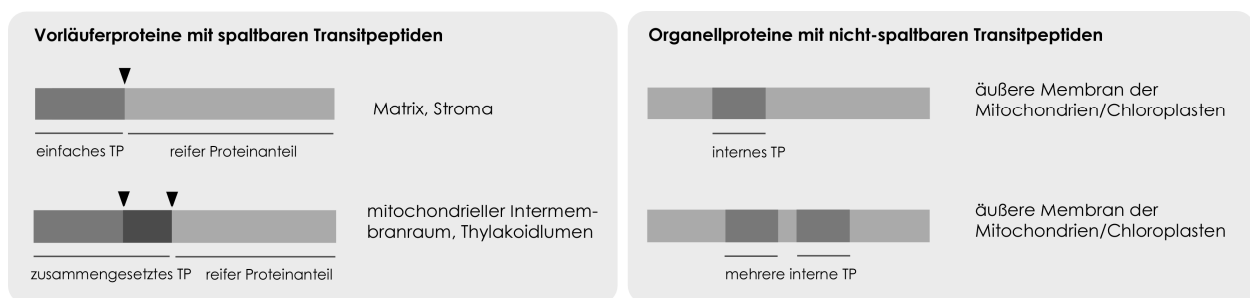


Abbildung 2: Schema der Transitpeptide kerncodierter mitochondrialer und plastidärer Proteine.

Vorläuferproteine bestehend aus *einfachen Transitpeptid (TP)* und reifen Proteinanteil, sind in der Regel in der *Matrix* bzw. im *Stroma* lokalisiert. *Zusammengesetzte Transitpeptide* sind bei Proteinen des *mitochondriellen Intermembranraum* bzw. des *Thylakoidlumen* zu finden. Das Transitpeptid wird in beiden Fällen nach dem Transport abgespalten (der *Pfeil* markiert die Spaltstelle). Proteine mit *internem Transitpeptid* sind oft in der *äußeren Membran der Organellen* lokalisiert. Das Transportsignal ist meist ein hydrophober Bereich, der nicht abgespalten wird.

Fast allen Proteinen des Thylakoidlumen ist gemeinsam, dass diese mit einem **zusammengesetzten Transitpeptid** synthetisiert werden (Abb. 2). Dieses Transitpeptid enthält zusätzlich zu der Information für den Transport in das Stroma, die weitere Information für den anschließenden Transfer über die Thylakoidmembran. Im Gegensatz zu den wenig konservierten Sequenzmotiven der mitochondriellen und plastidären Transitpeptide weisen thylakoidäre Proteine, die über den Tat (*twin-arginine translocation*)-Weg, einer von bisher vier identifizierten Transportwegen an der Thylakoidmembran (Gutensohn et al., 2006), ein streng konserviertes Zwillingsarginin in der thylakoiddirigierenden Domäne auf (Chaddock et al., 1995). Ebenso ist das Tripeptid bestehend aus Serin, Lysin und Leucin des C-terminalen Transportsignals der Peroxisomen streng konserviert, das neben weiteren Aminosäuren essentiell für den peroxisomalen Transport ist (Girzalsky et al., 2010).

3 Intrazelluläre Proteinsortierung

Der intrazelluläre Transport des Proteins vom Synthesort zum Zielorganell (Abb. 3) kann auf zwei Wegen erfolgen: co-translational (i), d. h. die Proteintranslokation ist eng gekoppelt mit der Translation, z. B. der SRP (*signal recognition particle*)-abhängige Transport ins Endoplasmatische Retikulum (Keenan et al., 2001), oder post-translational (ii). Letzteres bedeutet, die Proteinsynthese ist mechanistisch nicht mit der Translokation verbunden sondern cytosolische Faktoren führen das Vorläuferprotein zum Organell. Die Mitochondrien importieren 99 % der Proteine post-translational, (Wickner and Schekman, 2005), ebenso werden plastidäre Proteine generell post-translational transportiert (Schleiff and Becker, 2011).

Cytosolische Faltungshelfer wie Hsp70 (*heat-shock protein*, 70 kDa) interagieren mit post-translational synthetisierten Proteinen und halten das Vorläuferprotein in einem ungefalteten, importkompetenten Zustand (Jackson-Constan et al., 2001; Zhang and Glaser, 2002; Young et al., 2003). Das Hsp70 kann allein oder in Kombination mit anderen cytosolischen Faktoren fungieren, bspw. mit einem weiteren Hsp, dem Hsp90 (*heat-shock protein*, 90 kDa) (Qbadou et al., 2006), oder mit 14-3-3 Proteinen (May and Soll, 2000). Die 14-3-3 Proteine sind ubiquitär in eukaryotischen Zellen anzutreffen und binden bevorzugt an phosphorylierten Bereichen einiger plastidärer Transitpeptide, die zusammen mit dem Hsp70 den sogenannten *guidance*-Komplex darstellen, der die Importeffizienz *in vitro* erhöhen soll (Waegemann and Soll, 1996; May and Soll, 2000). Da für mitochondrielle Proteine ein derartiger Komplex bisher nicht nachgewiesen werden konnte, wird diesem Komplex eine essentielle Rolle zur Unterscheidung von Mitochondrien- und Plastidenproteinen zugeschrieben (May and Soll, 2000; Martin et al., 2006). Allerdings konnte nachgewiesen werden, dass der Verlust der 14-3-3 Bindestelle keinen Effekt auf die Transporteffizienz oder Organellspezifität plastidärer Proteine *in vivo* zeigt, womit die Signifikanz der Phosphorylierung für die Spezifität des Plastidentransportes fraglich bleibt (Nakrieko et al., 2004). Zwar konnte eine Phosphorylierung für mitochondrielle Proteine bislang nicht beobachtet werden, allerdings wurde der cytosolische Faltungshelfer MSF (*mitochondrial import stimulation factor*) identifiziert (Hachiya et al., 1994), der auch zur der Familie der 14-3-3 -Proteine zählt. Der MSF übt im Komplex mit dem Vorläuferprotein vermutlich eine dirigierende Rolle zu den Mitochondrien aus und interagiert dort mit den

Rezeptoren des mitochondrialen Transportapparates (Hachiya et al., 1995). Die Erkennung von Hsp70 und Hsp90 durch die peripheren Rezeptoren an der Zielmembran erfolgt über das strukturelle Motiv TPR (*tetratricopeptide repeat*) (Young et al., 2004; Qbadou et al., 2006). Neben diesen cytosolischen Faltungshelfern sind eine Reihe weiterer Faktoren beschrieben, die den cytosolischen Transport zum Mitochondrium und/oder dem Chloroplasten vermitteln können (zusammengefasst in Schleiff and Becker, 2011).

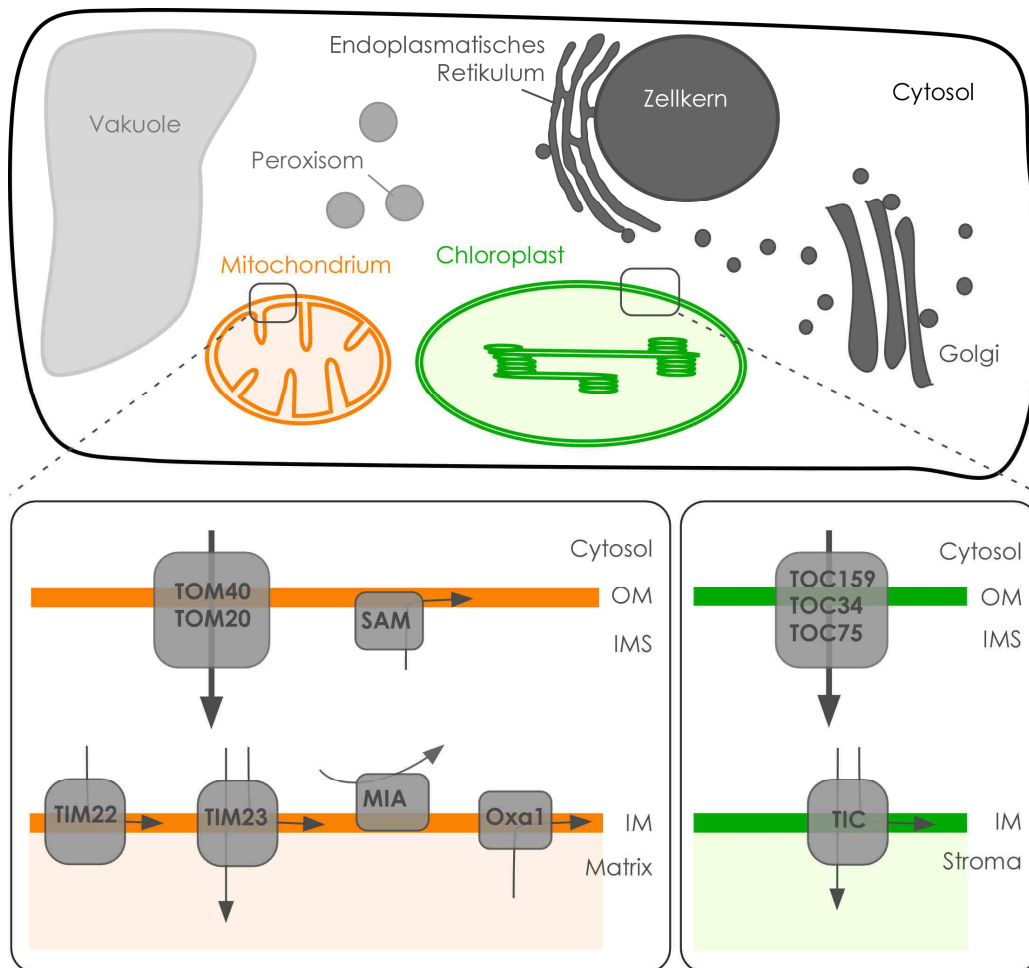


Abbildung 3: Schema des Transports kerncodierter Proteine in die Mitochondrien und Chloroplasten.

Die Pflanzenzelle enthält verschiedene Kompartimente, z. B. *Peroxisomen*, die *Vakuole*, den *Golgi-Apparat*, das *Endoplasmatische Retikulum* und die endosymbiontischen Organellen *Mitochondrien* und *Chloroplasten*. Der Großteil der mitochondrialen und plastidären Proteine ist im *Zellkern* codiert und wird nach der Synthese im *Cytosol* zu dem jeweiligen Bestimmungsort transportiert. Der Transfer über die äußere Membran (*outer membrane, OM*) beider Organellen erfolgt durch den *TOM-* (*translocase of the outer mitochondrial membrane*) bzw. *TOC-* (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts*) Apparat. Im Intermembranraum (*inter membrane space, IMS*) der Chloroplasten werden die Proteine mit Hilfe des *TIC-* (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*) Komplexes in die innere Membran (*inner membrane, IM*) oder in das *Stroma* transportiert. In den Mitochondrien sind mehrere Transportkomplexe an der innerorganellären Sortierung beteiligt. Der Großteil der Matrix-Proteine wird über den *TIM23-* (*translocase of the inner mitochondrial membrane*) Komplex in die Matrix bzw. innere Mitochondrienmembran transportiert. Mitochondrielle Carrier-Proteine werden über *TIM22* in die innere Membran inseriert. Der Protein-Transfer in die äußere Membran erfolgt durch den *SAM-* (*sorting and assembly machinery*) Apparat. Der Komplex *MIA* (*mitochondrial inter membrane space assembly machinery*) vermittelt die Sortierung der Proteine des IMS, wogegen über den *Oxa1*-Weg mitochondrielle Proteine aus der Matrix in die innere Membran inseriert werden können.

4 Proteintransport in die endosymbiontischen Organellen

In Mitochondrien und Plastiden ermöglichen verschiedene proteinogene Translokationskomplexe den Transport des Passagiers über die jeweilige(n) Hüllmembran(en) (Neupert and Herrman, 2007; Jarvis, 2008) (Abb. 3). Die Translokase des TOM- (*translocase of the outer mitochondrial membrane*) bzw. des TOC- (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts*) Komplexes katalysieren den Transfer des Vorläuferproteins aus dem Cytosol über die äußere Membran der Mitochondrien bzw. der Chloroplasten. Die Rezeptoren der Translokasen beider Organelletypen erkennen Vorläuferproteine mit unterschiedlicher Topologie, d. h. sowohl lösliche Proteine des Intermembranraums bzw. der Matrix oder des Stromas als auch Membranproteine mit einem oder mehreren Transmembranbereich(en). Nachdem das Transportsubstrat die äußere Membran passiert hat, wird dieses mit Hilfe von weiteren spezifischen Transportmaschinerien (TIM, *translocase of the inner mitochondrial membrane*; TIC, *translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*) innerhalb des Organells sortiert und schließlich von organellspezifischen Peptidasen prozessiert.

4.1 Architektur und Dynamik der Rezeptoren der äußeren Hüllmembranen

Die Transportkomplexe der äußeren Membran von Mitochondrien und Chloroplasten bestehen aus Rezeptorproteinen, die auf der cytosolischen Seite agieren (in Pflanzen-Mitochondrien: TOM20; in Chloroplasten: TOC34, TOC159) sowie aus einem Kanal-bildenden Protein (in Pflanzen-Mitochondrien: TOM40; in Chloroplasten: TOC75) (Balsera et al., 2009).

Obwohl einige pflanzliche **TOM-Rezeptoren** strukturelle Unterschiede zu den entsprechenden Gegenstücken aus Hefe oder *Neurospora* zeigen, scheint die Gesamtarchitektur und der Mechanismus der TOM-Komplexe in Pflanzen, Mensch, Hefe und *Neurospora* konserviert zu sein (Schmitz and Lonsdale, 1989). Auffällig in Pflanzen ist die Abwesenheit der Hefe-Rezeptoren TOM70 und TOM20, die für die Erkennung des Transitpeptids mitochondrieller Vorläufer essentiell sind (Lithgow et al., 1995; Lister et al., 2005). Stattdessen werden pflanzliche mitochondrielle Vorläufer von einer TOM-Untereinheit erkannt, die zu dem TOM20-Rezeptor von Säugern oder Pilzen nur geringe Sequenzidentität (variiert von 20-50 %) aufweist aber dennoch das TPR-Motiv (siehe Einleitung, Abschnitt 3) zur Substraterkennung auf der cytosolischen Seite trägt (Heins and Schmitz, 1996; Werhahn et al., 2001). Diese Untereinheit wird in Pflanzen als TOM20 bezeichnet und ist, im Gegensatz zu verschiedenen Rezeptortypen aus Hefe und *Neurospora*, in multiplen Formen anzutreffen, die höchstwahrscheinlich aufgrund einer stark variablen Glycinreichen Region, unterschiedliche Substrate erkennen können (Werhahn et al., 2001). Zum Beispiel wird TOM20 in *A. thaliana* von vier paralogen Genen codiert (Werhahn et al., 2001). Ebenfalls wichtig für die Erkennung des Vorläuferproteins in Hefe und *Neurospora* ist TOM22, der in Pflanzen verkürzt ohne cytosolische Domäne vorliegt und vermutlich die Unterscheidung zwischen mitochondriellen und plastidären Proteinen gewährleistet (Macasev et al., 2000, 2004). Die cytosolische Domäne von TOM22 in Hefe besitzt eine Reihe von sauren Aminosäuren, die essentiell für die Bindung des Vorläufers nach der *acid chain*-Hypothese sind (Schatz, 1997). Nach diesem Modell erfolgt die

Erkennung der mitochondriellen Substrate im Cytosol über saure Bereiche der TOM-Rezeptoren, die eine Kaskade an Bindestellen für das positiv geladene Transitpeptid repräsentieren, wobei die Bindungsaffinität vom ersten Rezeptor hin zum letzten Rezeptor sequentiell ansteigt. Die Vorläuferproteine können jedoch auch über elektrostatische und hydrophobe Interaktionen vom Rezeptor TOM20 gebunden werden (Abe et al., 2000) weshalb das Modell zur *binding chain*-Hypothese erweitert wurde und für Pflanzen-Mitochondrien plausibler erscheint aufgrund der Abwesenheit saurer Rezeptor-Bereiche (Rehling et al., 2001). Darüber hinaus wird ein 64 kDa-Protein der äußeren mitochondriellen Membran, das Sequenzhomologien zu TOC64 (siehe folgenden Abschnitt) zeigt, als weiterer Rezeptortyp in pflanzlichen Mitochondrien postuliert (Chew et al., 2004), für das aber bisher keine Funktion nachgewiesen werden konnte.

Für die Rezeptoren des **TOC Komplexes** existieren unterschiedliche Isoformen, die vermutlich auf verschiedene Substratspezifitäten zurückzuführen sind, z. B. zur Regulation des Importes von hoch abundanten Photosyntheseproteinen oder nicht-photosynthetischen *housekeeping* Proteinen (Jackson-Constan and Keegstra, 2001). Für die Erkennung des Vorläuferproteins im Cytosol durch die Haupt-Rezeptoren TOC34 und TOC159 an der Chloroplastenmembran sind zwei verschiedene Modelle beschrieben (Jarvis, 2008). Im ersten Modell (*targeting*-Modell) erkennt TOC159 als lösliche, cytosolische Form das Transitpeptid und reicht den Passagier über die Interaktion mit TOC34 an den Translokationskanal TOC75 weiter (Hiltbrunner et al., 2001). Dagegen wird im zweiten Modell (Motor-Modell) TOC34 die Rolle des primären Rezeptors zugeschrieben (Schleiff et al., 2002). In beiden Modellen vermittelt TOC159 den Transfer des Substrates zum Translokationskanal, wobei die Dynamik des TOC-Apparates durch die GTPase-Aktivität beider Rezeptoren reguliert wird. Ein dritter Rezeptor (TOC64) zählt nicht zum TOC-Kernkomplex sondern ist eine dynamisch assoziierte Untereinheit (Sohrt and Soll, 2000). Es gibt Hinweise für die cytosolische Interaktion von Hsp90-gebundenem Vorläuferprotein mit TOC64 über das TPR-Motiv (siehe Einleitung, Abschnitt 3) und die anschließende Vermittlung an TOC34 (Qbadou et al., 2006). Allerdings konnte die Notwendigkeit von TOC64 für den plastidären Proteintransport weder in Moosen noch in höheren Pflanzen nachgewiesen werden (Rosenbaum Hofmann et al., 2005; Aronsson et al., 2007).

4.2 Die Sortierung des Passagiers innerhalb der Organellen

Die TOM- bzw. TOC-Komplexe kommunizieren mit dem Passagier aber auch mit den Translokationsfaktoren auf beiden Seiten der äußeren Membran, sodass eine Sortierung in die verschiedenen Subkompartimente durch TIM bzw. TIC ermöglicht wird. Sowohl in Mitochondrien, als auch in Chloroplasten weisen die Transportapparate Bindestellen im Intermembranraum auf. So können z. B. TOC64 und TOC159 auch im Intermembranraum mit dem Vorläuferprotein interagieren (Qbadou et al., 2007).

Der **TIM-Komplex** ist für die Translokation von Matrix-lokalisierten Proteinen über die innere mitochondrielle Hüllmembran zuständig und besteht aus mehreren Proteinuntereinheiten. Namensgebend für diesen Komplex ist die Untereinheit TIM23, die zum einen mit dem Transitpeptid des Vorläuferproteins

interagiert und zum anderen essentiell für die Bildung der Translokationspore ist (Truscott et al., 2001). Durch die hochaffine Erkennung des Transitpeptides durchläuft TIM23 eine vom Membranpotential abhängige Konformationsänderung wodurch das Protein durch die innere Membran transportiert werden kann. In der Matrix wird das Vorläuferprotein von mitochondrialem Hsp70 (mt-Hsp70) empfangen, das außerdem durch die dynamische Bindung des TIM-Komplexes den Import unter ATP-Verbrauch motorisiert (Kang et al., 1990; Zhang et al., 1999). Integrale mitochondrielle Proteine der inneren Membran, die ein internes Transportsignal aufweisen (siehe Einleitung, Abschnitt 2) werden über einen anderen Weg, den sogenannte Carrier-Transportweg, zu ihren Zielort geführt (Rehling et al., 2001). Im Intermembranraum wird das Protein von kleinen, löslichen TIM-Proteinen gebunden und zu der membranständigen TIM22-Untereinheit geleitet, die die Insertion in die innere Membran vermittelt. Für beide TIM-Komplexe wurden in Pflanzen bereits einige Untereinheiten identifiziert (Murcia et al., 2003, 2007). Ebenso konnten weitere Komponenten von anderen wichtigen Sortiermaschinen wie bspw. SAM (*sorting and assembly machinery*), MIA (*mitochondrial intermembrane space assembly machinery*) oder dem Oxa1-Weg in pflanzlichen Mitochondrien nachgewiesen werden (Sakamoto et al., 2000; Figueroa-Martinez et al., 2008).

Der **Transport der plastidären Proteine über die innere Membran** ist noch nicht vollständig entschlüsselt und es existieren widersprüchliche Veröffentlichungen bezüglich der Bedeutung der einzelnen TIC-Komponenten (Soll and Schleiff, 2004; Kessler and Schnell, 2006; Smith, 2006). Die Translokationspore wird vermutlich von den Untereinheiten TIC20, TIC21 oder TIC110 gebildet (Chen et al., 2002; Heins et al., 2002; Teng et al., 2006), allerdings konnte das bisher für keines der Proteine zweifelsfrei nachgewiesen werden. Zudem sind TIC40 als Co-Chaperon beschrieben (Stahl et al., 1999) sowie TIC22, das die Passage der Vorläuferproteine von TOC zu TIC vermittelt (Kouranov and Schnell, 1997) und zur Bildung des TOC-TIC-Superkomplexes beitragen soll (Kouranov et al., 1998). Einigen Untereinheiten (TIC32, TIC55, TIC62) wird eine mögliche Regulation des Proteinimportes in Abhängigkeit des endogenen Redoxstatus zugeschrieben (Bédard and Jarvis, 2005), da diese Komponenten ein für die Redoxkontrolle relevantes strukturelles Motiv besitzen (Caliebe et al., 1997; Küchler et al., 2002; Hörmann et al., 2004). Chloroplastidäre Proteine, die in der inneren Membran lokalisiert sind, können wie in den Mitochondrien durch den Stop Transfer-Mechanismus an ihr suborganelläres Ziel gelangen. Dabei arretieren interne hydrophobe Signale im Transmembranbereich des Proteins den Transfer in der inneren Membran, woraufhin das Protein lateral entlassen wird (Brink et al., 1995; Firelej-Kwoka et al., 2008). Andere plastidäre Proteine der inneren Hüllmembran laufen über den *conservative sorting*-Weg, wobei die Proteine nach der Freisetzung im Stroma über einen unbekanntenen Mechanismus in die innere Membran integriert werden (Tripp et al., 2007; Vojta et al., 2007).

4.3 Die Freisetzung des reifen Proteins

Nach dem Transport des Vorläuferproteins in das Organell wird das Transitpeptid von organellspezifischen Peptidasen abgespalten. In den Mitochondrien wird die Prozessierung in den meisten Fällen von der

mitochondriellen Prozessierungspeptidase (MPP) realisiert (Glaser et al., 1996). Dieses Enzym liegt als Heterodimer vor, bestehend aus einer α -Untereinheit zur Bindung des Vorläuferproteins (Yang et al., 1991) und einer β -Untereinheit, die den Prozessierungsschritt katalysiert (Kitada et al., 1995). In Pflanzen ist die MPP ein integraler Bestandteil des bc_1 -Komplexes (Abb. 4) (Braun et al., 1992^a; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995), der Teil der oxydativen Phosphorylierung an der inneren Mitochondrienmembran ist. Dagegen liegt die MPP in Hefe- und Säugerzellen löslich in der Matrix vor (Böhni et al., 1983; Yang et al., 1988; Ou et al., 1989). Eine intermediäre Situation ist in *Neurospora crassa* zu finden: hier existieren ein löslicher funktionaler MPP-Komplex und zusätzlich eine teilweise aktive Form der MPP, die in Komplex III der Atmungskette integriert ist (Hawlitsek et al., 1988; Schulte et al., 1989). Einige mitochondrielle Proteine werden in zwei sequentiellen Schritten unter der Beteiligung der mitochondrialen Intermediat-Peptidase (MIP) zum reifen Protein prozessiert (Kalousek et al., 1992). Die Prozessierung von Proteinen des Intermembranraumes erfolgt ebenfalls in zwei Schritten, in die die Peptidase der inneren Membran IMP (*inner membrane peptidase*) involviert ist (Schneider et al., 1991).

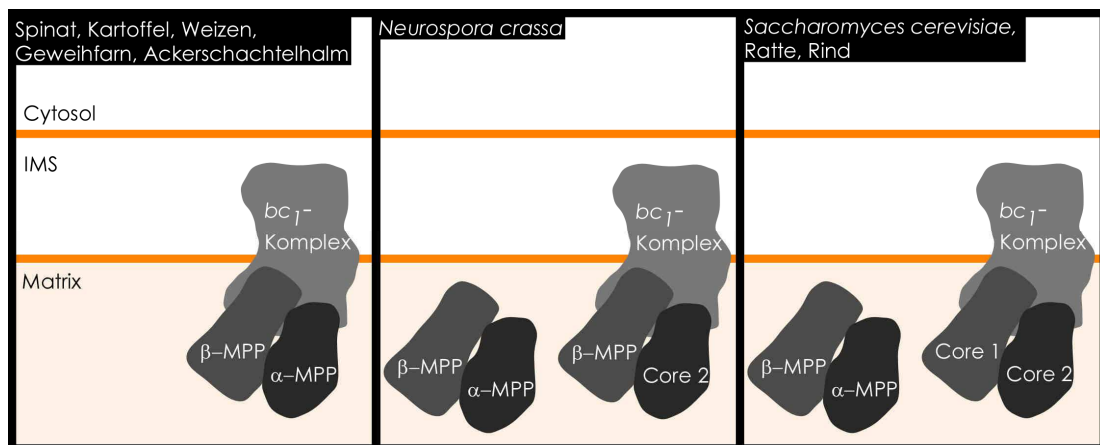


Abbildung 4: Lokalisierung der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (MPP) in verschiedenen Organismen.

Die MPP ist eine funktionelle Einheit bestehend aus der α -MPP und der β -MPP. In höheren und niederen Pflanzen sind beide Untereinheiten in den bc_1 -Komplex integriert an der inneren Mitochondrienmembran. In *N. crassa* sind 70 % der β -MPP anstelle des Core 1 Bestandteil des bc_1 -Komplexes. Der verbleibende Anteil liegt zusammen mit der α -MPP als vollständig aktive Form löslich in der Matrix vor. In Hefe- sowie in Säugerzellen sind beide Untereinheiten ausschließlich in der Matrix lokalisiert. In den bc_1 -Komplex sind stattdessen zwei hochmolekulare Untereinheiten integriert, bezeichnet als Core 1 und Core 2. Das Schema wurde modifiziert nach Glaser and Dessi, 1999.

In den Plastiden werden die Proteine nach der Ankunft im Stroma von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) zum reifen Protein prozessiert (Richter and Lamppa, 1998). Im Gegensatz zu der MPP liegt die SPP als monomeres Enzym im Stroma vor (Richter et al., 2005). Die SPP hat eine Zink-Bindedomäne, die charakteristisch für die M16 Metalloendopeptidasen-Familie ist (Rawlings and Barrett, 1993), zu der auch die MPP zählt. Beide Peptidasen können ein breites Spektrum an Substraten erkennen und prozessieren, obwohl die Substrate beachtlich in der Sequenz variieren können (siehe Einleitung, Abschnitt 2) und die Spaltstellen für beide Enzyme wenig konserviert sind. Transitpeptide, die das Protein vom Stroma zu den Thylakoiden dirigieren, werden durch die Thylakoid-Prozessierungspeptidase (TPP) abgespalten (Kirwin et al., 1987).

5 Proteine mit zwei Bestimmungsorten in der Zelle

Im Gegensatz zum monospezifischen Proteintransport kann ein Protein an mehrere Bestimmungsorte innerhalb der Zelle transportiert werden, ein Phänomen das als *dual targeting* bezeichnet wird. Duale Proteine können an zwei Orten in der Zelle lokalisiert sein und dort identische oder distinkte Funktionen ausüben (Peeters and Small, 2001; Silva-Filho, 2003; Karniely and Pines, 2005; Krause and Krupinska, 2009). Die Beispiele für duale Proteine beschränken sich nicht nur auf Proteine mit zwei Lokalisierungen innerhalb einer Zelle, sondern duale Proteine können darüber hinaus auch in Abhängigkeit des Gewebes an zwei verschiedenen Orten vorliegen (Matthews et al., 2005; Carrie et al., 2009^a; Matthews et al., 2010). Außerdem existieren Proteine, die innerhalb eines Organells eine alternative Topologie aufweisen, wodurch diese auch an zwei Orten lokalisiert sind und somit ebenfalls zu den dualen Proteinen zählen (Herlan et al., 2004; Meineke et al., 2008).

5.1 Mechanismen des *dual targeting*

Eine duale Lokalisierung von Proteinen kann durch verschiedene Mechanismen entstehen, die bezogen auf die Anzahl der Translationsprodukte in zwei Klassen eingeteilt werden (Peeters and Small, 2001; Karniely and Pines, 2005): die Synthese von einem (i) oder mehreren (ii) Translationsprodukten (Abb. 5). Im letzteren Fall werden Translationsprodukte mit jeweils verschiedenen Transitpeptiden synthetisiert, die den Passagier zu unterschiedlichen Zellkompartimenten dirigieren. Die Synthese von distinkten Translationsprodukten kann entweder durch mehrere Gene (i) (Martelli et al., 2007), alternative Transkriptionsinitiation (ii) (Obara et al., 2002), alternatives Spleißen (iii) (Clausmeyer et al., 1999) oder alternativen Translationsstart (iv) (Slusher et al., 1991; Christensen et al., 2005; Wamboldt et al., 2009) verursacht werden. Im Fall, dass nur eines der Translationsprodukte ein Transitpeptid trägt, verweilt das Produkt ohne Transitpeptid im Cytosol und das Polypeptid mit Transportsignal wird zum Zielorganell dirigiert (Natsoulis et al., 1986; Chatton et al., 1988). Duale Proteine können auch mehrere Transportsignale enthalten, die innerhalb des Polypeptides unterschiedlich lokalisiert sind (Carrie et al., 2008). In diesem Fall bestimmt die Affinität des jeweiligen Transitpeptids zu seinem Ziel die Verteilung des Proteins.

Die andere Möglichkeit zum *dual targeting* ist die Synthese eines Translationsproduktes mit einem dualen bzw. gemischten Transitpeptid, das von den Transportapparaten mehrerer Organellen erkannt wird (Berglund et al., 2009^a). Die Regulation der Verteilung des dualen Proteins zwischen den Zielkompartimenten kann durch eine Veränderung der Affinität des Transitpeptids zum Zielrezeptor durch Proteinmodifizierungen des Transportsubstrates, z.B. Myristoylierung (Colombo et al., 2005), oder durch die Bindung an ein weiteres Protein (Delille and Schrader, 2008) erfolgen.

Ein einzigartiges Beispiel für *dual targeting* durch retrograden Transport ist die Fumarase aus Hefe (Sass et al., 2003). Dieses Protein wird zuerst zu den Mitochondrien transportiert, dort beginnt die Translokation gefolgt von der Prozessierung durch die MPP. Anschließend bewegt sich eine Subpopulation dieses Proteintyps revers in

das Cytosol. Die treibende Kraft für die Verteilung zwischen Mitochondrien und Cytosol ist dabei der Faltungszustand der Fumarase.

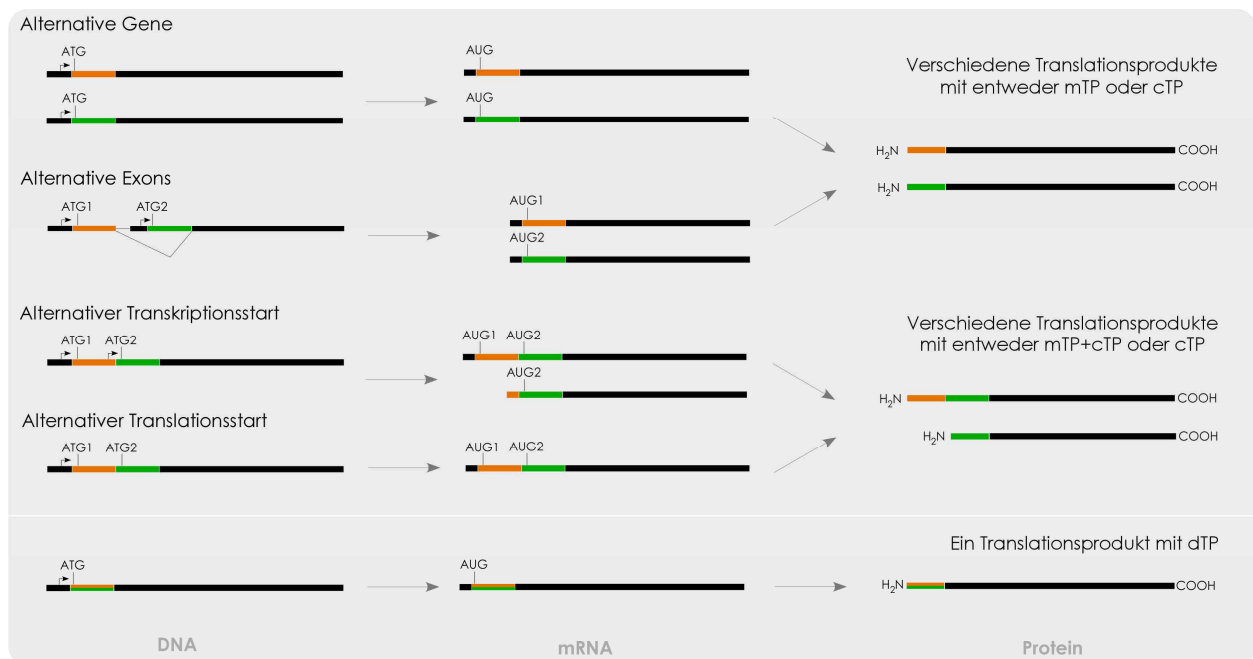


Abbildung 5: Mechanismen des *dual targeting*.

Im dargestellten Beispiel entstehen mehrere Translationsprodukte mit einem mitochondrialen Transitpeptid (*mTP*, orange) oder einem chloroplastidären Transitpeptid (*cTP*, grün) durch zwei verschiedene Gene oder durch alternatives Exon-Spleißen. Außerdem können ausgehend von einem Gen durch alternative Transkriptionsinitiation (*Pfeil*) oder alternativen Translationsstart (*ATG1/2* bzw. *AUG1/2*) mehrere Translationsprodukte generiert werden, wobei eine Subpopulation mTP und cTP hintereinander enthält und die anderen Polypeptide nur das cTP tragen. Durch eine Kombination dieser verschiedenen Mechanismen können weitere, nicht dargestellte Variationen an Translationsprodukten entstehen. Im Gegensatz dazu kann ausgehend von einem Gen, ein Translationsprodukt mit einem dualen bzw. gemischtem Transitpeptid (*dTP*, orange-grün) generiert werden, dass das Protein zu den Mitochondrien und zu den Chloroplasten dirigiert.

Das Schema wurde modifiziert nach Peeters and Small, 2001.

5.2 Duale Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten

Viele bisher identifizierte duale Proteine mit gemischtem Transitpeptid sind in den Mitochondrien sowie in den Chloroplasten lokalisiert und vorrangig für die DNA- und Proteinsynthese in beiden Organellen relevant (Carrie et al., 2009^b). Duale Proteine der Mitochondrien und Chloroplasten sind besonders interessant, da beide Organellen ähnliche Transportmaschinerien an den Hüllmembranen besitzen und die Rezeptoren beider Organellen zwischen monospezifischen und dualen Transitpeptiden unterscheiden müssen, obwohl monospezifische Transitpeptide mitochondrialer und chloroplastidärer Proteine wenig konservierte Sequenzmotive aufweisen und zudem relativ ähnlich zueinander sind (siehe Einleitung, Abschnitt 2). Ein Vergleich dualer Proteine mit monospezifischen Proteinen zur Identifizierung spezifischer dualer Sequenzmerkmale zeigte zwar ein häufigeres Auftreten der Aminosäuren Alanin und Serin in dualen Transitpeptiden, jedoch weisen diese Transitpeptide grundsätzlich Attribute von sowohl mitochondrialen als

auch plastidären Transitpeptiden auf (Peeters and Small, 2001; Pujol et al., 2007; Berglund et al., 2009^b). Deshalb wird vermutet, dass der Transfer in die Organellen über den Transportweg der monospezifischen Proteine (siehe Einleitung, Abschnitt 4) erfolgt (Peeters and Small, 2001). Deletionsanalysen von definierten Teilen des Transitpeptides dualer Proteine lieferten erste Hinweise, dass duale Signale über distinkte Domänen für sowohl den mitochondrialen als auch den plastidäre Transport verfügen können (Hedtke et al., 2000; Rudhe et al., 2002^a; Bhushan et al., 2003). Eine derartige Architektur des dualen Transitpeptides scheint jedoch kein generelles Merkmal für duale Proteine zu sein, da bei anderen Vertretern mit dualer Lokalisierung diese Domänenstruktur nicht nachgewiesen wurde (Berglund et al., 2009^b). Obwohl seit der Identifizierung der Glutathionreduktase, das erste beschriebene duale Protein der Mitochondrien und Chloroplasten (Creissen et al., 1995), die Liste dieser Proteine ständig erweitert wird (zusammengefasst in Carrie et al., 2009^b; Morgante et al., 2009), bleiben viele Fragen zum *dual targeting* offen z. B. hinsichtlich der Unterscheidung von monospezifischen und dualen Transitpeptiden, des Transportwegs dieser Proteine in die Organellen und der Anzahl dualer Proteine im pflanzlichen Proteom.

6 Zielstellung

Zu Beginn dieser Arbeit war die Anzahl veröffentlichter dualer Proteine der Mitochondrien und Plastiden vergleichsweise gering und die Entdeckung dieser Proteine erfolgte zufällig. Die Identifizierung weiterer dualer Proteine war notwendig um Eigenschaften dieser Proteine untersuchen zu können und außerdem Abschätzungen hinsichtlich der Häufigkeit und Bedeutung dieses Phänomens in Pflanzen zu ermöglichen. Aus diesem Grund wurde in der Arbeitsgruppe im Vorfeld ein systematischer Ansatz zur Identifizierung potentieller dualer Kandidaten aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* entwickelt. Eine Auswahl dieser Kandidaten sollte mittels *in organello* Transportexperimenten hinsichtlich der Organellespezifität untersucht werden. Komplementierend sollten die Transporteigenschaften dieser dualen Kandidaten im zellulären Kontext nach biolistischer Transformation von Blattmaterial mit geeigneten chimären Fluoreszenzreporterproteinen aufgedeckt werden. Am Beispiel von ausgewählten dualen Proteinen sollten unter anderem die Architektur eines dualen Transitpeptids sowie der Transportweg in die Organellen analysiert werden. Abschließend sollte der Frage nachgegangen werden, in welchem Umfang *dual targeting* im Proteom von *A. thaliana* zu erwarten ist, und welche Bedeutung es für die Evolution der intrazellulären Sortierung von Proteinen aufweisen könnte.

PUBLIKATIONEN UND MANUSKRIPTE DIESER ARBEIT

Rödiger, A., **Baudisch, B.**, and Klösgen, R.B. (2010): Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *J Plant Physiol* **167**: 620-624

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung folgender Experimente,
mikroskopische Analyse der präparierten Organellen,
in organello Proteintransportexperimente in isolierte Organellen aus Spinat,
Adaption des Präparationsprotokolls auf Kartoffelpflanzen sowie *Arabidopsis*.

Bearbeitung des Manuskripts.

Rödiger, A., **Baudisch, B.**, Langner, U., and Klösgen, R.B. (2011): Dual targeting of a mitochondrial protein: the case study of cytochrome *c₁*. *Mol Plant* **4** (4): 679-687

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung folgender Experimente,
in organello Proteintransportexperimente der Kontrollproteine,
Etablierung des *in vivo*-Versuchsansatzes zur subzellulären Lokalisierung nach
transienter Transformation von Pflanzengewebe,
biolistische Transformation von Erbsenblättern mit Cytochrom *c₁*-Fusionen,
mikroskopische Analyse und Dokumentation aller Cytochrom *c₁*-Fusionen.

Bearbeitung des Manuskripts und der Abbildungen.

Baudisch, B. and Klösgen, R.B. (2011): Dual targeting of a processing peptidase is mediated by a transport signal of unusual architecture. *Mol Plant* doi: 10.1093/mp/ssr092

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung aller Experimente.

Anfertigung des Manuskripts.

Baudisch, B.*, Langner, U.*, Garz, I., and Klösgen, R.B.: The exception proves the role? Dual targeting of nuclear encoded proteins into endosymbiotic organelles. (*in Bearbeitung*)

(*) Both authors contributed equally to this work.

Eigenanteil: Planung, Durchführung und Auswertung folgender Experimente,
Klonierung der chimären Reporterkonstruktionen von EF-Tu, GrpE, NADH, SHBP,
in organello Proteintransportexperimente von EF-Tu, GrpE, GgpS, ATPS, NADH,
mikroskopische Analyse und Dokumentation aller Reporterkonstruktionen.

Anfertigung des Manuskripts.

WEITERE PUBLIKATIONEN

Schattat, M., Barton, K., **Baudisch, B.**, Klösgen, R.B., and Mathur, J. (2011): Plastid stromule branching coincides with contiguous endoplasmic reticulum dynamics. *Plant Physiol.* **155**(4):1667-1677

Cho, K., Han, Y., Woo, J.C., **Baudisch, B.**, Klösgen, R.B., Oh, S., Han, J., Han, O. (2011): Cellular localization of dual positional specific maize lipoxygenase-1 in transgenic rice and calcium-mediated membrane association. *Plant Sci.* **181**(3):242-248

KAPITEL 1

1 Simultane Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten aus Pflanzengewebe

1.1 Zusammenfassung

In organello Proteinimportexperimente sind eine Möglichkeit um die Transporteigenschaften von kerncodierten Organellproteinen zu analysieren. Grundlage dafür ist die Isolierung von Organellen, in diesem Fall die Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten. Die bisher etablierten Protokolle ermöglichen die Isolierung von entweder Mitochondrien oder Chloroplasten aus verschiedenen Ausgangsgeweben und unterscheiden sich zusätzlich hinsichtlich der Homogenisationsbedingungen sowie der Pufferzusammensetzungen (Braun et al., 1992^b; Brock et al., 1993; Millar et al., 2007), wodurch eine simultane Isolierung beider Organellen erschwert wird. Da die Zellphysiologie unter anderem stark abhängig von den Pflanzenanzuchtsbedingungen ist, kann folglich auch der Proteintransport durch verschiedene exogene Parameter beeinflusst werden. So variiert bspw. mit höherem Alter der Pflanzen die Importeffizienz diverser Proteine (Dahlin and Cline, 1991; Murcha et al., 1999). Um derartige Einflüsse von Wachstums- oder Präparationsbedingungen auf das Transportverhalten und daraus resultierende Fehlinterpretationen beim Vergleich beider Organellen zu vermeiden, wurde ein Protokoll zur simultanen Isolierung von Mitochondrien und Chloroplasten aus einem Homogenat entwickelt.

Für die Präparation beider Organellen wurden im ersten Schritt die Blätter von Erbsen-Pflanzen zerkleinert, homogenisiert und filtriert. Aus diesem Filtrat wurden über differentielle Zentrifugation sequentiell zuerst die Chloroplasten und dann die Mitochondrien angereichert. Beide Organelltypen wurden anschließend durch einen individuellen Percoll-Stufengradienten von Kontaminationen, wie fremden Zellkompartimenten oder von nicht-intakten Strukturen, getrennt. Abschließend erfolgte nach weiteren Waschschritten die Einstellung einer definierten Proteinkonzentration der Mitochondrien sowie Chlorophyllkonzentration der Chloroplasten. Das Verhältnis dieser Organellkonzentrationen wurde dem durch Western Analysen ermitteltem Verhältnis von Mitochondrien und Chloroplasten zueinander im Blattgewebe angepasst und für die später folgenden *in organello* Transportexperimente angewendet.

Zur Überprüfung der Reinheit sowie der Organellidentität wurden beide Fraktionen mikroskopisch analysiert. Im Hellfeld-Verfahren sind Chloroplasten als rundliche, teilweise ovale Organellen mit einer spezifischen grünlichen Färbung eindeutig zu unterscheiden von den vergleichsweise kleineren und farblosen Mitochondrien (siehe Einleitung, Abschnitt 1.1 und 1.2). Beide Fraktionen zeigen jeweils homogene Zellstrukturen und keine Verunreinigungen mit dem jeweils anderen Organelltyp. Im Fluoreszenz-Verfahren, das die Detektion der Chloroplasten durch Anregung des Chlorophylls ermöglicht, enthalten die Mitochondrienfraktionen keine intakten Chloroplasten aber eine minimale Kontamination mit Thylakoidvesikeln. Neben diesen mikroskopischen Kontrollen wurde die Präsenz bzw. die Abwesenheit von organellären Markerproteinen in den präparierten Fraktionen mittels Western Analysen überprüft. Die verwendeten Plastiden-Antikörper richten

sich gegen Proteine der äußeren Hüllmembran, des Stromas sowie der Thylakoidvesikel und weisen in den präparierten Chloroplasten alle drei Subkompartimente nach. In den Mitochondrienfraktionen sind minimale Mengen an Thylakoidvesikeln jedoch keine intakten Chloroplasten nachweisbar. Der reziproke Ansatz zeigt ein ähnliches Ergebnis: die Mitochondrien-Antikörpern detektieren in der Mitochondrienfraktion erwartungsgemäß die Proteine der inneren Hüllmembran sowie der Matrix. In der Chloroplastenfraktion sind minimale Mengen ausschließlich von Proteinen der inneren Mitochondrienmembran nachweisbar, die auf eine geringe Kontamination mit mitochondriellen Membranvesikeln aber keine intakten Mitochondrien hinweisen. Sowohl die mikroskopischen als auch die Western Analysen belegen, dass die entwickelte simultane Präparationsmethode eine Isolierung beider Organellen in hoher Reinheit ermöglicht. Die marginale Kontamination an Membranvesikeln des anderen Organelltyps können für die angestrebten *in organello* Proteintransportexperimente vernachlässigt werden.

Um die Transportkompetenz der isolierten Organellen zu überprüfen, wurden *in organello* Proteintransportexperimente durchgeführt. Dazu wurden die Organellen mit einem radioaktiv markierten Vorläuferprotein inkubiert, das in einem eukaryotischen, zellfreien System *in vitro* transkribiert und translatiert wurde. Als radioaktiv markierte Substrate wurden das mitochondrielle Rieske aus Kartoffel (mtRieske) sowie ein thylakoidäres Protein aus Spinat, die 33 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparats am Photosystem II (OEC33) eingesetzt. Die *in organello* Transportexperimente belegen eindeutig, dass beide präparierte Organelltypen in der Lage sind das zugehörige Substrat zu erkennen, zu importieren und zum reifen Protein zu prozessieren. Darüber hinaus ist nachweisbar, dass beide Organellen spezifisch die Substrate erkennen, wohingegen ein organellfremdes Protein nicht importiert wird: so wird das mitochondrielle Rieske nicht in die Chloroplasten und OEC33 nicht in die Mitochondrien transportiert.

Das Protokoll ist nicht auf Erbsenpflanzen beschränkt sondern konnte auch erfolgreich für die Isolierung beider Organelltypen aus Pflanzengewebe von Kartoffel angewendet und durch wenige Modifizierungen für die Organellpräparation aus Spinatpflanzen adaptiert werden. Beide Pflanzenarten werden ebenfalls standardmäßig für die Gewinnung von Organellen verwendet. Höchstwahrscheinlich ist diese Methode generell zur Präparation von Mitochondrien und Chloroplasten geeignet und kann in dieser Form für ein breites Spektrum an Pflanzenarten angewendet und vermutlich auch auf die Isolierung anderer Organelltypen ausgedehnt werden.

1.2 Artikel



Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue

Anja Rödiger, Bianca Baudisch, Ralf Bernd Klösgen*

Institut für Biologie – Pflanzenphysiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, 06120 Halle/Saale, Germany

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 August 2009

Received in revised form

11 November 2009

Accepted 12 November 2009

Keywords:

Chloroplast

Mitochondria

Organelle isolation

Protein transport

ABSTRACT

Isolated organelles are suitable tools for the investigation of organelle function. However, if the properties of different organelles are to be compared, analysis is generally impeded by the fact that the organelles are isolated independently from each other from different specimens, different tissues or even different plants, i.e. the organelles have been exposed to different conditions during growth and development. Here we describe a method to isolate intact chloroplasts and mitochondria simultaneously from a single pulping of pea leaves, which results in organelles with an essentially identical physiological background. The functionality of the isolated chloroplasts and mitochondria is demonstrated by protein transport experiments, which yield results identical to those obtained with independently isolated organelles. With slight modifications, the method is also successfully applied to organelles from potato and spinach, which implies that it may be generally applicable to organelles from many different species.

© 2009 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Isolated organelles are often utilized to evaluate organelle function. The elucidation of numerous physiological parameters, such as enzymatic properties or biosynthetic pathways, relies on the analysis of organelles that are purified in intact form from different kinds of plant species and tissues. Therefore, detailed protocols for the isolation of numerous types of plant organelles have been developed.

In most instances, however, these protocols have been designed for a single type of organelle only. Consequently, the other organelles present in the tissue analyzed are mostly destroyed or discarded during isolation. This is not generally a problem if only the function of a single type of organelle is of interest, but if different organelles from the same tissue will be examined in parallel, such destruction is obviously disadvantageous. In this case, the organelles must be prepared independently from each other in separate isolation processes, which is not only time-consuming, but yields organelles with, at best, similar but not identical “physiological backgrounds”. This is particularly detrimental if the properties of different organelles within the same tissue are to be compared.

In our group, we analyze the mechanism and specificity of protein transport into the two endosymbiotic plant organelles, chloroplasts and mitochondria. Since we are interested in characterizing the organelle specificity of precursor proteins

including those with potentially dual targeting specificity, it was our goal to develop a protocol for the isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of leaf tissue, in order to exclude any influence of growth conditions on targeting specificity. While isolation of chloroplasts is a common procedure in plant physiology and biochemistry (e.g. Brock et al., 1993), only a few protocols for the isolation of intact plant mitochondria are found in the literature. Consequently, the mitochondria are often purified from non-green tissues such as potato tubers or dark grown cell cultures (Braun et al., 1992; Klein et al., 1998), in order to prevent contamination with chloroplasts. Furthermore, the protocols available for the two organelles differ significantly from each other with respect to buffer composition, homogenization conditions or centrifugation forces, which complicates their simultaneous isolation.

Material and methods

Plant material

Pea seedlings (*Pisum sativum* var. Feltham First) were grown on soil for 7–10 d under constant temperature (18–22 °C) and light regime (8/16 h light/dark cycles). Potato (*Solanum tuberosum* var. Desiree) was grown under the same conditions and harvested 2–3 weeks after germination. Spinach (*Spinacia oleracea* var. Lina) was grown in hydroponic culture under the same light and temperature regime and harvested 2–3 months after sowing.

* Corresponding author. Tel.: +49 345 55 26 200; fax: +49 345 55 27 285.
E-mail address: klösgen@pflanzenphys.uni-halle.de (R. Bernd Klösgen).

Solutions

Extraction buffer (EB) consisted of 0.45 M sucrose, 15 mM 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS), 1.5 mM ethylene glycol tetraacetic acid (EGTA), adjusted to pH 7.4 with KOH and supplemented immediately before use with 0.6% polyvinylpyrrolidone (PVP), 0.2% bovine serum albumine (BSA), 10 mM dithiothreitol (DTT), and 0.2 mM phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF). Washing buffer (WB) consisted of 0.3 M sucrose, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, adjusted to pH 7.2 with KOH and supplemented immediately before use with 0.2 M PMSF. Resuspension buffer (RB) consisted of 0.4 M mannitol, 10 mM MOPS, 1 mM EGTA, adjusted to pH 7.2 with KOH and supplemented immediately before use with 0.2 M PMSF. Sorbitol resuspension medium (SRM) consisted of 0.33 M sorbitol in 50 mM 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES) adjusted to pH 8.0 with KOH. For the step gradients, Percoll was diluted at various concentrations in either 0.3 M sucrose, 10 mM MOPS-KOH, pH 7.2 (18%, 23%, 40% Percoll) or in SRM (35%, 80% Percoll). Import buffer (IB, adapted from Rudhe et al., 2002) included 0.3 M sucrose, 15 mM HEPES, 5 mM KH_2PO_4 , 0.05% BSA, adjusted to pH 7.4 with KOH. Homogenization medium (HoM) consisted of 0.33 M sorbitol, 2 mM EDTA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM MnCl_2 , 50 mM HEPES, adjusted to pH 7.6 with KOH and supplemented immediately before use with 5 mM sodium ascorbate.

Protein transport experiments

Freshly isolated intact organelles were incubated for 20 min at 25 °C in the light in import buffer (IB) supplemented with 4 mM MgCl_2 , 4 mM methionine, 4 mM ATP, 1 mM GTP, 0.2 mM ADP, 5 mM malic acid, 4.5 mM DTT, 10 mM potassium acetate, and 10 mM sodium hydrogen carbonate with radiolabeled precursor proteins obtained by *in vitro* transcription/translation in cell-free rabbit reticulocyte lysates in the presence of [^{35}S] methionine. After the import reaction, the organelles were pelleted by centrifugation and resuspended in 200 μL IB. Half of the sample was treated with thermolysin (200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 30 min on ice, and the other half was mock-treated. Intact organelles were subsequently recovered from each sample by sedimentation through Percoll cushions (chloroplasts: 3 min at 3500g with 35% Percoll; mitochondria: 10 min at 16,000g with 20% Percoll), washed once with 200 μL of the respective buffer and subjected to SDS-PAGE.

Miscellaneous

Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to Laemmli (1970). The gels were exposed to phosphorimaging screens and analyzed with the Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25) (Raytest, Straubenhardt, Germany). Western analysis was carried out as described by Jakob et al. (2009). Protein concentration was determined according to Bradford (1976), and the chlorophyll concentration was determined according to Arnon (1949). All other methods followed published protocols (Sambrook and Russell, 2001).

Results

Homogenization of pea leaves

All steps of the isolation procedure were performed at 4 °C using chilled solutions and equipment (i.e. bottles, tubes,

homogenizers, rotors, centrifuges etc.). In order to minimize shear forces that might lead to destruction of organelles, pipetting tips were truncated to generate larger openings.

Approximately 40 g of pea seedlings were harvested without roots and homogenized with a Waring blender (5×2 s) in 250 mL extraction buffer (EB). Residual cell debris was removed by filtering the homogenate through two layers of Miracloth (100 μM pore size, Calbiochem) and one layer of nylon mesh (30 μM pore size). The filtered homogenate was centrifuged for 5 min at 2000g. The pellet representing the crude chloroplast fraction and the supernatant, which was enriched in mitochondria, were collected separately and kept on ice until further processing.

Purification of intact chloroplasts and mitochondria

The chloroplast-containing pellet was carefully resuspended with a soft paint brush in 10 mL sorbitol resuspension medium (SRM), partitioned onto two Percoll step gradients (4 mL 80% Percoll and 10 mL 35% Percoll each) that were preformed in 30 mL Corex tubes, and centrifuged for 7 min at 2600g. Intact chloroplast, which accumulate at interphase between 35% and 80% Percoll (Fig. 1A), were carefully recovered, washed twice with 5 – 10 mL SRM (2 min at 1100g) and finally resuspended in SRM at a concentration of 1.0 mg chlorophyll/mL.

The mitochondria-containing supernatant of the first centrifugation step was cleared from most residual plastids by an additional centrifugation for 5 min at 6000g. Subsequent spinning of the recovered supernatant for 10 min at 16000g led to sedimentation of the mitochondria, which were resuspended with the use of a soft paint brush in 2 mL washing buffer (WB). The suspension was partitioned onto two Percoll step gradients (6 mL each of 40%, 23% and 18% Percoll in 0.3 M sucrose, 10 mM MOPS-KOH, pH 7.2) that were preformed in 30 mL Corex tubes, and centrifuged for 45 min at 12,000g (brake off). Intact mitochondria, which accumulated at interphase between 23% and 40% Percoll (Fig. 1D), were recovered, diluted with 100 mL resuspension buffer (RB), and sedimented by centrifugation for 15 min at 12,000g. This washing step was repeated three times, the last times with a smaller volume to allow collection of the suspension in a single 30 mL Corex tube. The final pellet of intact mitochondria was resuspended in RB at a concentration of 10 mg protein/mL.

Purity of the isolated pea organelles

Examination of the isolated organelles by bright field microscopy revealed an almost uniform appearance of the respective organelles within either fraction (Fig. 1B, E). Essentially all organelles of the chloroplast fraction exhibited chlorophyll fluorescence upon fluorescence microscopy (Fig. 1C), while in the mitochondrial fraction, chlorophyll fluorescence could be detected only in minute amounts (Fig. 1F), which indicates that the degree of reciprocal contamination was relatively low.

This was confirmed by Western analysis, in which the presence or absence of organellar marker proteins was examined. The mitochondrial fraction was free of any intact plastids, neither the small subunit of ribulose-bisphosphate carboxylase/oxygenase (SSU), a protein of the chloroplast stroma, nor Toc33, a subunit of the protein transport machinery of the outer envelope membrane of plastids, could be detected (Fig. 2A). The mitochondria were not completely devoid of thylakoid vesicles, however, because antisera raised against subunit CF₁ of ATP synthase or the 23 kDa subunit of the oxygen-evolving system associated with photosystem II (OEC23) yielded weak but clear signals. The result

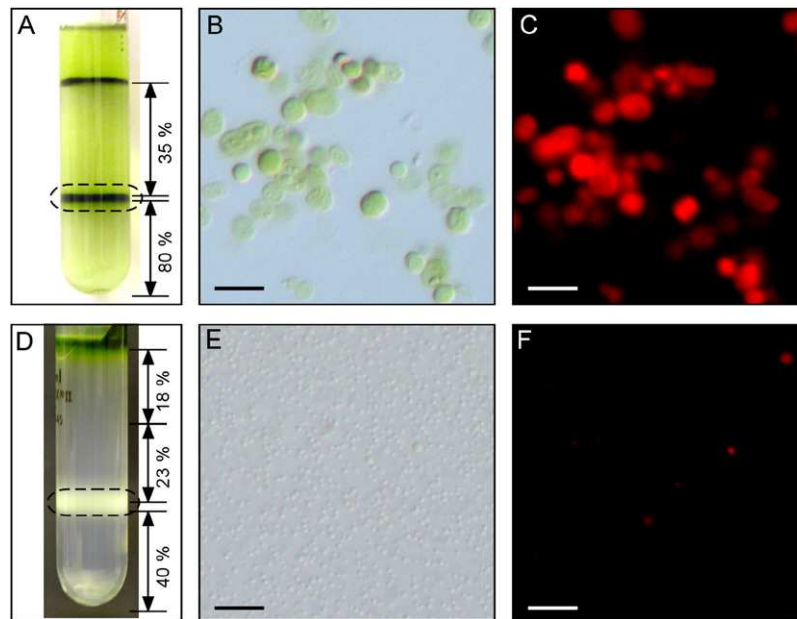


Fig. 1. Isolation of intact organelles from pea seedlings. Percoll step gradients with chloroplasts (A) or mitochondria (D) obtained from differential centrifugation are shown. The position of the intact organelles within each gradient is circled. Percoll concentration of each step is indicated in percent. Bright field (B, E) and fluorescence microscopy (C, F) of purified chloroplasts (B, C) and mitochondria (E, F). The scale bars shown correspond to 20 μ m.

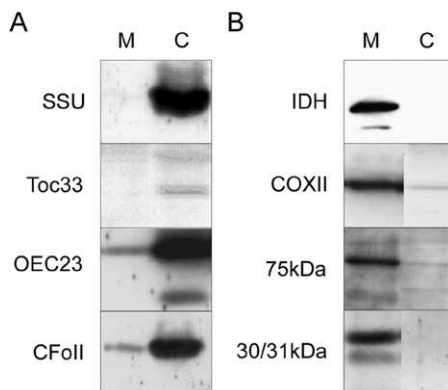


Fig. 2. Western analysis of isolated organelles. Total protein extracts from isolated pea mitochondria (corresponding to 10 μ g protein, lanes M) or chloroplasts (corresponding to 2.5 μ g chlorophyll, lanes C) were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and subjected to Western analysis using antisera raised against proteins from either plastids (A) or mitochondria (B). Plastid protein antibodies: *SSU* – small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, *Toc33* – 33 kDa subunit of the protein translocase of the outer envelope membrane from *Arabidopsis thaliana*, *OEC23* – 23 kDa subunit of the oxygen-evolving system associated with photosystem II from spinach, *CFoll* – subunit CFoll of chloroplast ATP synthase from spinach. Mitochondrial protein antibodies: *IDH* – plant isocitrate dehydrogenase, *COXII* – plant cytochrome oxidase II (both purchased from Agrisera, Vännäs, Sweden), *75kDa* – 75 kDa subunit of complex I from *Neurospora crassa*, *30/31kDa* – 30 kDa and 31 kDa subunits of complex I from *Neurospora crassa* (both kindly provided by Ulrich Schulte, Universität Düsseldorf, Germany). The immunoblots were developed by ECL and visualized by exposure to x-ray films.

of the reciprocal approach was similar. Upon Western analysis of the chloroplast fraction, no signal for the mitochondrial matrix marker protein isocitrate dehydrogenase (*IDH*) could be detected, demonstrating that the isolated chloroplasts were free of any contaminating intact mitochondria (Fig. 2B). However, since two out of three antisera raised against proteins from the inner membrane of mitochondria (*COXII*, 75 kDa, 30/31 kDa protein) yielded minor signals, it must be concluded that the chloroplast fraction contained minute amounts of mitochondrial membrane vesicles. Potential contamination with other membranes or

organelles (e.g., peroxisomes), though unlikely considering the differences in the isolation procedures (e.g. Reumann et al., 2007), was not analyzed and can therefore not be formally ruled out.

Although both organelle preparations were devoid of intact organelles from the respective other type, they were contaminated by inner organellar membranes to a minor degree. The extent of contamination was similar to that observed with mitochondria and chloroplasts that were isolated using organelle-specific standard protocols (data not shown), confirming the suitability of the method described here. Moreover, for those analyses that rely on intact organelles, such as protein import studies, minor contamination with internal organellar membranes can be neglected.

Simultaneously isolated pea organelles are import competent

In order to examine whether the simultaneously isolated chloroplasts and mitochondria were physiologically active and thus suitable for further analyses, *in organello* protein transport experiments were performed. In these experiments, isolated intact mitochondria or chloroplasts were incubated with precursor polypeptides of nuclear encoded organelle proteins, which were generated by *in vitro* transcription of the corresponding cDNA clones and subsequent *in vitro* translation of the resulting transcripts in cell-free translation systems like wheat germ extracts or rabbit reticulocyte lysate. Since the translation assays were supplemented with [³⁵S] methionine, the proteins were synthesized in radiolabeled form, allowing their detection by autoradiography after import.

In the example shown here, two organelle proteins were analyzed, namely the Rieske Fe/S precursor protein of the cytochrome *b/c1*-complex of the inner mitochondrial membrane of potato (Rieske) and the precursor of the 33 kDa subunit of the oxygen-evolving system associated with photosystem II of spinach chloroplasts (*OEC33*). Both precursor proteins have previously been shown to be suitable substrates for import studies with isolated organelles (Clausmeyer et al., 1993; Emmermann et al., 1994).

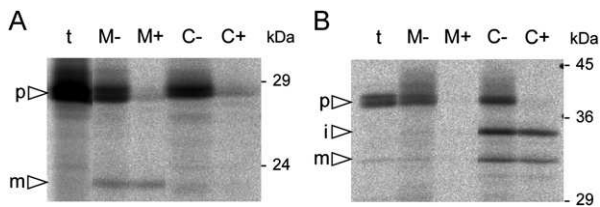


Fig. 3. *In organello* protein transport experiments with isolated intact pea organelles. Precursor polypeptides of the mitochondrial Rieske protein from potato (A) and the 33 kDa subunit of the oxygen-evolving system of spinach chloroplasts (B) that were obtained by coupled *in vitro* transcription/translation of the corresponding cDNA clones were incubated for 20 min at 25 °C with intact chloroplasts (lanes C) or mitochondria (lanes M) from pea. After the import reaction, the organelles were reisolated by sedimentation and treated with either thermolysin (lanes M+, C+) or mock-treated (lanes M-, C-). Stoichiometric amounts of each fraction were separated on 10–15% SDS-polyacrylamide gradient gels and visualized by phosphorimaging. In lanes t, 1 μ L of the respective *in vitro* translation assays was loaded. The position of the precursor (p), intermediate (i) and mature (m) polypeptides as well as that of molecular size marker proteins are indicated.

Incubation of the Rieske precursor protein with the isolated pea organelles under import conditions showed that the protein is imported into mitochondria but not into plastids (Fig. 3A). Within the mitochondria, the Rieske precursor protein, which upon SDS-PAGE had an apparent molecular weight of approx. 28 kDa, was processed to a polypeptide of approximately 23 kDa, which corresponds well to the size calculated for the mature Rieske protein (23.3 kDa). The presumed mature protein is protected by the mitochondrial envelope membranes against externally added protease (Fig. 3A, lane M+), which confirms that the protein was completely internalized into the organelle, and also demonstrates that the envelope membranes remain intact in the course of the experiment. In contrast, the residual precursor protein, which presumably is attached from the outside to the organelle envelope, is degraded upon proteolysis. Remarkably, the mitochondrial Rieske precursor protein also showed considerable association to the isolated chloroplasts and was even protected to a minor extent against proteolytic degradation (Fig. 3A, lanes C– and C+). However, it remains unclear whether this association is caused by specific binding of the Rieske precursor protein to the chloroplast import machinery or whether it is the result of nonspecific interaction with the lipid bilayer.

Analysis of OEC33 from spinach with the same approach yielded the expected reciprocal result, i.e. the precursor protein, which upon SDS-PAGE had an apparent molecular weight of approx. 39 kDa, was efficiently imported into chloroplasts but not at all into mitochondria (Fig. 3B). This is in line with results from Whelan et al. (1990), who also observed strict organelle specificity of wheat OEC33 in transport experiments with isolated organelles from spinach. However, it contradicts results by Cleary et al. (2002), who described significant mistargeting of the same protein when incubated with pea mitochondria. The reason for this divergent behavior of OEC33 from wheat remains unclear, but might be caused by the incubation conditions. Within the chloroplasts analyzed here, OEC33 was processed by organellar peptidases to two polypeptides of approximately 35 and 33 kDa (Fig. 3B, lane C-), which correspond to the stromal intermediate and the mature polypeptide of the thylakoid lumen, respectively (Claismeyer et al., 1993). Both processing products were protected by the chloroplast envelope membranes against externally added protease (Fig. 3B, lane C+), showing that the protein was completely internalized into the organelle and that the envelope membranes remained intact during the course of the experiment. Similar to the mitochondrial Rieske protein, OEC33 also showed some association with the non-target organelles (mitochondria), but in this case, the associated protein was

completely degraded by externally added protease (Fig. 3B, lanes M- and M+).

Simultaneous purification of intact mitochondria and chloroplasts from further species

In order to examine whether the method of simultaneous isolation of intact chloroplasts and mitochondria can also be successfully applied to other plant species, leaf tissue from both potato and spinach was used as starting material. The method described here yielded substantial amounts of pure and intact organelles only from potato (Fig. 4A). The yield was considerably lower with spinach leaves, and the contamination rate also strongly increased (data not shown).

Therefore, the protocol was modified as follows: (i) After harvest, spinach leaves were incubated over night at 4 °C in the dark to metabolize most of the transitory starch that accumulated in the chloroplasts. (ii) SRM was replaced by HoM in all steps of the chloroplast isolation procedure (for details see Materials and Methods). (iii) Percoll concentration of the step gradients was altered to 85% and 45% for chloroplast isolation (according to Bartlett et al., 1982) and to 45%, 25% and 5% for preparation of mitochondria. Following this modified protocol, substantial amounts of pure and intact mitochondria and chloroplasts were isolated from spinach leaves (Fig. 4B). Furthermore, the organelles were physiologically active, as demonstrated by *in organello* protein import experiments performed with the mitochondrial Rieske protein and chloroplast OEC33. Both precursor proteins were efficiently imported into their corresponding target organelles from spinach, where they were processed to their respective mature size (Fig. 5). Remarkably, the subsequent intraorgan transport of OEC33 across the thylakoid membrane apparently took place with higher efficiency than in pea chloroplasts, because only small amounts of an intermediary processing product could be detected. These results strongly suggest that simultaneous isolation of intact organelles is presumably possible for most plant species, at least after suitable modification of the basic protocol.

Discussion

The goal of this work was to develop a protocol for the simultaneous isolation of intact chloroplasts and mitochondria from a single pulping of plant tissue. The rationale behind this approach was the observation that organelles sometimes behave differently depending on their physiological background. One typical example concerns the efficiency of protein import, which can vary considerably with increasing age of the plant material used for organelle isolation (Dahlin and Cline, 1991; Murcha et al., 1999). This can lead to misinterpretations, particularly in those instances in which attributes of different organelles are compared. Yet another advantage of a single homogenate as starting material for organelle isolation is related to potential preparation artifacts, such as degeneration, extraction or proteolytic degradation of components of the envelope membranes, which upon simultaneous preparation should affect both organelles to approximately the same extent.

The methodology of simultaneous isolation of chloroplasts and mitochondria was first established for organelles from developing pea seedlings because this tissue is a widespread source of organelles utilized in protein transport assays. The protocol was also successfully applied to chloroplasts and mitochondria from potato and with some modifications, spinach leaves, which are also common sources for organelle preparation. Our attempts to use the protocol for the isolation of organelles from *Arabidopsis*

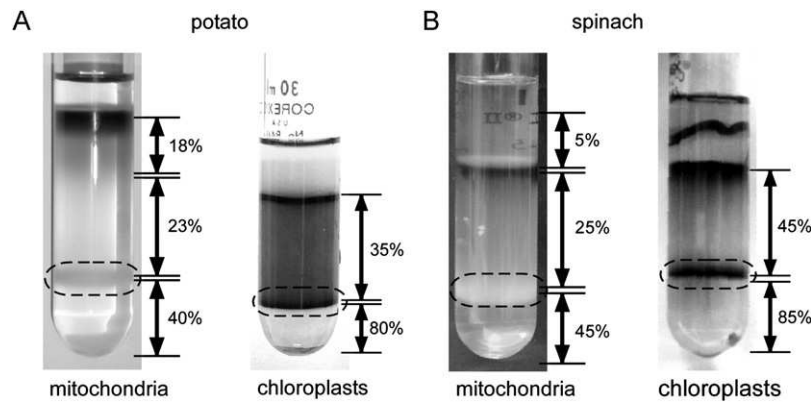


Fig. 4. Isolation of intact chloroplasts and mitochondria from potato (A) and spinach (B). Percoll step gradients with organelles obtained from differential centrifugation are shown. For further details, see the legend to Fig. 1.

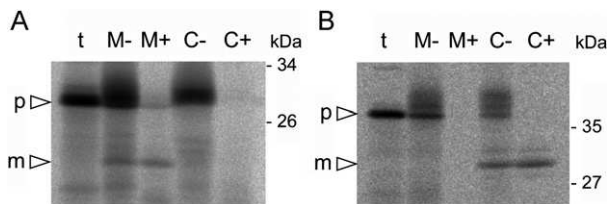


Fig. 5. *In organello* protein transport experiments with isolated intact spinach organelles. Precursor polypeptides of the mitochondrial Rieske protein from potato (A) and the 33 kDa subunit of the oxygen-evolving system of spinach chloroplasts (B) were analyzed as described in the legend to Fig. 3.

thaliana were only partially successful, however. It was possible to obtain intact mitochondria and chloroplasts from the homogenized leaf tissue, but neither of the subsequent Percoll gradients tested was sufficient to prevent considerable mutual cross contamination of the two organelles (data not shown). This indicates the need for further development work. Still, it can be presumed that the method is of general applicability and can likely be adapted to most plant species. In some instances, more comprehensive modification of the method might be required. This is not a specific problem of the simultaneous isolation procedure, but a general challenge of organelle isolation from certain tissues or plants. Moreover, since comparison of organelle function is not restricted to only mitochondria and chloroplasts, it appears worthwhile to extend this method to further organelles.

Acknowledgements

We thank Ulrich Schulte (Universität Düsseldorf) for the generous gift of antisera raised against complex I subunits from *Neurospora crassa*, Udo Schmitz (Universität Hannover) for providing the clone for the mitochondrial Rieske protein of potato, and Daniela Ditte and Manuela Sondermann for helping to adapt the spinach protocol. This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (Sonderforschungsbereich 648).

References

- Arnon DI. Copper Enzymes in isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiol* 1949;24(1):1–15.
- Bartlett SG, Grossman AR, Chua NH. In vitro synthesis and uptake of cytoplasmically-synthesized chloroplast proteins. In: *Methods in Chloroplast Molecular Biology* 1982. p 1081–1091.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248–54.
- Braun HP, Emmermann M, Krufft V, Schmitz UK. Cytochrome c1 from potato: a protein with a presequence for targeting to the mitochondrial intermembrane space. *Mol Gen Genet* 1992;231(2):217–25.
- Brock IW, Hazell L, Michl D, Nielsen VS, Moller BL, Herrmann RG, et al. Precursors of one integral and five luminal thylakoid proteins are imported by isolated pea and barley thylakoids: optimisation of in vitro assays. *Plant Mol Biol* 1993;23(4):717–25.
- Clausmeyer S, Klosgen RB, Herrmann RG. Protein import into chloroplasts. The hydrophilic luminal proteins exhibit unexpected import and sorting specificities in spite of structurally conserved transit peptides. *J Biol Chem* 1993;268(19):13869–76.
- Cleary SP, Tan FC, Nakrieko KA, Thompson SJ, Mullineaux PM, Creissen GP, et al. Isolated Plant Mitochondria Import Chloroplast Precursor Proteins in Vitro with the Same Efficiency as Chloroplasts. *J Biol Chem* 2002;277(7):5562–9.
- Dahlin C, Cline K. Developmental Regulation of the Plastid Protein Import Apparatus. *Plant Cell* 1991;3(10):1131–40.
- Emmermann M, Clericus M, Braun HP, Mozo T, Heins L, Krufft V, et al. Molecular features, processing and import of the Rieske iron-sulfur protein from potato mitochondria. *Plant Mol Biol* 1994;25(2):271–81.
- Jakob M, Kaiser S, Gutensohn M, Hanner P, Klosgen RB. Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793(2):388–94.
- Klein M, Binder S, Brennicke A. Purification of Mitochondria from *Arabidopsis*. In: *Arabidopsis Protocols* 1998. p 49–53.
- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970;227(5259):680–5.
- Murcha MW, Huang T, Whelan J. Import of precursor proteins into mitochondria from soybean tissues during development. *FEBS Lett* 1999;464(1–2):53–9.
- Reumann S, Babujee L, Ma C, Wienkoop S, Siemsen T, Antonicelli GE, et al. Proteome analysis of *Arabidopsis* leaf peroxisomes reveals novel targeting peptides, metabolic pathways, and defense mechanisms. *Plant Cell* 2007;19(10):3170–93.
- Rudhe C, Chew O, Whelan J, Glaser E. A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *The Plant Journal* 2002;30(2):213–20.
- Sambrook J, Russell D. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001.
- Whelan J, Knorpp C, Glaser E. Sorting of precursor proteins between isolated spinach leaf mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* 1990;14(6):977–982.

KAPITEL 2

2 *Dual targeting* des mitochondrialen Proteins Cytochrom c_1

2.1 Zusammenfassung

Cytochrom c_1 (Cyt c_1) ist im Kerngenom codiert und wird durch das N-terminale Transitpeptid in die innere Membran der Mitochondrien geleitet (Braun et al., 1992^b) und dort anschließend in den Komplex III der Atmungskette assembliert. Folglich führt eine Inkubation des Cyt c_1 -Vorläuferproteins mit isolierten Mitochondrien zu einem Import und anschließender Prozessierung dieses Proteins. Unerwarteter Weise wird Cyt c_1 auch von Chloroplasten als Substrat erkannt und importiert. Das prozessierte Produkt der Mitochondrien zeigte eine höhere Mobilität nach SDS-PAGE als das in den Chloroplasten, was darauf hinweist, dass offenbar verschiedene Bereiche des Cyt c_1 -Vorläuferproteins von den organelleigenen Prozessierungs-peptidasen erkannt werden wodurch zwei Produkte mit unterschiedlicher Größe entstehen. Eine Kontamination mit dem jeweils anderen Organell kann durch die zuvor durchgeführten mikroskopischen und Western Analysen (siehe Kapitel 1) sowie die verschiedenen Migrationseigenschaften der Prozessierungsprodukte ausgeschlossen werden. Demzufolge zählt Cyt c_1 zu der Gruppe von Proteinen mit dualer Lokalisierung.

Da eine Funktion von Cyt c_1 in den Chloroplasten fraglich erscheint, wurden weitere *in organello* Kontrollexperimente durchgeführt. In dem sogenannten "gemischten" Ansatz (Rudhe et al., 2002^b) wurde Cyt c_1 beiden Organellen als Ziel angeboten um eine konkurrierende Situation der Organellen um das zugegebene Substrat zu simulieren. Darüber hinaus wurden Organellen aus Spinat- statt aus Erbsenpflanzen isoliert und für *in organello* Transportexperimente eingesetzt um artspezifische Einflüsse beim Import von Cyt c_1 auszuschließen. In beiden Fällen wird Cyt c_1 sowohl in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten transportiert. Somit ist der Import in das Fremdorganell nicht auf die Abwesenheit des authentischen Organells zurückzuführen und offensichtlich eine grundlegende Eigenschaft von Cyt c_1 sowie der Organellen höherer Pflanzen.

Durch den Einsatz von zwei organellspezifischen Ionophoren wurde die Energetisierung des Transports von Cyt c_1 in beide Organellen untersucht. Das Cyt c_1 wird nicht in die Mitochondrien transportiert sobald der dafür notwendige elektrochemische Gradient an der inneren Mitochondrienmembran durch Valinomycin zerstört wird, der Import in die Chloroplasten ist erwartungsgemäß unbeeinflusst unter diesen Bedingungen. In Gegenwart von Nigericin wird die ATP-Synthese an der thylakoidären Membran infolge des Abbaus des Protonengradienten unterbunden. Dadurch wird der Import von Cyt c_1 in den Chloroplasten blockiert, jedoch bleibt der Mitochondrienimport bestehen. Somit benötigt der Transport von Cyt c_1 in beide Organellen die spezifische Energetisierung, die für einen Import authentischer Proteine beschrieben ist (Grossmann et al., 1980; Schleyer et al., 1982). Komplementierend wurde mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten der Transportweg vom Cyt c_1 in den Chloroplasten untersucht. In Gegenwart einer ansteigender Konzentrationen von heterolog überexprimierten Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase (FNR), ein monospezifisches stromales Protein, sollte der generelle Transportweg authentischer Chloroplastenproteine "abgesättigt" werden. Im Fall, dass sowohl

Kompetitorprotein als auch das Substrat Teile des identischen Transportweges nutzen, würde eine Reduktion des Importes an Cyt1 resultieren. Tatsächlich wird mit sequentieller Erhöhung an zugegebener FNR der Cyt1-Import spezifisch in die Chloroplasten reduziert und schließlich vollständig inhibiert. Demzufolge wird Cyt1 über Teile des TOC/TIC-Apparates (siehe Einleitung, Abschnitt 4.1 und 4.2) in den Chloroplasten transportiert. Innerhalb des Chloroplasts akkumuliert Cyt1 im Stroma, trotz der C-terminalen Transmembrandomäne, der das Protein in der inneren Membran der Mitochondrien verankert. Das Cyt1 ist nach dem Import in das Stroma stabil obwohl gezeigt werden konnte, dass fehlgeleitete Proteine innerhalb des Fremdorganells nach kurzer Zeit vollständig degradiert werden (Halperin and Adam, 1996). Folglich wird Cyt1 offensichtlich nicht als fremdes Protein innerhalb des Chloroplastens erkannt.

Die *in organello* Transportexperimente haben den Nachteil, dass mögliche regulierende Einflüsse des Cytosols auf die Sortierung des Substrates zwischen den Organellen bei der Analyse ausgeschlossen sind. Für die Untersuchung des Transportverhaltens von Cyt1 im zellulären Kontext war es notwendig die codierende Gensequenz für eine chimäre Reporterkonstruktion bestehend aus dem Transitpeptid des Cyt1 und EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) in die Pflanzenzelle einzubringen. Dazu wurde Blattgewebe von Erbsenpflanzen biolistisch transformiert und anschließend die entsprechende Gensequenz transient unter der Kontrolle des 35S CaMV (*cauliflower mosaic virus*) Promotors konstitutiv in der transformierten Zelle exprimiert. Mikroskopische Analysen mittels CLSM (*confocal laser scanning microscope*) zeigen in diesen Zellen eine Markierung der Mitochondrien und zusätzlich ein schwaches aber signifikantes Signal in den Plastiden, das in der Überlagerung mit Chlorophyllsignal co-lokalisiert. Demzufolge ist das Transitpeptid des Cyt1 in der Lage den Passagier EYFP zu beiden Organellen in lebenden Pflanzenzellen zu dirigieren. Somit ist das dokumentierte *dual targeting* in den vorherigen *in organello*-Experimenten kein methodischer Artefakt sondern eine Eigenschaft des Transitpeptids von Cyt1. Zusätzlich zu den beschriebenen Transportexperimenten wurde die Präsenz von Cyt1 in beiden Organellen aus verschiedenen Pflanzen unter Verwendung von Cyt1-spezifischem Antiserum mittels Western Analyse untersucht. Es zeigt sich, dass Cyt1 sowohl in Mitochondrien als auch in Chloroplasten aus Blattgewebe von Erbse, Spinat und Kartoffel in signifikanten Mengen akkumuliert.

Die dargestellten Experimente belegen, dass Cyt1 die Kompetenz besitzt von den Transportkomplexen der Mitochondrien und Chloroplasten erkannt und importiert zu werden und darüber hinaus in verschiedenen Pflanzenarten in beiden Organellen nachweislich präsent ist. Da eine Funktion von Cyt1 im Fremdorganell weiterhin fraglich ist, nimmt Cyt1 eine Sonderstellung unter den bisherigen dualen Proteinen mit Funktion(en) in beiden Organellen ein und wirft Fragen zur Notwendigkeit des dualer Lokalisierung in diesem speziellen Fall auf.

2.2 Artikel

Dual Targeting of a Mitochondrial Protein: The Case Study of Cytochrome c_1

Anja Rödiger, Bianca Baudisch, Uwe Langner and Ralf Bernd Klösgen¹

Institute of Biology—Plant Physiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, 06120 Halle/Saale, Germany

ABSTRACT As a result of the endosymbiotic gene transfer, the majority of proteins of mitochondria and chloroplasts is encoded in the nucleus and synthesized in the cytosol as precursor molecules carrying N-terminal transit peptides for the transport into the respective target organelle. In most instances, transport takes place into either mitochondria or chloroplasts, although a few examples of dual targeting into both organelles have been described. Here, we show by a combination of three different experimental strategies that also cytochrome c_1 of potato, a component of the respiratory electron transport chain, is imported not only into mitochondria, but also into plastids. *In organello* import experiments with isolated mitochondria and chloroplasts, which were analyzed in both single and mixed organelle assays, demonstrate that the processing products accumulating after import within the two endosymbiotic organelles are different in size. Dual targeting of cytochrome c_1 is observed also *in vivo*, after biolistic transformation of leaf epidermal cells with suitable reporter constructions. Finally, Western analyses employing cytochrome c_1 -specific antiserum provide evidence that the protein accumulates in significant amounts in mitochondria and chloroplasts of both pea and spinach. The possible consequences of our findings on the relevance of the dual targeting phenomenon are discussed.

Key words: Protein transport; dual targeting; cytochrome c_1 ; mitochondria; chloroplast.

INTRODUCTION

Plant cells are the result of two consecutive endosymbiotic events that led to the development of mitochondria and chloroplasts. In the course of evolution, most of the genes from the former endosymbionts were either lost or (predominately) transferred to the nucleus of the host cell. Consequently, these nuclear-encoded organelle proteins are synthesized in the cytosol as precursor polypeptides carrying cleavable amino-terminal extensions (von Heijne et al., 1989), named presequences or transit peptides, that mediate transport of the protein 'back' into the respective target organelle.

Such transport is generally assumed to be strictly organelle-specific. However, in the last few years, an increasing number of proteins have been described that not only are transported into a single type of organelles, but show dual targeting into both mitochondria and chloroplasts (for a recent review, see Carrie et al., 2009), or even further cellular compartments like peroxisomes (Zhang and Hu, 2008) or endoplasmic reticulum (Levitan et al., 2005). In some cases, the corresponding genes encode two targeting signals with different organelle specificity, which, due to transcriptional or post-transcriptional mechanisms, are differentially exposed at the N-terminus of the respective precursor protein (Peeters and Small, 2001). Alternatively, dual targeting is obtained by transit peptides with ambiguous organelle specificity, which are recognized by the protein import

machineries of both mitochondria and chloroplasts (Berglund et al., 2009). Prominent examples are the organellar aminoacyl-tRNA synthetases, which are often encoded in the nucleus by single copy genes but exert their function in both endosymbiotic organelles (Small et al., 1999). However, a function in both organelles could not yet be assigned for all proteins with dual targeting properties, suggesting that a certain degree of 'mistargeting' even of proteins with a strictly organelle-specific function might be tolerable for the cell.

One typical example of such a protein is cytochrome c_1 (Cyt c_1) of potato, an integral subunit of complex III, the cytochrome b/c_1 -complex, of the respiratory electron transport chain in the inner mitochondrial membrane. We have originally chosen this protein as mitochondrial control to establish protein transport assays with isolated plant mitochondria. However, already in our initial experiments, Cyt c_1 showed dual targeting properties that had not been described in the literature. In order to clarify

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail klosgen@pflanzenphys.uni-halle.de, fax +49-345-55 27 285, tel. +49-345-55 26 200.

© The Author 2011. Published by the Molecular Plant Shanghai Editorial Office in association with Oxford University Press on behalf of CSPP and IPPE, SIBS, CAS.

doi: 10.1093/mp/ssr001, Advance Access publication 8 February 2011
Received 27 September 2010; accepted 31 December 2010

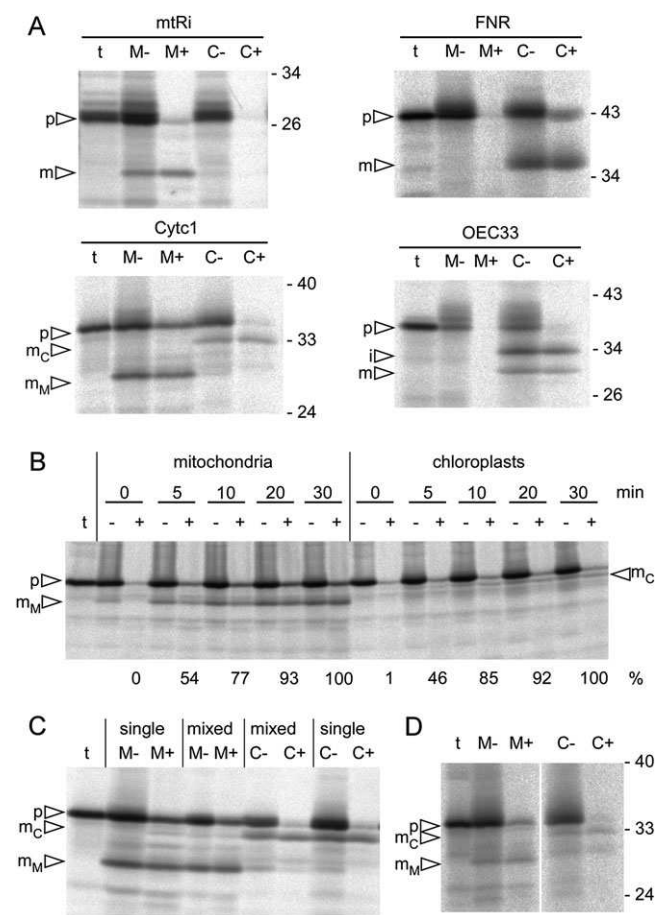


Figure 1. Organelle Targeting of Cytc1.

(A) *In organello* protein transport experiments with isolated intact pea organelles.

Precursor polypeptides of the mitochondrial Rieske Fe/S protein (*mtRi*), ferredoxin-NADP⁺-oxidoreductase (*FNR*), cytochrome c_1 (*Cytc1*), and the 33 kDa subunit of the oxygen evolving system (*OEC33*) that were obtained by coupled *in vitro* transcription/translation of the corresponding cDNA clones were incubated for 20 min at 25°C with intact mitochondria (*lanes M*) or chloroplasts (*lanes C*) from pea. After the import reaction, the organelles were re-isolated by sedimentation and treated with either thermolysin (*lanes M+*, *C+*) or mock-treated (*lanes M-*, *C-*). Stoichiometric amounts of each fraction corresponding to 50 μg protein (mitochondria) or 12.5 μg chlorophyll (chloroplasts) were separated on 10–15% SDS–polyacrylamide gradient gels and visualized by phosphorimaging. In *lanes t*, 1 μL of the respective *in vitro* translation assays was loaded. The position of precursor (*p*), intermediate (*i*), and mature (*m*) polypeptides are indicated by open arrowheads, as are the terminal processing products of *Cytc1* accumulating in mitochondria and chloroplasts after import (*m_M* and *m_C*, respectively). The size of molecular marker proteins is given in kDa.

(B) *In organello* time-course experiment analyzing *Cytc1* with isolated intact pea organelles. Import was performed as described in (A) for the time periods indicated above the lanes. The relative amounts of translocated protein (in terms of percentage of imported protein after 30 min) are indicated below the corresponding lanes.

(C) Import of *Cytc1* into single or mixed organelle samples from pea. While in the *single* assays, *Cytc1* was analyzed as described in (A), in the *mixed* assays, the isolated mitochondria and chloroplasts were

this observation and to determine the sub-cellular localization of this protein in detail, we have combined three independent and complementing approaches, namely (1) *in organello* protein transport studies with isolated mitochondria and chloroplasts, (2) transient expression of fluorescent fusion proteins after biolistic transformation (Klein et al., 1987), and (3) Western analysis of SDS–PAGE-separated organelle proteins. To permit comparability of the results obtained with the different approaches, all experiments were performed with pea leaves but complemented if necessary with material from other species to confirm the universal validity of the results.

RESULTS

Cytochrome c_1 Shows Dual Targeting into Isolated Mitochondria and Chloroplasts

In order to establish the analytical system, precursor polypeptides of two chloroplast and two mitochondrial proteins were analyzed with *in organello* import assays using intact mitochondria and chloroplasts that were isolated from a single pulping of pea leaves. Western analyses confirmed that these organelle preparations are devoid of intact organelles from the respective other type (Rödiger et al., 2010). The chloroplast proteins chosen were the 33-kDa subunit of the oxygen evolving system associated with photosystem II (*OEC33*) and ferredoxin-NADP⁺-oxidoreductase (*FNR*), both from spinach. The mitochondrial proteins studied were the Rieske-Fe/S protein (*mtRi*) and cytochrome c_1 (*Cytc1*), both from the cytochrome *b/c₁*-complex (complex III) of the respiratory chain of potato mitochondria.

Incubation of the radiolabeled precursor proteins, which were obtained by *in vitro* transcription of the corresponding cDNA clones and subsequent *in vitro* translation with reticulocyte lysates in the presence of [³⁵S]-methionine, with freshly isolated intact organelles, shows for three of these proteins the expected organelle specificity: *mtRi* is imported into mitochondria but not into chloroplasts, while *FNR* and *OEC33* show the reciprocal result, namely they are transported into chloroplasts but not into mitochondria (Figure 1A). In line with literature data (Jansen et al., 1988; Clausmeyer et al., 1993; Emmermann et al., 1994), each of the precursor proteins is cleaved after import by the corresponding organellar processing peptidases to its apparent mature size as judged from mobility upon SDS–PAGE (*mtRi*—23 kDa, *FNR*—36 kDa, *OEC33*—33 kDa). For *OEC33*, an additional processing product of approximately 34 kDa, namely intermediate in size between the precursor and the mature protein, can be observed, which is the result of retarded thylakoid transport leading to the temporary

combined prior to incubation with the radiolabeled precursor protein and again separated afterwards by centrifugation through a Percoll cushion (Rudhe et al., 2002).

(D) *In organello* protein transport of *Cytc1* into mitochondria and chloroplasts isolated from spinach. The experiment was performed as described in (A).

accumulation of the stromal intermediate (Rödiger et al., 2010). All processing products are resistant to protease added externally to the assays after import, which confirms that they have been internalized into the organelles (Figure 1A). In contrast, precursor proteins that are not imported but remain attached to the organellar envelopes in the course of the experiment are mostly, though not always completely, degraded under these conditions.

Unexpectedly, Cytc1 shows a different behavior in such *in organello* import experiments: it is not only imported into mitochondria, but accumulates in a protease-protected manner also in the chloroplasts (Figure 1A). Within both organelles, the protein is processed after membrane transport, though at different positions: in mitochondria, Cytc1 is cleaved to its mature size of 27 kDa, whereas in chloroplasts, it accumulates as cleavage product of approximately 33 kDa. Due to this size difference, it can be excluded that the apparent chloroplast import of Cytc1 is in fact the result of contamination of the chloroplast fraction by mitochondria. Although the actual amount of imported Cytc1 is significantly higher for mitochondria than for chloroplasts, time-course experiments demonstrate that the kinetics of import is similar for both organelles (Figure 1B). Essentially, the same result is obtained also with cytochrome *c*₁ from *Arabidopsis thaliana*, which likewise shows dual targeting and divergent processing with mitochondria and chloroplasts in *in organello* experiments (see Supplemental Figure 1). In this instance, however, the degree of chloroplast import is even lower.

In order to rule out that chloroplast transport of Cytc1 is merely due to the lack of mitochondria in the assays, *in organello* experiments were performed also with mixed populations of organelles (Rudhe et al., 2002). In such assays, isolated chloroplasts and mitochondria are combined in a ratio similar to that found in leaf cells, as judged from Western analysis employing organelle-specific antisera. Separation of the mixed organelles after incubation with the Cytc1 precursor protein demonstrates that the organelle specificity of Cytc1 transport is unaffected by the presence or absence of potentially competing organelles. Analogous to the single organelle assays, Cytc1 is imported into both mitochondria and chloroplasts and processed to two different products that are resistant against externally added protease (Figure 1C). Also, the rate of transport into each type of organelle is comparable between single and mixed organelle assays, which corroborates the conclusion that transport of Cytc1 into chloroplasts is an inherent property of this protein and not the result of mistargeting in the absence of the authentic target organelle.

Since isolated pea mitochondria have been described to unspecifically import also chloroplast proteins in some instances (Cleary et al., 2002), it might be suspected that also the chloroplasts from pea are not always strictly selective concerning the proteins imported. Therefore, *in organello* import of Cytc1 was performed also with organelles isolated from spinach leaves instead (Rödiger et al., 2010). Except for an overall lower import efficiency, basically the same results as with pea organelles were obtained (Figure 1D): Cytc1 is imported into both mitochondria

and chloroplasts and cleaved within these organelles to two different processing products that are similar in size to those accumulating in the respective pea organelles after *in organello* transport. Again, the processing products are resistant to externally added protease, demonstrating that they are the result of complete internalization of Cytc1 into the organelles. Thus, it can be presumed that the phenomenon of dual targeting of Cytc1 into mitochondria and chloroplasts is a common feature in higher plants and not restricted to organelles from pea.

Cytc1 Is Transported along the General Import Pathways

In order to investigate whether transport of Cytc1 into mitochondria and chloroplasts follows the respective general import pathways (e.g. Neupert and Herrmann, 2007; Jarvis, 2008; Balsera et al., 2009), the effect of specific transport inhibitors was examined. As expected, import of Cytc1 into isolated mitochondria is abolished in the presence of the ionophore valinomycin, which dissipates the electrochemical gradient ($\Delta\psi$) across the inner mitochondrial membrane (Schleyer et al., 1982). The precursor protein still binds to the organelles under these conditions but it is neither imported nor processed to its mature form (Figure 2A), demonstrating that the energy dependence of Cytc1 import into plant mitochondria is similar to that described for the import of proteins into mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae* and *Neurospora crassa* (Teintze et al., 1982).

An electrical membrane potential is not essential for protein transport into chloroplasts, though (Flügge and Hinz, 1986), and, accordingly, valinomycin does not affect chloroplast transport of Cytc1 (Figure 2A). In contrast, in the presence of nigericin, which dissipates the proton gradient across membranes

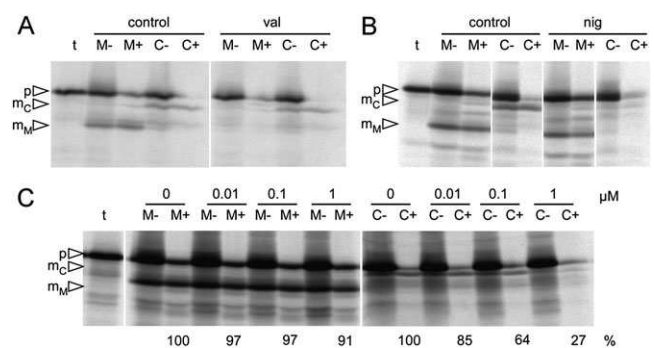


Figure 2. Effect of Transport Inhibitors and Competitor Protein on Organelle Import of Cytc1.

In organello protein transport experiments of Cytc1 were performed in the absence (*control*) or presence of either (A) 1 μM valinomycin (*val*) or (B) 2 μM nigericin (*nig*). In panel (C), import of Cytc1 into isolated mitochondria and chloroplasts was performed in the presence of increasing amounts of FNR precursor protein, which was obtained by heterologous overexpression in *E. coli*. The concentration of competitor protein present in each assay (given in μM) is indicated above the lanes. The relative amounts of translocated protein were quantified (in terms of percentage of the control reaction in the absence of competitor) and are given below the corresponding lanes. For further details, see the legend to Figure 1.

and hence abolishes thylakoidal ATP synthesis, transport of Cyt_c1 into chloroplasts is inhibited (Figure 2B), in line with the requirement of internal ATP for the import of authentic chloroplast proteins (Grossman et al., 1980). As expected, import of Cyt_c1 into mitochondria remains unaffected in the presence of nigericin, which emphasizes the divergent energy requirement for protein transport into the two endosymbiotic organelles as well as the minor contribution of the proton gradient to the extent of pmf (proton motive force) in the mitochondrial inner membrane. Competition experiments were performed as a complementary approach to further characterize the import pathway of Cyt_c1. When the chloroplast protein transport machinery is gradually saturated by excess amounts of the precursor of FNR, which was obtained by overexpression in *E. coli*, import of Cyt_c1 into the organelle is increasingly inhibited (Figure 2C). Control experiments showed that the import of Cyt_c1 into mitochondria remains unaffected in the presence of the competitor protein, which confirms the specificity of the competition. Thus, it can be concluded that chloroplast import of Cyt_c1 depends on the availability of components of the general protein transport machinery (Toc/Tic) that are also required for the import of authentic chloroplast precursor proteins.

Cyt_c1 Accumulates in Different Compartments after Organelle Import

Cyt_c1 is an integral subunit of complex III of the respiratory electron transport chain in the inner mitochondrial membrane. In line with that, Cyt_c1 is found accumulating in the membrane fraction of mitochondria after *in organello* import (Figure 3A). In contrast, after transport into isolated chloroplasts, the protease-protected processing product is found neither in the envelope nor in the thylakoid membranes to any significant extent. Instead, it accumulates almost quantitatively in the soluble fraction, most likely in the stroma (Figure 3A), despite the fact that the protein presumably still carries its C-terminal membrane anchor domain (Braun et al., 1992). Solubility of the protein within the stromal fraction is possibly facilitated by the residual part of the transit peptide that is retained at the N-terminus of Cyt_c1, assuming that cleavage takes place as usual in the N-terminal region of the protein after import. It might further be improved by the association with stromal chaperones, as described, for example, for the Rieske Fe/S protein upon its passage through the stromal compartment (Madueno et al., 1993; Molik et al., 2001), but we could not detect any indicative protein complexes comprising Cyt_c1 when analyzing stroma by native protein gel electrophoresis after *in organello* import (data not shown). It must be noted that, although unlikely, it cannot formally be ruled out at this point that cleavage of Cyt_c1 within the chloroplasts takes place instead in the C-terminal region of the precursor protein leading to the removal of the membrane anchor, which would likewise raise stromal solubility of the protein.

Within the chloroplast stroma, Cyt_c1 is remarkably stable. It could have been suspected that the protein is instantaneously recognized by the organellar protein degradation machinery,

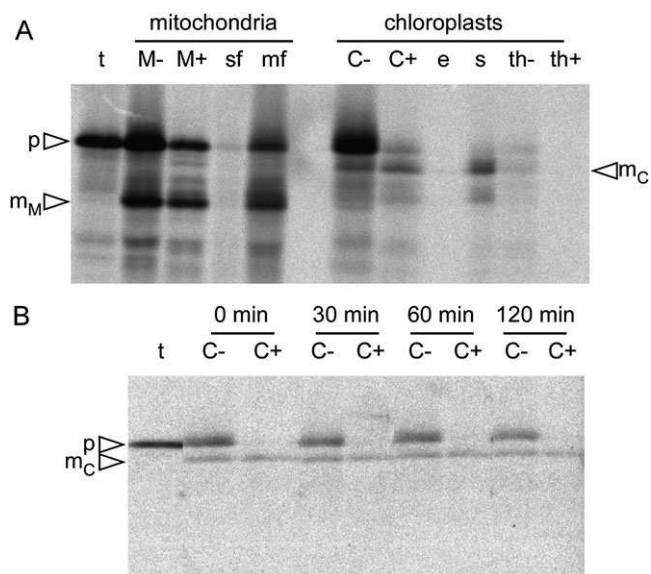


Figure 3. Localization and Stability of Cyt_c1 within the Organelles.

(A) Localization of Cyt_c1 after *in organello* protein transport. Protease-treated pea organelles were fractionated into either soluble (sf) and membrane fraction (mf) or envelope (e), stroma (s), and thylakoids (th), which were further treated with thermolysin (lane th+) or mock-treated (lane th-). Stoichiometric amounts of each organellar sub-fraction corresponding to mitochondria equivalent to 100 μg protein (lanes sf, mf) or chloroplasts equivalent to 25 μg chlorophyll (lanes e, s, th-, th+) were loaded.

(B) Stability of Cyt_c1 within chloroplasts. Protease-treated (C+) and mock-treated (C-) pea chloroplasts that were re-isolated after import of Cyt_c1 were further incubated at room temperature for the time period indicated above the lanes. For further details, see the legend to Figure 1.

as it was described, for example, for OEC33 if trapped within the chloroplast stroma (Halperin and Adam, 1996). Instead, the processing product of Cyt_c1 remains essentially unaffected even if the chloroplasts are further incubated after the import reaction at room temperature for 2 h (Figure 3B). Thus, there is no indication that the protein would be identified by the chloroplast as being wrong, suggesting that it is not detrimental for the organelle and is therefore tolerated for at least several hours.

Cyt_c1 Shows Dual Targeting *In Vivo*

Protein transport experiments with isolated organelles have the inherent disadvantage that cytosolic factors that might influence targeting specificity are excluded from the assays. Since cytosolic sorting mechanisms have been described resting, for example, on the phosphorylation of transit peptides and the interaction of the transport substrate with cytosolic 14–3–3 proteins (Waegemann and Soll, 1996; May and Soll, 2000), *in vivo* experiments were performed as a complementing approach. To allow detection of the sub-cellular localization of Cyt_c1 *in vivo*, we generated a reporter construction (Cyt_c1(1–141)/EYFP) consisting of the N-terminal 141 amino acids of the Cyt_c1 precursor fused to EYFP, the enhanced yellow fluorescent protein (Figure 4A). In *in organello* experiments, this reporter polypeptide,

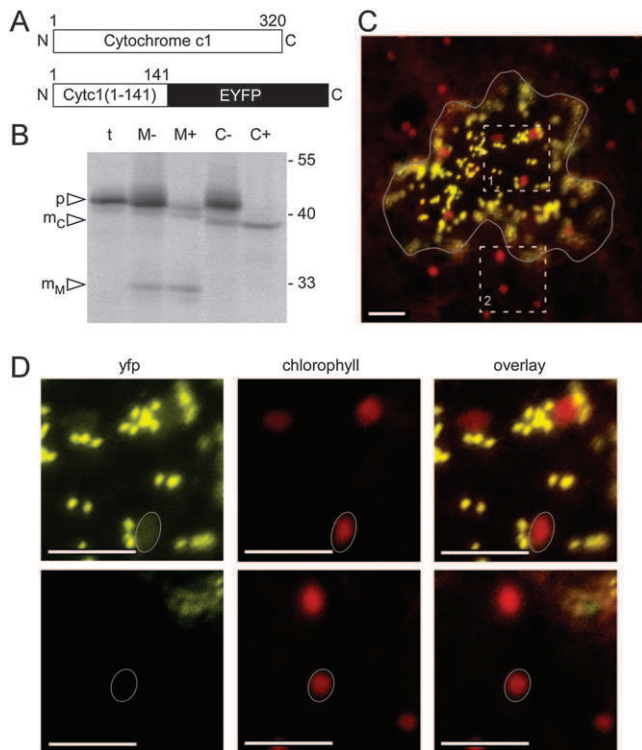


Figure 4. Organelle targeting of Cytc1(1-141)/EYFP *In Vitro* and *In Vivo*.

(A) Schematic representation of the chimeric reporter protein Cytc1(1–141)/EYFP consisting of the N-terminal 141 residues of the Cytc1 precursor fused to EYFP. The authentic Cytc1 precursor is depicted for comparison.

(B) *In organello* import of Cytc1(1–141)/EYFP into mitochondria and chloroplasts isolated from pea. For details, see the legend to Figure 1A.

(C) Sub-cellular localization of Cytc1(1–141)/EYFP in plant cells. The coding sequence of Cytc1(1–141)/EYFP was transiently expressed under the control of the 35S CaMV promoter after biolistic transformation of leaf epidermis cells of pea and analyzed by confocal laser scanning microscopy. An overlay picture of both the YFP channel (displayed in yellow) and the chlorophyll channel (displayed in red) is shown. The border of the transformed cell is depicted by a continuous white line. The squares marked with dashed lines highlight areas of the transformed cell (square 1) and an untransformed neighbor cell (square 2) that are shown in higher magnification in the upper and lower panel in (D), respectively.

(D) YFP fluorescence (left), chlorophyll autofluorescence (middle), and the corresponding overlay image (right) of sections of the transformed cell (upper panel) and an untransformed neighbor cell (lower panel). The position of one representative plastid of each cell is encircled for better visualization. The scale bars correspond to 10 μm .

which has a size of approximately 42 kDa, shows the same targeting characteristics as the authentic Cytc1 precursor, namely it is transported into both endosymbiotic organelles and cleaved by the respective organellar processing peptidases to two distinct products (Figure 4B). The apparent size of these processing products on denaturing protein gels, notably 33 kDa in mitochondria and 38 kDa in chloroplasts, suggests that cleavage took place at the same positions as in the authentic protein after

in organello import, which confirms that Cytc1 is processed in chloroplasts within the N-terminal transit peptide and not in the C-terminal membrane anchor region.

To study the targeting behavior of Cytc1 in intact plant tissue, the reporter construction Cytc1(1–141)/EYFP was placed under the control of the constitutive 35S CaMV promoter and transiently expressed in epidermal leaf cells of pea after biolistic transformation. This approach has the advantage that untreated, intact wild-type leaves rather than protoplasts or pathogen-treated material can be used. As expected, the protein accumulates in mitochondria as indicated by the strong YFP-fluorescence of numerous small particles with a diameter of approximately 1 μm that are found distributed throughout the cytoplasm (Figure 4C). Additionally, weak but significant YFP-fluorescence is observed in transformed cells to co-localize with the autofluorescence of chlorophyll (Figure 4D, upper panel) demonstrating that a minor fraction of the protein was transported also into the plastids present in the epidermal cells (Omasa et al., 2009). Comparison with untransformed neighbor cells, which do not show any co-localization of YFP-fluorescence and chlorophyll autofluorescence (Figure 4D, lower panel), rules out that the presumed chloroplast transport is in fact false YFP-detection caused by the imaging conditions used. Essentially identical results are obtained with analogous reporter constructions comprising either the complete coding sequence of Cytc1 or only the N-terminal 77 residues of Cytc1 covering the transit peptide (see Supplemental Figure 2). In all instances, the uniform distribution of the EYFP signal within the plastids corroborates the conclusion from the organelle fractionation experiments that Cytc1 accumulates in the chloroplast stroma after import (Figure 3A). Accumulation in the soluble intermembrane space, which could not formally be ruled out in those experiments, would have led to a different fluorescence pattern, notably to a kind of halo around the organelles. Together, these findings prove that the transit peptide of Cytc1 is able to interact with the protein transport machineries of both mitochondria and plastids within living cells and that it is capable of targeting passenger proteins into both endosymbiotic organelles also *in vivo*.

Cytc1 Is Found in Both Mitochondria and Chloroplasts of Pea, Spinach, and Potato

Final proof that the observed transport of Cytc1 into chloroplasts reflects the authentic situation in plant cells was obtained from Western analysis. For this purpose, the precursor protein of Cytc1 from potato was overexpressed in *E. coli*, purified to homogeneity, and utilized for immunization of rabbits. The resulting polyclonal antiserum was applied in Western analyses of mitochondrial and chloroplast proteins from pea and spinach. For comparison, an aliquot of the overexpressed Cytc1 precursor was loaded as the antigen control.

In mitochondria of both pea and spinach, an immunoreactive protein of approximately 27 kDa can be detected (Figure 5A). This corresponds well to the size expected for mature mitochondrial Cytc1, demonstrating that the antiserum is suitable to

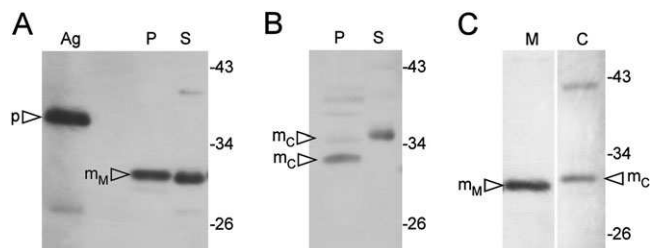


Figure 5. Western Analysis of Isolated Organelles.

Total protein extracts from mitochondria ((A) corresponding to 10 μ g protein) or chloroplasts ((B) corresponding to 7.5 μ g chlorophyll) isolated from either pea (P) or spinach (S) were separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes, and subjected to Western analysis employing antiserum raised against the precursor of Cytc1 from potato. In lane Ag, 0.2 μ g of the antigen used for immunization were loaded. The immunoblots were developed by ECL and visualized by fluorography. In panel (C), mitochondrial (M) and chloroplast proteins (C) from potato were analyzed. For further details, see the legend to Figure 1.

detect the homologous proteins from pea and spinach. In addition, even in both chloroplast fractions, specific cross-reactivity is observed (Figure 5B), which is absent if the Western membranes are developed with pre-immune serum (data not shown). The apparent molecular weight of Cytc1 detected in these chloroplasts shows in both species the same tendency as in the *in organello* transport assays, namely the proteins are intermediate in size between the precursor and the mitochondrial processing products. In order to prevent any misinterpretation caused by the analysis of heterologous organelles, the experiment was repeated also with mitochondria and chloroplasts isolated from potato. Again, the antiserum shows cross-reactivity to proteins of the expected molecular weight not only in mitochondria, but also in chloroplasts (Figure 5C), which finally confirms the conclusion that Cytc1 is present in both endosymbiotic organelles.

DISCUSSION

Transport and sub-cellular localization of Cytc1 from potato were analyzed by combining three independent and complementing approaches, notably *in organello* protein transport studies with isolated organelles, transient expression of fluorescent Cytc1-reporter fusions after biolistic transformation of leaf cells, and Western analysis of mitochondria and chloroplasts. In all our experiments, dual localization of Cytc1 in both mitochondria and chloroplasts was observed. The transit peptide of cytochrome c_1 from potato was suggested to be of unusual origin, namely that it was presumably obtained by exon shuffling from cytosolic GAP-DH (Long et al., 1996). It might thus be suspected that the dual targeting properties observed are in fact restricted to the potato protein. However, *in organello* protein transport experiments performed with one of the two Cytc1 homologs from *Arabidopsis thaliana* (At5g40810) demonstrated that also this protein shows dual targeting into

both mitochondria and chloroplasts (Supplemental Figure 1), though at low rates only. Furthermore, both this protein and its paralog At3g27240 have recently been identified in proteome analyses of chloroplasts isolated from an *albino* mutant of *Arabidopsis thaliana* (Sacha Baginsky, personal communication). Thus, a merely artificial import of potato Cytc1 caused by the combination of a mitochondrial transit peptide of unusual origin with heterologous organelles can almost certainly be ruled out. Instead, dual targeting of cytochrome c_1 seems to be a general property of this plant protein.

Organelle Import and Localization of Cytc1

Like most nuclear-encoded mitochondrial proteins, Cytc1 from potato depends for its import into the organelle on the electrochemical gradient across the inner envelope membrane (Figure 2A). Thus, it behaves like a typical nuclear-encoded mitochondrial protein with respect to the mechanism of mitochondrial protein import. Likewise, also the import of Cytc1 into chloroplasts proceeds apparently along the general transport pathway for nuclear-encoded chloroplast proteins, because it is inhibited in the presence of the protonophore nigericin (Figure 2B) and is furthermore affected by saturating amounts of the FNR precursor protein. This demonstrates that Cytc1 competes with typical chloroplast precursors for limiting components of the chloroplast import apparatus and suggests that the general protein import machinery rather than an exceptional pathway is used by dual targeted proteins.

Within the two organelles, Cytc1 accumulates in different compartments, though. As expected, Cytc1 is found in the membrane fraction after import into mitochondria (Figure 3A), in line with its function as an integral component of respiratory complex III of the inner mitochondrial membrane. In contrast, after import into chloroplasts, Cytc1 accumulates predominantly in the stroma rather than in the thylakoid or envelope membranes, as might have been expected, considering the C-terminal membrane anchor domain of the protein (Braun et al., 1992). This suggests either a rather strict selectivity of the (conservative) protein sorting and transport machinery inside the chloroplast, in contrast to the apparently more relaxed substrate selectivity of the protein import apparatus present in the envelope membranes (which developed after cyanobacterial endosymbiosis), or a lack of function of the C-terminal membrane anchor within this type of organelle.

Another difference concerns the processing of the Cytc1 precursor protein within the two organelles. After *in organello* import of either the authentic precursor or the chimeric fusion protein and even in the Western experiments analyzing organelle proteins, it becomes evident that the size of the terminal processing products differs between mitochondria and chloroplasts, demonstrating that processing takes place at different positions within the precursor protein. In each case, the chloroplast protein shows reduced mobility upon SDS-PAGE in comparison to that of its mitochondrial counterpart (Figures 1–5). A similar result was described for two aminoacyl-tRNA synthetases of *Arabidopsis thaliana*, which likewise show different processing

within the two organelles (Pujol et al., 2007), while in other instances, the terminal processing products accumulating after import in mitochondria and chloroplasts have the same apparent molecular mass (e.g. Rudhe et al., 2004). So far, it can only be speculated which organellar enzymes are involved in the respective processing events. Considering the results described for yeast and *Neurospora crassa* (Ohashi et al., 1982; Hartl et al., 1987), it could be suspected that also in plant mitochondria, matrix processing peptidase (MPP) and inner membrane protease (IMP) are responsible for processing of the Cyt_c1 precursor. However, such two-step maturation is not obligatory for Cyt_c1 from all species (Kolarov and Nelson, 1984; Tanaka-Yamamoto et al., 1990), and our time-course experiments do not provide any evidence for two consecutive processing events (Figure 1B). Within chloroplasts, stromal processing peptidase (SPP; Richter et al., 2005) is the obvious candidate for the cleavage reaction, particularly since processing of mitochondrial precursor proteins by isolated SPP has already been demonstrated (Bassham et al., 1994).

Cyt_c1 Has No Obvious Function in Chloroplasts

Cyt_c1 is not only imported into chloroplasts, but shows furthermore remarkable stability within this organelle (Figure 3B) leading to substantial steady-state levels (Figure 5). Despite that, a function of Cyt_c1 within plastids cannot easily be attributed. The protein does not bind to the thylakoid membrane and a role in photosynthetic electron transport, analogously to its role in the respiratory electron transport chain, thus appears unlikely. Its involvement in other types of redox reactions taking place in the stroma is possible but remains speculative at this point.

Possibly, though, the search for function is even misleading in this instance. There is no doubt that some proteins with dual targeting properties provide a function in both target organelles. Typical examples are the aminoacyl-tRNA synthetases, which are essential for translation in both endosymbiotic organelles (Small et al., 1999; Duchêne et al., 2005). However, there is no reason to believe that such function is a prerequisite for dual targeting in all instances. It might instead be an evolutionary remnant of the development of transit peptides. The remarkable similarity in amino acid composition of mitochondrial and chloroplast transit peptides (Glaser and Soll, 2004) suggests a common evolutionary origin. Supporting evidence comes from the analysis of dual targeting transit peptides that apparently have features of both mitochondrial and plastid transit peptides (Pujol et al., 2007; Peeters and Small, 2001). And, finally, comparison of mitochondrial transit peptides from plant and non-plant species showed reduced variability among the plant transport signals, which could be indicative of higher selective pressure due to the presence of chloroplasts as a second potential target organelle (Staiger et al., 2009).

Taking this scenario into account, basic dual targeting properties are possibly not an exception among mitochondrial and chloroplast transit peptides. Instead, latent dual targeting could be the case for more, and maybe many, precursor proteins that are so far assumed to be mono-specific. It might be acceptable for the cell as long as the degree of mistargeting into the 'wrong'

organelle is not sufficiently harmful to cause negative selective pressure. In those instances in which the protein provides a function in both organelles, dual targeting properties might allow faster response to changing physiological environments. In all other cases, it might be an option for the cell to develop new functions. An interesting hypothesis was recently provided by Martin (2010), who speculated that the dual targeting phenomenon could play a major role in the as yet not understood mechanism of transferring complete biosynthesis pathways across organelle borders.

METHODS

Plant Material

Pea seedlings (*Pisum sativum* var. Feltham First) were grown on soil for 7–10 d under constant temperature (18–22°C) and a 16-h photoperiod. Potato (*Solanum tuberosum* var. Désirée) was grown under the same conditions and harvested 2–3 weeks after germination. Spinach (*Spinacia oleracea* var. Lina) was grown in hydroponic culture under constant temperature (18–22°C) and light regime (8/16-h light/dark cycles), and harvested 2–3 months after sowing.

Generation of Cyt_c1 Reporter Constructions

For the generation of the reporter constructions, cDNA fragments encoding either the N-terminal 77 residues, the N-terminal 141 residues, or the entire precursor of cytochrome *c*₁ from potato (Braun et al., 1992) were fused in frame with the complete coding sequence of the enhanced yellow fluorescent protein (EYFP, Clontech). The resulting constructions (Cyt_c1(1–77)/EYFP, Cyt_c1(1–141)/EYFP, and Cyt_c1(1–320)/EYFP, respectively) were subsequently cloned with the two plasmid vectors pBAT (Annweiler et al., 1991) and pRT100 Ω /Not/Asc (Überlacker and Werr, 1996) that are suitable for *in vitro* transcription and transient gene expression in plants, respectively.

In Organello Protein Transport Experiments

Radiolabeled precursor proteins obtained by *in vitro* translation in rabbit reticulocyte lysates in the presence of [³⁵S]-methionine were incubated with intact mitochondria or chloroplasts isolated from pea or spinach leaves as described in Rödiger et al. (2010). Mixed assays with both organelles were performed according to Rudhe et al. (2002). Fractionation of mitochondria after import was performed with protease-treated organelles that were pelleted by centrifugation for 10 min at 16 000 *g* and re-suspended in 10 mM HEPES (pH 7.6), 60 mM sucrose, 1 mM PMSF. After three freeze-thaw-cycles with liquid nitrogen, the membrane and soluble fractions were separated by ultracentrifugation for 15 min at 200 000 *g*. Fractionation of chloroplasts after import was performed as detailed in Michl et al. (1994). The envelope fraction was collected by ultracentrifugation of the stromal supernatant for 20 min at 200 000 *g*. Competition experiments were performed as described in Molik et al. (2001).

Sub-Cellular Localization of Reporter Proteins in Plant Tissue

For the transient expression of genes encoding chimeric EYFP reporter proteins, pea leaves were placed onto 2% micro agar plates and bombarded with gold particles coated with the respective reporter gene construct. For each assay, 390 ng of plasmid DNA were precipitated with 2.5 M CaCl₂, 0.1 M spermidine onto 0.2-mg gold particles of 0.6- μ m diameter. The mixture was incubated for 10 min on ice and then used for bombardment of pea leaves. After bombardment, the leaves were incubated in the dark for 14–20 h in a humid chamber and analyzed by confocal laser scanning microscopy (CLSM 510, Carl Zeiss, Jena, Germany). Chlorophyll autofluorescence was excited with the 633-nm line of the HeNe laser, while YFP fluorescence was induced with the 514-nm line of the argon laser. The fluorescence images were collected in red and yellow channels, respectively.

Miscellaneous

Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to Laemmli (1970). The gels were exposed to phosphorimaging screens and analyzed with the Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25) (Raytest, Straubenhardt, Germany). Protein concentration was determined according to Bradford (1976) and chlorophyll concentration according to Arnon (1949). Polyclonal antiserum was raised by Innovagen (Lund, Sweden) against the precursor protein of cytochrome *c*₁ obtained by heterologous overexpression in *E. coli* (Michl et al., 1994). Western analysis was carried out as described by Jakob et al. (2009). All other methods followed published protocols (Sambrook and Russell, 2001).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary data are available at *Molecular Plant Online*.

FUNDING

This work was supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 648) and the state Sachsen-Anhalt (Exzellenznetzwerk Biowissenschaften).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Stefanie Max and Mario Jakob for the help with the Western analysis and Sacha Baginsky for making proteome data available prior to publication. No conflict of interest declared.

REFERENCES

- Annweiler, A., Hipskind, R.A., and Wirth, T. (1991). A strategy for efficient *in vitro* translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3750.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1–15.
- Balsera, M., Soll, J., and Bolter, B. (2009). Protein import machineries in endosymbiotic organelles. *Cell Mol. Life Sci.* **66**, 1903–1923.
- Bassham, D.C., Creighton, A.M., Arretz, M., Brunner, M., and Robinson, C. (1994). Efficient but aberrant cleavage of mitochondrial precursor proteins by the chloroplast stromal processing peptidase. *Eur. J. Biochem.* **221**, 523–528.
- Berglund, A.K., Spänning, E., Biverstahl, H., Maddalo, G., Tellgren-Roth, C., Mäler, L., and Glaser, E. (2009). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts: characterization of Thr-tRNA synthetase targeting peptide. *Mol. Plant.* **2**, 1298–1309.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruft, V., and Schmitz, U.K. (1992). Cytochrome *c*₁ from potato: a protein with a presequence for targeting to the mitochondrial intermembrane space. *Mol. Gen. Genet.* **231**, 217–225.
- Carrie, C., Giraud, E., and Whelan, J. (2009). Protein transport in organelles: dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS J.* **276**, 1187–1195.
- Clausmeyer, S., Klösgen, R.B., and 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. *J. Biol. Chem.* **268**, 13869–13876.
- Cleary, S.P., et al. (2002). Isolated plant mitochondria import chloroplast precursor proteins *in vitro* with the same efficiency as chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **277**, 5562–5569.
- Duchêne, A.M., et al. (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **102**, 16484–16489.
- Emmermann, M., et al. (1994). Molecular features, processing and import of the Rieske iron-sulfur protein from potato mitochondria. *Plant Mol. Biol.* **25**, 271–281.
- Flügge, U.I., and Hinz, G. (1986). Energy dependence of protein translocation into chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **160**, 563–570.
- Glaser, E., and Soll, J. (2004). Targeting signals and import machinery of plastids and plants mitochondria. In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles: Chloroplasts and Mitochondria*, Daniell H. and Chase C., eds (Kluwer Academic Publishers: Springer, Dordrecht), pp. 385–418.
- Grossman, A., Bartlett, S., and Chua, N.-H. (1980). Energy-dependent uptake of cytoplasmically synthesized polypeptides by chloroplasts. *Nature.* **285**, 625–628.
- Halperin, T., and Adam, Z. (1996). Degradation of mistargeted OEE33 in the chloroplast stroma. *Plant Mol. Biol.* **30**, 925–933.
- Hartl, F.U., Ostermann, J., Guiard, B., and Neupert, W. (1987). Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell.* **51**, 1027–1037.
- Jakob, M., Kaiser, S., Gutensohn, M., Hanner, P., and Klösgen, R.B. (2009). Tat subunit stoichiometry in *Arabidopsis thaliana* challenges the proposed function of TatA as the translocation pore. *Biochim. Biophys. Acta.* **1793**, 388–394.
- Jansen, T., Reidner, H., Steppuhn, J., and Herrmann, R. (1988). Analysis of cDNA clones encoding the entire precursor-polypeptide for

- ferredoxin: NADP⁺ oxidoreductase from spinach. *Current Genetics*. **13**, 517–522.
- Jarvis, P. (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol.* **179**, 257–285.
- Klein, T.M., Wolf, E.D., Wu, R., and Sanford, J.C. (1987). High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature*. **327**, 70–73.
- Kolarov, J., and Nelson, B.D. (1984). Import and processing of cytochrome *b-c*₁ complex subunits in isolated hepatoma ascites cells: inhibition by Rhodamine 6G. *Eur. J. Biochem.* **144**, 387–392.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. **227**, 680–685.
- Levitan, A., Trebitsh, T., Kiss, V., Pereg, Y., Dangoor, I., and Danon, A. (2005). Dual targeting of the protein disulfide isomerase RB60 to the chloroplast and the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **102**, 6225–6230.
- Long, M., de Souza, S.J., Rosenberg, C., and Gilbert, W. (1996). Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome *c*₁ precursor. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **93**, 7727–7731.
- Madueno, F., Napier, J.A., and Gray, J.C. (1993). Newly imported Rieske iron-sulfur protein associates with both Cpn60 and Hsp70 in the chloroplast stroma. *Plant Cell*. **5**, 1865–1876.
- Martin, W. (2010). Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **365**, 847–855.
- May, T., and Soll, J. (2000). 14–3–3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell*. **12**, 53–64.
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J.B., Herrmann, R.G., and Klösgen, R.B. (1994). Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CFoll is imported by a novel, third pathway. *EMBO J.* **13**, 1310–1317.
- Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R.G., and Klösgen, R.B. (2001). The Rieske Fe/S protein of the cytochrome *b6/f* complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J. Biol. Chem.* **276**, 42761–42766.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 723–749.
- Ohashi, A., Gibson, J., Gregor, I., and Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria: the precursor of cytochrome *c*₁ is processed in two steps, one of them heme-dependent. *J. Biol. Chem.* **257**, 13042–13047.
- Omasa, K., Konishi, A., Tamura, H., and Hosoi, F. (2009). 3D Confocal laser scanning microscopy for the analysis of chlorophyll fluorescence parameters of chloroplasts in intact leaf tissues. *Plant Cell Physiol.* **50**, 90–105.
- Peeters, N., and Small, I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1541**, 54–63.
- Pujol, C., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.M. (2007). How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? *In silico* analysis and mutagenesis approach. *J. Mol. Biol.* **369**, 356–367.
- Richter, S., Zhong, R., and Lamppa, G. (2005). Function of the stromal processing peptidase in the chloroplast import pathway. *Physiologia Plantarum.* **123**, 362–368.
- Rödiger, A., Baudisch, B., and Klösgen, R.B. (2010). Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *J. Plant Physiol.* **167**, 620–624.
- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J., and Glaser, E. (2002). A novel *in vitro* system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J.* **30**, 213–220.
- Rudhe, C., et al. (2004). Processing of the dual targeted precursor protein of glutathione reductase in mitochondria and chloroplasts. *J. Mol. Biol.* **343**, 639–647.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schleyer, M., Schmidt, B., and Neupert, W. (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **125**, 109–116.
- Small, I., et al. (1999). The strange evolutionary history of plant mitochondrial tRNAs and their aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Hered.* **90**, 333–337.
- Staiger, C., Hinneburg, A., and Klösgen, R.B. (2009). Diversity in degrees of freedom of mitochondrial transit peptides. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1773–1780.
- Tanaka-Yamamoto, T., Nishikimi, M., and Ozawa, T. (1990). *In vitro* processing of the precursor to human mitochondrial cytochrome *c*₁. *Biochim. Biophys. Acta.* **1019**, 257–260.
- Teintze, M., Slaughter, M., Weiss, H., and Neupert, W. (1982). Biogenesis of mitochondrial ubiquinol:cytochrome *c* reductase (cytochrome *bc*₁ complex): precursor proteins and their transfer into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 10364–10371.
- Überlacker, B., and Werr, W. (1996). Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Molecular Breeding.* **2**, 293–295.
- von Heijne, G., Steppuhn, J., and Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**, 535–545.
- Waegemann, K., and Soll, J. (1996). Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* **271**, 6545–6554.
- Zhang, X.C., and Hu, J.P. (2008). FISION1A and FISION1B proteins mediate the fission of peroxisomes and mitochondria in *Arabidopsis*. *Mol. Plant.* **1**, 1036–1047.

SUPPLEMENTARY DATA

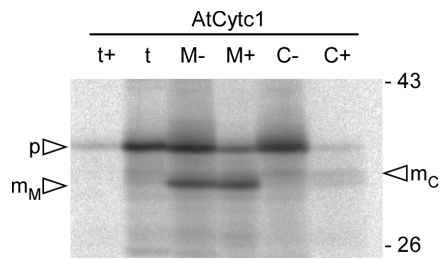


Figure S1. *In organello* protein transport experiments of cytochrome c_1 from *Arabidopsis thaliana* (*AtCytc1*) into organelles isolated from pea. In lane *t+*, an aliquot of the *in vitro* translation assay treated with thermolysin was loaded. For further details, see the legend to Figure 1.

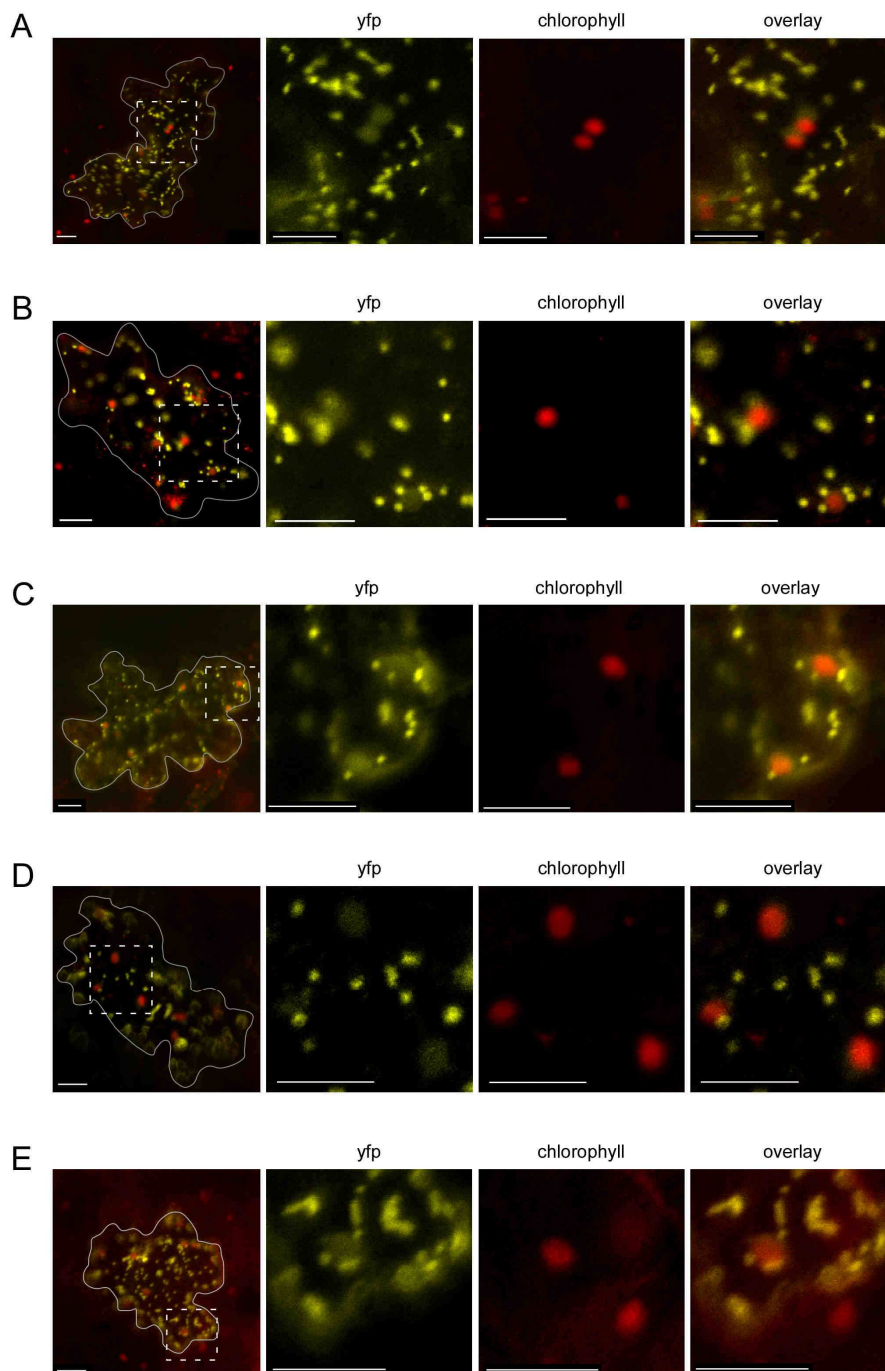


Figure S2. Subcellular localisation of Cytc1(1-77)/EYFP (**A, B, C**), Cytc1(1-141)/EYFP (**D**), and Cytc1(1-320)/EYFP (**E**) in plant cells. The respective coding sequences were transiently expressed under the control of the 35S CaMV promoter after biolistic transformation of leaf epidermis cells of pea and analysed by confocal laser scanning microscopy. For further details, see the legend to Figure 4.

KAPITEL 3

3 Die duale Lokalisierung einer Prozessierungspeptidase wird durch ein Transitpeptid mit ungewöhnlicher Architektur vermittelt

3.1 Zusammenfassung

In *A. thaliana* sind zwei Isoformen der α -MPP sowie die β -MPP im Kerngenom codiert. Sowohl die α - als auch die β -Untereinheit sind in Pflanzen häufig in verschiedenen Isoformen anzutreffen (Braun et al., 1992^a; Emmermann et al., 1994; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995). Beide Untereinheiten sind in den *bcl*-Komplex der inneren Mitochondrienmembran integriert und essentiell für die Prozessierung mitochondrieller Proteine (siehe Einleitung, Abschnitt 4.3). Folglich werden die Untereinheiten der α -MPP vom Synthesort im Cytosol in die Mitochondrien transportiert. Für eine Untereinheit der MPP, die α -MPP2, haben unterschiedliche Programme zur Berechnung der wahrscheinlichen subzellulären Lokalisierung zusätzlich zu dem erwarteten Transport in die Mitochondrien auch eine hohe Wahrscheinlichkeit für den Transport in die Chloroplasten ermittelt. Tatsächlich wird die α -MPP2 in isolierte Mitochondrien und darüber hinaus in isolierte Chloroplasten transportiert, sowohl wenn beide Organellen jeweils einzeln oder zusammen diesem Substrat angeboten werden. Demzufolge ist der Transport in die Chloroplasten nicht durch die Abwesenheit des authentischen Organells verursacht sondern eine Eigenschaft der α -MPP2. Der Transport in die Organellen erfolgt über Komponenten des generellen Importweges. Die analog zum Cyt1 durchgeführten Konkurrenzexperimente belegen, dass durch Zugabe von überexprimierten OEC33 der Import der α -MPP2 in die Chloroplasten spezifisch und stufenweise verringert wird und somit der plastidäre Transport über Teile des TOC/TIC-Apparates verläuft. Der Importweg in die Mitochondrien wurde mit überexprimierten Cyt1 abgesättigt, da kein monospezifischer mitochondrieller Kompetitor in den dafür notwendigen Konzentrationen zur Verfügung stand. In Gegenwart des überexprimierten Cyt1 wird erwartungsgemäß der Import der α -MPP2 in beide Organellen sequentiell reduziert. Mit Hilfe von Fraktionierungsexperimenten nach erfolgtem Import ist α -MPP2 in den Mitochondrien teilweise in der Membranfraktion zu detektieren, der restliche Anteil verbleibt in der Matrix wohingegen innerhalb der Chloroplasten das Protein ausschließlich im Stroma akkumuliert.

Komplementierend zu den *in organello* Transportexperimenten wurden *in vivo* Analysen durchgeführt. Dazu war es zunächst notwendig chimäre Reporterproteine zu konstruieren um eine Detektion des transportierten Proteins in der Zelle zu gewährleisten. Da die Größe des Transitpeptides der α -MPP2 nicht bekannt ist, wurde zunächst die codierende Sequenz von vier verschiedenen N-terminalen Bereichen der α -MPP2 (1-66 aa, 1-79 aa, 1-100 aa, 1-150 aa) vor die codierende Sequenz für EYFP fusioniert (MPP(1-66)/EYFP, MPP(1-79)/EYFP, MPP(1-100)/EYFP, MPP(1-150)/EYFP). Um mögliche Veränderungen des Transportverhaltens, verursacht durch den Reporter EYFP, auszuschließen wurden diese chimären Reporterproteine zunächst mittels *in organello* Transportexperimenten analysiert. Es zeigt sich, dass den Reporterkonstruktionen ab einer Länge von 79 Aminosäuren die Fähigkeit zum dualen Transport erhalten bleibt. Demzufolge umfasst dieser Bereich das vollständigen Transitpeptid, dass für den Transport in die Mitochondrien und Chloroplasten essentiell ist. Diese chimären Reporterproteine werden nach dem Transport in das Organell prozessiert, was demonstriert, dass in

diesen Reporterkonstruktionen die Erkennungsstellen für die organelleigenen Prozessierungspeptidasen enthalten sind. Im Gegensatz dazu zeigt das chimäre Reporterprotein mit N-terminal 66 Aminosäuren einen Import ausschließlich in die Mitochondrien. Folglich ist die Information für den Transport in die Chloroplasten in diesem N-terminalen Bereich nicht mehr enthalten. Diese Ergebnisse konnte mit Hilfe der *in vivo* Studien nach biolistischer Transformation von Blattgewebe mit den jeweiligen Reporterkonstruktionen bestätigt werden. Die vier verschiedenen chimären Reporterproteine zeigen in der Analyse mittels CLSM eine Markierung der Mitochondrien in den transformierten Zellen. Die Zellen, die die Reporterkonstruktionen MPP(1-79)/EYFP, MPP(1-100)/EYFP, MPP(1-150)/EYFP transient exprimieren zeigen zusätzlich eine Co-Lokalisierung mit Chlorophyll. Diese Co-Lokalisierung ist in Zellen, die MPP(1-66)/EYFP exprimieren nicht zu detektieren. Demzufolge dirigieren die 66 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs der α -MPP2 das EYFP ausschließlich zu den Mitochondrien wohingegen der Transport in die Chloroplasten erst durch einen zusätzlichen Bereich von 13 Aminosäuren ermöglicht wird.

Da das duale Transportverhalten offensichtlich von der Länge des N-terminalen Bereichs abhängt wurde ein weiteres chimäres Reporterprotein konstruiert, das nur 29 Aminosäuren des N-terminalen Bereichs der α -MPP2 umfasst (MPP(1-29)/EYFP). Das Fragment von 29 Aminosäuren enthält mutmaßlich eine amphipathische α -Helix, die charakteristisch für mitochondrielle Transitpeptide ist (siehe Einleitung, Abschnitt 2) sowie die vorhergesagte Spaltstelle für die mitochondrielle Prozessierungspeptidase. Untersuchungen unter Verwendung des CLSM zeigen eine Markierung der Mitochondrien in den transformierten Zellen. Allerdings kann in den komplementierenden *in organello* Transportexperimenten ein Import in die Mitochondrien nicht nachgewiesen werden. Stattdessen ist lediglich eine Bindung an das Organell zu detektieren. Somit sind die markierten Mitochondrien *in vivo* eher das Resultat einer Bindung statt eines Imports in das Organell. Demzufolge ist der Bereich von 29 Aminosäuren mit hoher Wahrscheinlichkeit zwar essentiell für die Bindung an die Mitochondrien aber nicht ausreichend für die Translokation über die mitochondriellen Hüllmembranen.

Basierend auf den bisherigen Ergebnissen ist der Abschnitt von Aminosäure 1-29 notwendig für die Bindung an die Mitochondrien wohingegen für die Translokation in die Mitochondrien weitere 37 Aminosäuren essentiell sind. Der Bereich, der die Positionen 67-79 umfasst, ermöglicht zusätzlich einen Transport in die Chloroplasten. Demzufolge könnte das Transitpeptid in einer tandemartigen Struktur organisiert sein, wobei der vordere Abschnitt (1 - maximal 66 aa) für eine Sortierung in die Mitochondrien und der daran anschließende Bereich für einen Transfer zu den Chloroplasten verantwortlich ist. Damit übereinstimmend zeigen Analysen mittels TargetP (Emanuelsson et al., 2000, 2007), ein Programm zur Vorhersage der wahrscheinlichen subzellulären Lokalisierung, im Bereich 1-29 aa eine wahrscheinliche Lokalisierung ausschließlich in den Mitochondrien wohingegen der daran angrenzende Bereich 30-79 aa eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine Lokalisierung ausschließlich in den Chloroplasten aufweist. Ein tandemartiger Aufbau wurde bereits für einige duale Proteine beschrieben (siehe Einleitung, Abschnitt 5.2). Um diese Annahme näher zu beleuchten wurden drei weitere chimäre Reporterkonstruktionen erstellt, denen der vordere mitochondrielle Bereich (2-29 aa) fehlt (MPP(30-66)/EYFP, MPP(30-79)/EYFP, MPP(30-100)/EYFP) und mit den bereits beschriebenen *in organello* und *in*

in vivo Transportexperimenten untersucht. Entgegen den Erwartungen zeigen die Ergebnisse mit beiden Analysesystemen weder einen Transport in die Plastiden, noch eine intrazelluläre Sortierung der drei Reporterkonstruktionen. Stattdessen ist lediglich eine Akkumulation der EYFP-Fluoreszenz im Cytosol *in vivo* nachweisbar. Der Bereich von 2-29 aa ist somit essentiell sowohl für den mitochondriellen als auch für den plastidären Transport. Demzufolge existieren funktionell überlappende Bereiche im Transitpeptid der α -MPP2 für den Transport in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten. Somit lässt sich eine Tandemstruktur mit zwei unabhängigen, separaten Domänen ausschließen. Vielmehr ist das Transitpeptid der α -MPP2 komplexer organisiert als bisher für duale Proteine beschrieben wurde: die Information für den mitochondriellen Import ist im Bereich 1-66 festgelegt, einschließlich einer Domäne für den Transfer des Proteins zu und Bindung an die Mitochondrien (Abschnitt 1-29), wohingegen das Transportsignal für die Chloroplasten einen längeren Abschnitt umfasst, das den gesamten Bereich für den mitochondriellen Transport einschließt und darüber hinaus noch weitere 13 Aminosäuren benötigt um die Transportspezifität auf die Chloroplasten zu erweitern. Diesen Ergebnissen entsprechend wurde ein drei Domänen-Modell für das Transitpeptid der α -MPP2 postuliert, wobei Domäne I den Transfer zu den Mitochondrien sicherstellt (Bereich 1-29), Domäne II (Abschnitt 30-66) für den Import in das Organell verantwortlich ist und Domäne III (67-79 Aminosäuren) die Transportspezifität der α -MPP2 so verändert und erweitert, dass Chloroplasten als weiteres Ziel erkannt werden.

3.2 Artikel

Dual Targeting of a Processing Peptidase into Both Endosymbiotic Organelles Mediated by a Transport Signal of Unusual Architecture

Bianca Baudisch and Ralf Bernd Klösigen¹

Institute of Biology–Plant Physiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg, Weinbergweg 10, 06120 Halle/Saale, Germany

ABSTRACT As a result of the endosymbiotic gene transfer, the majority of proteins of mitochondria and chloroplasts are encoded in the nucleus and synthesized in the cytosol as precursor proteins carrying N-terminal transport signals for the ‘re-import’ into the respective target organelle. Most of these transport signals are monospecific, although some of them have dual targeting properties, that is, they are recognized both by mitochondria and by chloroplasts as target organelles. We have identified alpha-MPP2, one of the two isoforms of the substrate binding subunit of mitochondrial processing peptidase of *Arabidopsis thaliana*, as a novel member of this class of nuclear-encoded organelle proteins. As demonstrated by *in organello* transport experiments with isolated organelles and by *in vivo* localization studies employing fluorescent chimeric reporter proteins, the N-terminal region of the alpha-MPP2 precursor comprises transport signals for the import into mitochondria as well as into chloroplasts. Both signals are found within the N-terminal 79 residues of the precursor protein, where they occupy partly separated and partly overlapping regions. Deletion mapping combined with *in organello* and *in vivo* protein transport studies demonstrate an unusual architecture of this transport signal, suggesting a composition of three functionally separated domains.

Key words: Protein transport; dual targeting; mitochondria; chloroplasts; mitochondrial processing peptidase.

INTRODUCTION

Plant cells contain two types of endosymbiotic organelles: mitochondria and plastids. As a consequence of the endosymbiotic gene transfer, the majority of organellar proteins is in both cases encoded in the nucleus and post-translationally ‘re-imported’ into the respective target organelle. For this purpose, the proteins are synthesized in the cytosol as precursor polypeptides carrying N-terminal transport signals called transit peptides or presequences. While, in most instances, these transport signals are specific for either chloroplasts or mitochondria, a number of proteins have been identified in the past years that are imported into both endosymbiotic organelles.

In some cases, the corresponding genes encode two targeting signals with different organelle specificity, which, due to transcriptional or post-transcriptional mechanisms, are differentially exposed at the N-terminus of the respective precursor protein (Peeters and Small, 2001). Alternatively, dual targeting can be obtained by transit peptides with ambiguous organelle specificity, which are recognized by the protein import machineries of both organelles (Berglund et al., 2009a). The first examples for the latter case described in the literature were glutathione reductase (Creissen et al., 1995) and aminoacyl-tRNA synthetases (Akashi et al., 1998; Menand et al., 1998; summarized in Small

et al., 1999) but, since then, a number of further proteins have been added to this list (e.g. Carrie et al., 2009; Morgante et al., 2009). It is still unknown by which features such ambiguous targeting signals are characterized but the overall similar amino acid composition of mitochondrial and chloroplastic transit peptides (von Heijne et al., 1989; Glaser and Soll, 2004) suggests that close evolutionary relationship might be one of the causes for dual targeting (Staiger et al., 2009).

After import into the target organelle, the transit peptide is usually removed by an organellar processing peptidase, notably by the stromal processing peptidase of chloroplasts (SPP; Richter et al., 2005) or the mitochondrial processing peptidase (MPP; reviewed in Glaser et al., 1996), which both belong to the M16 metallopeptidase family (Rawlings and Barrett, 1993). While SPP activity is provided by a single polypeptide,

¹ To whom correspondence should be addressed. E-mail klosigen@pflanzenphys.uni-halle.de, tel. + 49-345-55 26 200, fax + 49-345-55 27 285.

© The Author 2011. Published by the Molecular Plant Shanghai Editorial Office in association with Oxford University Press on behalf of CSPB and IPPE, SIBS, CAS.

doi: 10.1093/mp/ssr092, Advance Access publication 29 November 2011
Received 26 August 2011; accepted 6 November 2011

MPP consists of two subunits called alpha-MPP and beta-MPP. Depending on the organism, MPP is found soluble in the mitochondrial matrix, as in yeast or rat (Böhni et al., 1983; Yang et al., 1988; Ou et al., 1989), or as a constituent of the cytochrome *bc₁*-complex of the inner mitochondrial membrane, as in plants (Braun et al., 1992; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995). For *Neurospora crassa*, even a mixed topology was described, that is, a fully active alpha-/beta-MPP complex in the matrix and a partially active Core2/beta-MPP complex associated with cytochrome *bc₁*-complex (Hawlitsek et al., 1988; Schulte et al., 1989).

In plants, MPP subunits are often found in several isoforms (Braun et al., 1992; Emmermann et al., 1994; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995). In line with that, the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana* comprises two genes encoding alpha-MPP isoforms with 81% identity on the amino acid level, notably At1g51980 (alpha-MPP1) and At3g16480 (alpha-MPP2), while beta-MPP is encoded by a single gene (At3g02090). *In silico* analysis of their transit peptides with three different prediction programs (*TargetP*, Emanuelsson et al., 2000; *PSORT*, Nakai and Horton, 1999; *Predotar*, Small et al., 2004) suggests that alpha-MPP1 and beta-MPP are transported exclusively into mitochondria, as expected (Table 1). In contrast, *TargetP* and *PSORT* calculate for alpha-MPP2 a similar probability of targeting to either chloroplasts or mitochondria, suggesting that the protein might have dual targeting properties. Considering the potential relevance of dual targeting of an organellar processing enzyme in both functional and evolutionary terms, this prompted us to examine the import specificity of alpha-MPP2 in detail employing *in organello* transport experiments as well as transient *in vivo* expression analyses utilizing suitable fluorescent reporter constructions.

RESULTS

alpha-MPP2 from *Arabidopsis thaliana* Shows Dual Targeting into Isolated Mitochondria and Chloroplasts

As a first step in investigating the organelle targeting specificity of alpha-MPP2, *in organello* protein transport experiments were performed. In such experiments, radiolabeled alpha-MPP2 precursor obtained by *in vitro* translation in rabbit reticulocyte lysates was incubated with freshly isolated mitochondria and

Table 1. *In Silico* Prediction of the Subcellular Localization of the MPP Subunits of *Arabidopsis thaliana*.

Protein	Gene identifier	TargetP*	PSORT*	Predotar*
alpha-MPP1	At1g51980	0.781 (M)	0.898 (M)	0.91 (M)
		0.345 (C)	0.000 (C)	0.00 (C)
alpha-MPP2	At3g16480	0.643 (M)	0.569 (C)	0.81 (M)
		0.575 (C)	0.468 (M)	0.01 (C)
beta-MPP	At3g02090	0.870 (M)	0.920 (M)	0.87 (M)
		0.115 (C)	0.657 (C)	0.00 (C)

M, mitochondrion; C, chloroplast; *, likelihood of organellar transport.

chloroplasts from pea leaves, which were shown earlier by Western and microscopy analyses to be basically free from mutual cross-contamination (Rödiger et al., 2010). As expected, the precursor protein of 55 kDa is efficiently imported into mitochondria and cleaved to its mature size of approximately 51 kDa (Figure 1A). The processing product is resistant against protease added externally to the organelles after import, demonstrating that the protein was fully internalized by the mitochondria. However, while most nuclear encoded organelle proteins are exclusively imported into a single type of organelle (e.g. Supplemental Figure 1), incubation of the alpha-MPP2 precursor with chloroplasts likewise leads to organellar import of the protein, though at a somewhat lower proportion (Figure 1A). Again, a single processing product is obtained, which has a slightly higher electrophoretic mobility than its mitochondrial counterpart, suggesting cleavage at a different position. The exact size of the chloroplastic processing product cannot be determined, though, because of gel compression in that region caused by the excess amount of a large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Figure 1A). As with mitochondria, the processing product is resistant to externally added protease, confirming that alpha-MPP2 was fully internalized also by the chloroplasts. Such dual targeting of alpha-MPP2 can also be observed when both types of organelles are combined in the same assay (Figure 1A, 'mixed'), which rules out that the chloroplast import observed is in fact caused by unspecific mistargeting in the absence of the authentic target organelle (Rudhe et al., 2002a). Furthermore, since dual targeting of alpha-MPP2 is likewise found also with organelles isolated from spinach (Supplemental Figure 2), it cannot be the consequence either of an inherent lack of specificity of pea organelles that was proclaimed earlier (Cleary et al., 2002).

Within both mitochondria and chloroplasts, alpha-MPP2 accumulates predominantly in the soluble phase after import (Figure 1B). Only in mitochondria, however, significant amounts are additionally found in the membrane fraction, suggesting that some of the imported protein was further transported to its final destination in plant mitochondria, the inner mitochondrial membrane (Braun et al., 1992; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995).

alpha-MPP2 Is Imported by the General Organellar Import Pathways

To determine which pathways are utilized for the import of alpha-MPP2 into the two endosymbiotic organelles, competition experiments were performed. In such experiments, *in organello* import of the candidate protein is analyzed in the presence of increasing amounts of an authentic organellar precursor protein that can be obtained by overexpression in *E. coli*. As a competitor for the general chloroplast import pathway, we have applied pre-OEC33 from spinach, the precursor of the 33-kDa subunit of the oxygen evolving system associated with photosystem II, which was shown already earlier to be well suited for chloroplast-specific import competition (Molik et al., 2001). In the presence of this precursor protein, alpha-MPP2 shows the

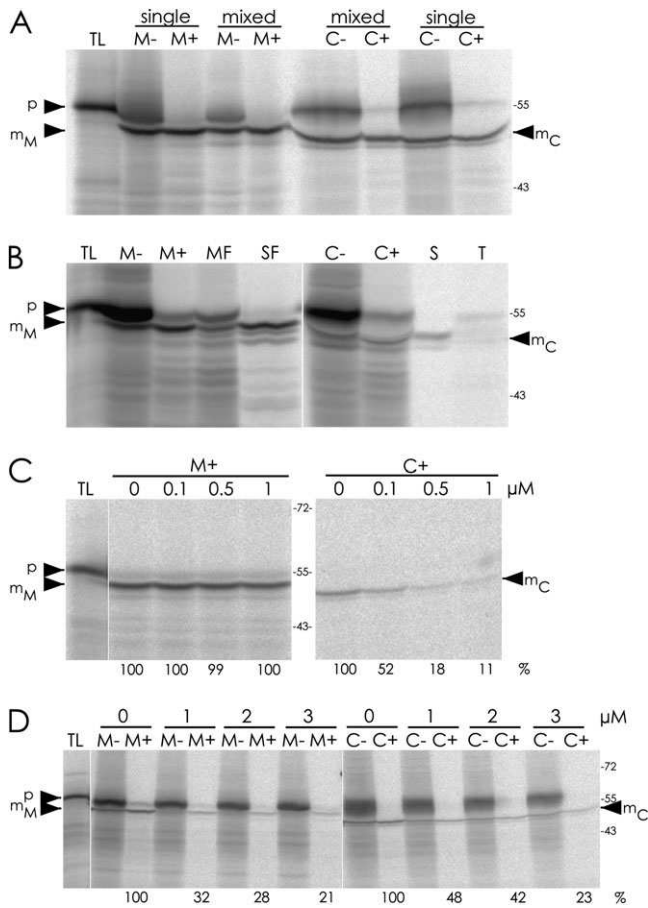


Figure 1. *In Organello* Protein Transport Experiments of alpha-MPP2 with Isolated Pea Organelles.

(A) Radiolabeled precursor of alpha-MPP2 from *Arabidopsis thaliana* was obtained by coupled *in vitro* transcription/translation of the corresponding cDNA clone and incubated for 20 min at 25°C with either intact mitochondria (lanes M) or chloroplasts (lanes C) from pea (single assays). After the import reaction, the organelles were recovered by centrifugation and treated with thermolysin (lanes M+, C+) or mock-treated (lanes M-, C-). In the mixed assays, the isolated mitochondria and chloroplasts were combined prior to incubation with the radiolabeled precursor protein and separated afterwards by centrifugation through a Percoll cushion prior to the thermolysin treatment (Rudhe et al., 2002a). Stoichiometric amounts of each fraction corresponding to 50 μg protein (mitochondria) or 12.5 μg chlorophyll (chloroplasts) were separated on 7.5–12.5% SDS polyacrylamide gradient gel and visualized by phosphorimaging. Aliquots of the *in vitro* translation assays (1 μl, corresponding to 10% of the protein added to each import reaction) were loaded in lanes TL. The position of precursor protein (p) and terminal processing products accumulating in mitochondria (m_M) and chloroplasts (m_C) are indicated by arrowheads. The size of molecular marker proteins is given in kDa.

(B) Protease-treated mitochondria and chloroplasts were fractionated after *in organello* protein transport into either membrane (MF) and soluble fraction (SF), or stroma (S) and thylakoids (T), respectively. Stoichiometric amounts of each organellar subfraction corresponding to mitochondria equivalent to 100 μg protein (lanes MF, SF) or chloroplasts equivalent to 25 μg chlorophyll (lanes S, T) were loaded.

(C, D) Import of alpha-MPP2 in the presence of increasing amounts of pre-OEC33 (C) or pre-Cytc1 (D) that were obtained by overexpression in *E. coli*. The concentration of competitor protein present in

typical competition pattern; that is, with increasing amounts of competitor, the import of alpha-MPP2 into chloroplasts is gradually reduced (Figure 1C). Supplementation of the assays with 0.1 μM competitor protein reduces the import of alpha-MPP2 to approximately 50%, while, in the presence of 1 μM pre-OEC33, import of alpha-MPP2 is almost completely inhibited. Protein import into mitochondria, which was analyzed in parallel, is unaffected under these conditions, confirming that the competitive effect is organelle-specific. Thus, OEC33 and alpha-MPP2 compete for components of the same chloroplast transport machinery, which strongly suggests that they are imported by the same pathway.

For the corresponding experiments with mitochondria, the precursor of cytochrome *c*, of potato (pre-Cytc1) was utilized as a competitor protein that is the only mitochondrial precursor from plants that is available in sufficient amounts required for such experiments. Pre-Cytc1 was recently also shown to possess dual targeting properties (Rödiger et al., 2011); that is, it should be able to compete with alpha-MPP2 for the import into both endosymbiotic organelles. Indeed, with increasing amounts of this competitor protein in the assays, the import of alpha-MPP2 into mitochondria as well as into chloroplasts is gradually reduced (Figure 1D). The degree of competition is similar for the two organelles. In both instances, >50% transport inhibition is obtained in the presence of 1 μM competitor protein. Thus, although the competitive effect is not as strong as with pre-OEC33, it confirms that pre-Cytc1 is a suitable competitor of protein import into both mitochondria and chloroplasts. Furthermore, this result strongly suggests that alpha-MPP2 and cytochrome *c*, utilize identical import pathways into both organelles.

Organelle Specificity Depends on the Length of the alpha-MPP2 Transport Signal

In order to examine the transport specificity of the alpha-MPP2 transit peptide also *in vivo*, several reporter constructs were generated consisting of differently sized N-terminal fragments of the alpha-MPP2 precursor (ranging from 66 to 150 residues) fused to EYFP (*enhanced yellow fluorescent protein*) (Figure 2A). To rule out any influence of the reporter protein on the organelle specificity of the transport process, the chimeric proteins were first analyzed with *in organello* experiments analogous to those described above. It turned out that all precursor proteins comprising the N-terminal 79 amino acids of alpha-MPP2, notably MPP(1–79)/EYFP, MPP(1–100)/EYFP, and MPP(1–150)/EYFP, have retained the property of dual targeting into both mitochondria and chloroplasts in these experiments (Figure 2B–2D). Within the organelles, each precursor is processed to a distinct single product that is protected against

each assay (given in μM) is indicated above the lanes. The relative amounts of translocated protein were quantified (in terms of percentage of the control reaction in the absence of competitor) and are given below the corresponding lanes.

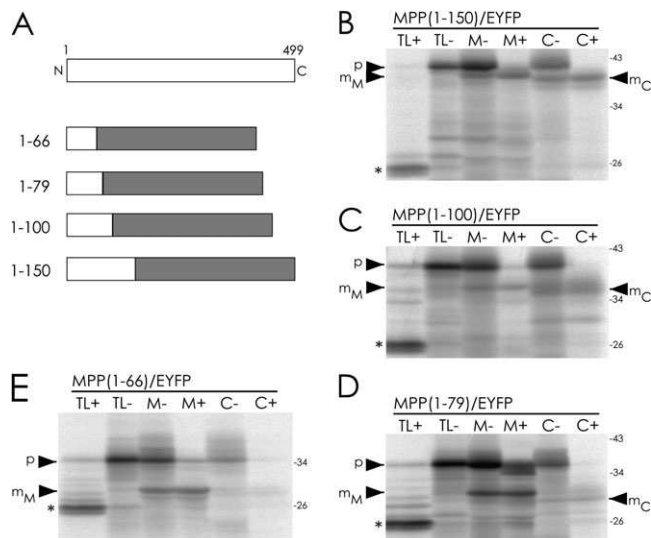


Figure 2. *In Organello* Import of Chimeric Reporter Proteins into Isolated Mitochondria and Chloroplasts.

(A) Schematic representation of the chimeric reporter proteins consisting of N-terminal fragments of alpha-MPP2 (white boxes) fused to EYFP (gray boxes). The residues of the alpha-MPP2 precursor present in each chimera are indicated. The authentic precursor protein is depicted for comparison.

(B–E) *In organello* protein transport of the chimeric reporter proteins shown in (A). In lanes TL+, an aliquot of the *in vitro* translation assays treated with thermolysin was loaded. The asterisk marks a degradation product of approximately 26 kDa, which corresponds to an indicative protease-resistant folded domain. For further details, see the legend to Figure 1.

externally added protease, which confirms complete internalization into the organelles. In line with the results obtained with authentic alpha-MPP2 (Figure 1), the processing products accumulating in mitochondria show in each case a slightly lower electrophoretic mobility than the corresponding products obtained with chloroplasts (Figure 2B–2D), suggesting that both authentic processing sites were retained in these chimeric proteins.

MPP(1–66)/EYFP, however, which only comprises the N-terminal 66 residues of the alpha-MPP2 precursor, was solely imported into mitochondria but not into chloroplasts in such *in organello* experiments (Figure 2E). Minute amounts of a processing product similar in size to that accumulating in mitochondria, which were observed in some instances, are presumably the result of unspecific membrane association of an internal background protein present in the translation assay and can thus not be taken as proof of organellar import. Hence, it must be concluded that the N-terminal 66 residues of the alpha-MPP2 precursor are sufficient to mediate import of the reporter protein into mitochondria but not into chloroplasts.

This conclusion is confirmed by the results of the complementary biolistic transformation experiments in which the chimeric reporter constructions described above were transiently expressed under the control of the 35S CaMV promoter in epidermal cells of pea leaves. Analysis of the subcellular localization of

the fluorescent reporter protein by confocal laser scanning microscopy showed that all four chimeric proteins co-localize with the mitochondria of the transformed cells; that is, they are detectable as highly mobile punctuate structures with a size of approximately 0.5 μm (Figure 3). However, only cells expressing MPP(1–79)/EYFP, MPP(1–100)/EYFP, or MPP(1–150)/EYFP show EYFP fluorescence also in the plastids, as demonstrated by co-localization of the EYFP signal with chlorophyll autofluorescence (Figure 3A–3C; see also Supplemental Figure 3). Such co-localization of EYFP and chlorophyll is not detectable in cells expressing MPP(1–66)/EYFP (Figure 3D). In this case, the EYFP signal is restricted to the mitochondria of the transformed cells, which reconfirms that the 66 N-terminal residues of the alpha-MPP2 precursor are sufficient to mediate protein transport into mitochondria but not into plastids.

The 29 N-terminal Residues of alpha-MPP2 Mediate Mitochondrial Targeting but Not Import

The apparent differences in the critical length of the targeting signals for plastids and mitochondria prompted us to generate a further reporter construction, MPP(1–29)/EYFP, in which EYFP is fused to the 29 N-terminal residues of the alpha-MPP2 precursor. This N-terminal fragment of alpha-MPP2, which comprises a putative amphipathic alpha helix (Figure 4A) indicative of a mitochondrial transit peptide (von Heijne, 1986), is predicted to comprise the entire mitochondrial transit peptide, including the processing site (Claros and Vincens, 1996). In line with that, co-localization of the EYFP signal with mitochondria is observed upon transient expression of this chimeric reporter in epidermal leaf cells of pea (Figure 4B). However, while this result simulates import of the reporter protein into the organelle, the outcome of the complementing *in organello* import experiment is contradictory to that. In this assay, the radiolabeled MPP(1–29)/EYFP precursor is solely capable of binding to isolated mitochondria, but there is no indication of organellar import of the protein, since neither a distinct processing product nor protection against externally added protease is observed (Figure 4C). This strongly suggests that the fluorescence signals obtained after transient expression are the result of mere binding of the chimeric precursor to the mitochondrial envelope rather than of its import into the organelles, although it cannot formally be ruled out at this point that, in this particular case, the transport characteristics of the chimeric protein are slightly divergent *in vitro* and *in vivo*.

Chloroplast Transport Requires the Entire N-terminal Region

The differences in length of the N-terminal alpha-MPP2 fragments required for mitochondrial binding (29 residues), mitochondrial import (66 residues), and chloroplast binding and import (79 residues) (Figures 2–4) might be indicative of a tandem domain architecture of the transit peptide analogous to that proposed for the presequence protease Zn-MP, which, likewise, has dual targeting properties (Bhushan et al., 2003). For this protein, mitochondrial targeting depends on the presence

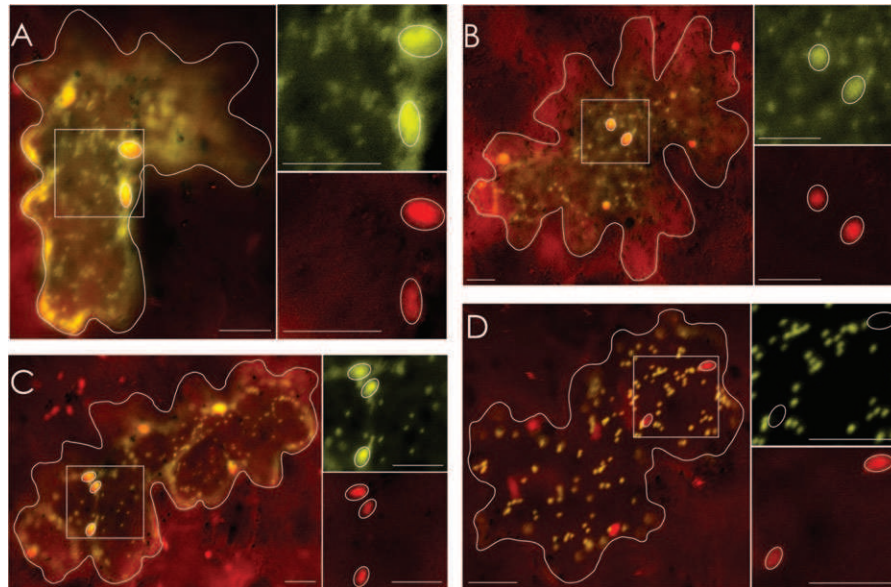


Figure 3. Subcellular Localization of the Chimeric Reporter Proteins in Plant Cells.

The coding sequences of MPP(1–150)/EYFP (A), MPP(1–100)/EYFP (B), MPP(1–79)/EYFP (C), and MPP(1–66)/EYFP (D) were transiently expressed under the control of the 35S CaMV promoter after biolistic transformation of leaf epidermis cells of pea and analyzed by confocal laser scanning microscopy. Overlay pictures of both the YFP channel (displayed in yellow) and the chlorophyll channel (displayed in red) are shown. The borders of the transformed cells are depicted by a continuous white line. The squares highlight areas of the transformed cells that are shown in higher magnification separately for the YFP channel (upper panels) and the chlorophyll channel (lower panels). The position of representative plastids of each cell is encircled for better visualization. The scale bars correspond to 10 μm .

of the N-terminal 28 residues, while the chloroplast targeting function is located within a fragment comprising residues 29–125. In line with that, *in silico* analyses of the N-terminal region of the alpha-MPP2 precursor using the TargetP program predict strictly mitochondrial targeting properties for the N-terminal 29 residues, whereas the adjacent residues 30–79 as well as residues 30–100 are proposed to provide monospecific chloroplast targeting signals (see Supplemental Table 1). Even residues 30–66 are suggested to have chloroplast targeting properties, though with lower statistical significance.

In order to test this prognosis experimentally, we have generated three further reporter constructions, notably MPP(30–66)/EYFP, MPP(30–79)/EYFP, and MPP(30–100)/EYFP, in which EYFP is fused to residues 30–66, 30–79, or 30–100, respectively, of the alpha-MPP2 precursor (Figure 5A). All three coding sequences were supplemented with a translation initiation codon and cloned with the vectors described above for *in vitro* transcription/translation and transient transformation of plant cells.

Unexpectedly, none of the resulting chimeric proteins showed any import into chloroplasts or mitochondria, neither in *in organello* import experiments (Figure 5) nor *in vivo* after transient transformation (Figure 6). Although the precursors show some binding to the envelopes of isolated organelles, neither specific processing products nor protease resistance can be observed in the *in organello* assays (Figure 5B–5D). Likewise, confocal laser scanning microscopy of epidermal leaf cells transiently expressing either of the three reporter constructions

demonstrates strict cytosolic localization of the EYFP reporter (Figure 6). Although local accumulation of the fluorescence signals is sometimes found (e.g. Figure 6C), specific labeling of either mitochondria or chloroplasts cannot be detected. Instead, the position of chloroplasts, which can be detected by chlorophyll autofluorescence, is essentially free of background EYFP fluorescence (see blow-ups of Figure 6), demonstrating that even binding of the chimeric proteins to the chloroplast envelopes is prevented. Thus, in contradiction to the results of the *in silico* analyses, residues 30–100 of the alpha-MPP2 precursor do not comprise sufficient information for binding and/or transport of the EYFP passenger protein to/into chloroplasts. Instead, the N-terminal 29 residues (or, more precisely, residues 2–29) are additionally required for such organelle targeting, which rules out that the transit peptide has a true tandem domain structure with two independent signals for mitochondrial and chloroplast targeting. Instead, the transit peptide of alpha-MPP2 is apparently arranged in an N-terminal mitochondrial import domain of 66 residues, including a mitochondrial targeting and binding region (1–29) and a larger chloroplast transit peptide that encloses the entire mitochondrial transport signal and further supplements it at the C-terminus with a set of additional residues that expand the targeting specificity.

DISCUSSION

In this study, we have identified alpha-MPP2, one of the two isoforms of the substrate binding subunit of the mitochondrial

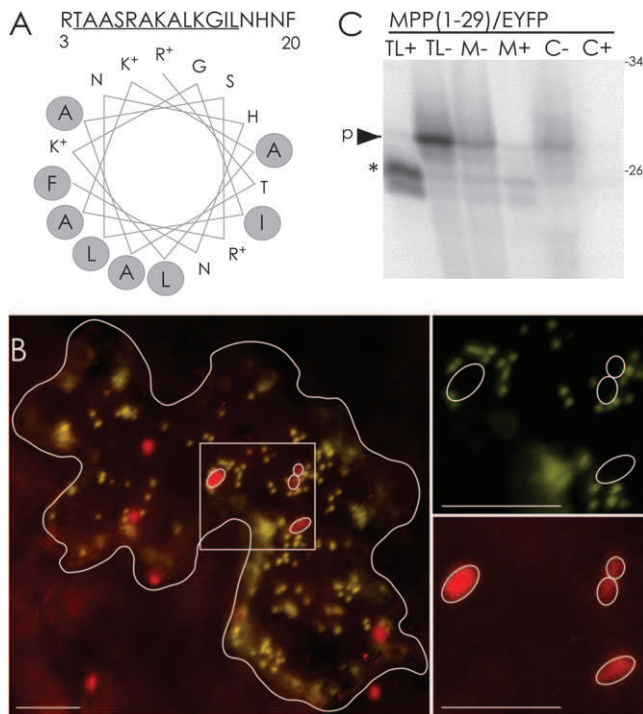


Figure 4. Targeting Specificity of MPP(1–29)/EYFP.

(A) A helical wheel projection of the presumed amphipathic alpha helix found within the N-terminal region of the alpha-MPP2 precursor is shown. The projection of the amino acid sequence from position 3 to position 20 was performed by using the Helical Wheel Applet, available online at <http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheel/wheelApp.html>. Hydrophobic residues are circled and shaded in gray. (B) The coding sequence of MPP(1–29)/EYFP was transiently expressed under the control of 35S CaMV promoter after biolistic transformation of leaf epidermis cells of pea and analyzed by confocal laser scanning microscopy. For further details, see the legend to Figure 3. (C) *In organello* protein transport experiments with MPP(1–29)/EYFP. For further details, see the legend to Figure 1.

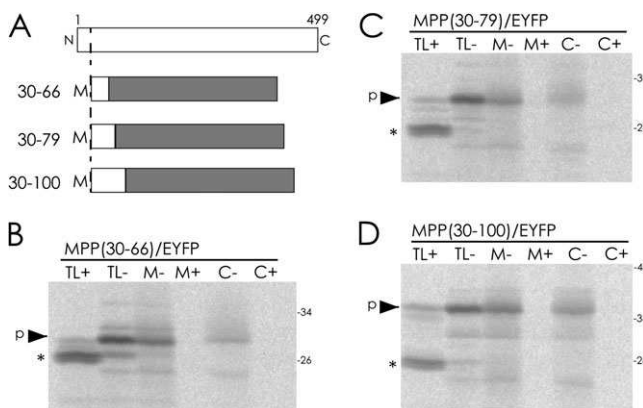


Figure 5. *In Organello* Protein Transport Experiments with N-terminal Deletion Derivatives of Chimeric alpha-MPP2 Reporter Proteins.

(A) Schematic representation of the chimeric reporter proteins analyzed here. (B–D) *In organello* protein transport of the chimeric reporter proteins shown in (A). For further details, see the legends to Figures 1 and 2.

processing peptidase of *Arabidopsis thaliana* (Yang et al., 1991), as a novel member of the class of nuclear encoded proteins carrying transit peptides with dual targeting properties. As demonstrated by *in organello* transport experiments with isolated organelles and also by *in vivo* localization studies employing fluorescent chimeric reporter proteins, the N-terminal region of the alpha-MPP2 precursor protein comprises transport signals for import into both mitochondria and chloroplasts. Both signals are found within the N-terminal 79 residues of the precursor protein where they occupy partly separated and partly overlapping regions.

Architecture of the alpha-MPP2 Transit Peptide

One obvious result of the import experiments with the chimeric reporter constructions is that the targeting signals required for mitochondrial or chloroplast import of the EYFP passenger are different in size. While the N-terminal 66 residues of the alpha-MPP2 precursor are sufficient to import the passenger protein into mitochondria, at least 79 residues are necessary to additionally mediate its chloroplast transport (Figures 2 and 3). The minimal length of the mitochondrial transport signal might even be significantly smaller than 66 residues, since, already, 29 residues suffice to efficiently label the mitochondria of transiently transformed cells with EYFP (Figure 4B), although import of the protein into mitochondria could not be confirmed in the complementing *in organello* experiments with isolated organelles (Figure 4C). Still, these data further extend the list of examples suggesting that mitochondrial transit peptides are usually shorter than their chloroplast targeting counterparts (Duby et al., 2001; Glaser and Soll, 2004; Bionda et al., 2010).

Beyond that, however, closer inspection of the N-terminal region of the alpha-MPP2 precursor protein suggests a more complex architecture of its organelle targeting and transport signals. The very N-terminus comprising residues 1–29 is sufficient to target passenger proteins both *in vitro* and *in vivo* to mitochondria (Figure 4). In combination with residues 30–66, it furthermore mediates the import of the passenger protein exclusively into mitochondria (Figures 2E and 3D). In contrast, by providing 13 additional amino acids (residues 67–79), the N-terminal region of alpha-MPP2 mediates also chloroplast targeting and import (Figures 2D and 3C). This suggests that the region covering residues 67–79 provides a modifying function to the transport signal such that it allows recognition of the chloroplast as a further target organelle. In the absence of residues 2–29, however, neither of the organelles is recognized as target and the protein remains trapped in the cytosol (Figures 5 and 6).

Based on these findings, we suggest a three-domain architecture of the dual targeting transport signal of alpha-MPP2 (Figure 7). The very N-terminus comprising residues 1–29 (= domain I) provides the *mitochondrial targeting domain*, while the adjacent domain II (extending to residue 66 at the most) is required for the actual import into the mitochondria and can thus be addressed as *organelle import domain*. Domain III, which includes residues 66–79, represents the *targeting modifier domain*, which alters and expands the targeting and

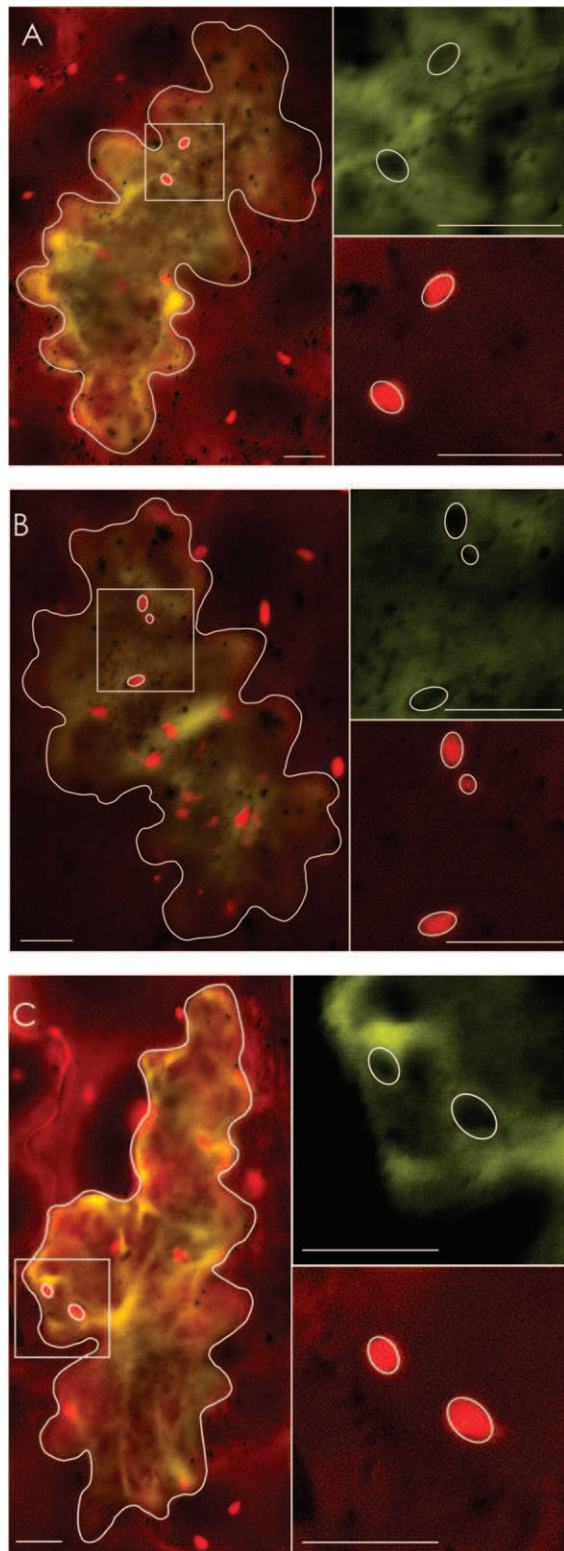


Figure 6. Subcellular Localization of the N-terminal Deletion Derivatives in Plant Cells.

The coding sequences of MPP(30–66)/EYFP (A), MPP(30–79)/EYFP (B), and MPP(30–100)/EYFP (C) were transiently expressed in leaf epidermis cells of pea and analyzed by confocal laser scanning microscopy. For further details, see the legend to Figure 3.



Figure 7. Schematic Representation of the Proposed Three-Domain Architecture of the Dual Targeting Transport Signal of alpha-MPP2. The proposed sub-function of each domain in the organellar import processes as deduced from the targeting and transport properties of the corresponding chimeric reporter proteins that are indicated on the right (*mito* = mitochondrial) is depicted on top.

import properties of the transport signal in such a way that chloroplasts are accepted as targets as well. In this scenario, domain III would probably be an evolutionary invention as a consequence of the second endosymbiotic event leading to the establishment of chloroplasts, which would be in agreement also with the usually longer chloroplast transport signals discussed above.

However, this kind of three-domain architecture is apparently not common to dual targeting transport signals in general. Among seven aminoacyl-tRNA synthetases carrying dual targeting transit peptides that were analyzed in some detail by deletion mapping, only four (ProRS, TyrRS, ValRS, and ThrRS) show complete loss of their organelle targeting properties in the absence of the N-terminal 20–22 residues (Berglund et al., 2009b), in analogy to our results with alpha-MPP2. Two of them (IleRS, LysRS) are completely unaffected by the deletion, whereas one further aminoacyl-tRNA synthetase (AspRS) as well as presequence protease Zn-MP (Bhushan et al., 2003), RNA polymerase RpoT2 (Hedtke et al., 2000), and glutathione reductase (Rudhe et al., 2002b), all of them dual targeted proteins that were analyzed in a similar manner, show instead monospecific transport specificity either for chloroplasts or mitochondria after such N-terminal deletion. Unfortunately, in neither of these analyses was anything but the N-terminal domains deleted, which obviously provides only limited information about potential further functional domains. Additional work will thus be required to finally assess the validity and universality of the proposed model.

Potential Function of alpha-MPP2 within Chloroplasts

Irrespective of the architecture and evolutionary origin of the dual targeting transport signal of alpha-MPP2, it is interesting to consider a potential function of the protein within chloroplasts. Of course, as already discussed in detail earlier (Rödiger et al., 2011), functionality of a given protein within an organelle is not necessarily a prerequisite for its import. Instead, ‘mis-targeting’ of proteins into chloroplasts might well be an evolutionary remnant of the two consecutive endosymbiotic events leading to mitochondria and chloroplasts, respectively (Staiger et al., 2009; Martin, 2010). Still, there are, of course, dually targeted proteins that fulfill important roles in both organelles. Typical examples are the aminoacyl-tRNA synthetases

mentioned above (Duchène et al., 2005), which are essential for translation within either of the organelles, RNA polymerase RpoT2 (Hedtke et al., 2000), or glutathione reductase (Creissen et al., 1995). At first glance, a function of alpha-MPP2 within chloroplasts appears rather unlikely because the enzymatic activity of mitochondrial processing peptidase is strictly dependent on the presence of two subunits: alpha-MPP and beta-MPP (Geli, 1993; Saavedra-Alanis et al., 1994). The former is supposed to be responsible for substrate binding (Yang et al., 1991), while the latter was shown to provide the catalytical activity (Kitada et al., 1995). According to *in silico* predictions, beta-MPP is imported exclusively into mitochondria (Table 1), which would prevent the assembly of the active enzyme within chloroplasts. However, the protein was identified within chloroplasts in an earlier proteome analysis of *Arabidopsis thaliana* (Kleffmann et al., 2004), suggesting that, actually, both alpha-MPP and beta-MPP might have dual targeting properties. Protein transport experiments are underway to clarify this point.

METHODS

Reporter Constructions

The full-size cDNA clone encoding alpha-MPP2 from *Arabidopsis thaliana* was obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (ABRC, Ohio State University, USA). The reporter constructions encoding the fusion proteins MPP(1–29)/EYFP, MPP(1–66)/EYFP, MPP(1–79)/EYFP, MPP(1–100)/EYFP, and MPP(1–150)/EYFP were generated by PCR amplification according to Rödiger et al. (2011). The corresponding deletion derivatives lacking residues 2–29 (MPP(30–66)/EYFP, MPP(30–79)/EYFP, and MPP(30–100)/EYFP) were analogously generated by PCR amplification using the N-terminal primer 5'-tgatccaATGGCTGTTGCAACGAG-3'. All chimeric constructions, as well as the authentic cDNA, were cloned with the two plasmid vectors, pBAT (Annweiler et al., 1991) and pRT100 Ω /Not/Asc (Überlacker and Werr, 1996), which are suitable for *in vitro* transcription and transient gene expression in plants, respectively.

In Organello Protein Transport Experiments

Radiolabeled precursor proteins obtained by *in vitro* translation in rabbit reticulocyte lysates in the presence of [³⁵S]-methionine were incubated with intact mitochondria or chloroplasts freshly isolated from leaves of pea or spinach as described by Rödiger et al. (2010). Mixed assays with both organelles were performed as detailed by Rudhe et al. (2002a). Fractionation of mitochondria and chloroplasts after import followed the protocols described by Rödiger et al. (2011) and Michl et al. (1994), respectively. Competition experiments were performed according to Molik et al. (2001).

Biolistic Transformation and Confocal Microscopy

Biolistic transformation of epidermal cells of pea leaves was performed as described in Rödiger et al. (2011). After 4–12 h, the leaves were analyzed using a Zeiss LSM 510 confocal laser scan-

ning microscope. The EYFP fluorophore was excited at 514 nm, while chlorophyll autofluorescence was excited at 633 nm. EYFP and chlorophyll signals were collected at 530–600 nm (yellow channel) and long pass 650 nm (red channel), respectively.

Miscellaneous

Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to Laemmli (1970). The gels were exposed to phosphorimaging screens and analyzed with a Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25) (Raytest, Straubenhardt, Germany). Protein concentration was determined according to Bradford (1976) and chlorophyll concentration according to Arnon (1949). All other methods followed published protocols (Sambrook and Russell, 2001).

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at *Molecular Plant Online*.

FUNDING

This work was supported by the Martin Luther University Halle-Wittenberg.

ACKNOWLEDGMENTS

No conflict of interest declared.

REFERENCES

- Akashi, K., Grandjean, O., and Small, I. (1998). Potential dual targeting of an *Arabidopsis* archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Lett.* **431**, 39–44.
- Annweiler, A., Hipskind, R.A., and Wirth, T. (1991). A strategy for efficient *in vitro* translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res.* **19**, 3750.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts: polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**, 1–15.
- Berglund, A.K., et al. (2009a). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts: characterization of Thr-tRNA synthetase targeting peptide. *Mol. Plant.* **2**, 1298–1309.
- Berglund, A.K., Pujol, C., Duchene, A.M., and Glaser, E. (2009b). Defining the determinants for dual targeting of amino acyl-tRNA synthetases to mitochondria and chloroplasts. *J. Mol. Biol.* **393**, 803–814.
- Bhushan, S., et al. (2003). Dual targeting and function of a protease in mitochondria and chloroplasts. *EMBO Rep.* **4**, 1073–1078.
- Bionda, T., Tillmann, B., Simm, S., Beilstein, K., Ruprecht, M., and Schleiff, E. (2010). Chloroplast import signals: the length requirement for translocation *in vitro* and *in vivo*. *J. Mol. Biol.* **402**, 510–523.
- Böhni, P.C., Daum, G., and Schatz, G. (1983). Import of proteins into mitochondria: partial purification of a matrix-located protease

- involved in cleavage of mitochondrial precursor polypeptides. *J. Biol. Chem.* **258**, 4937–4943.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V., and Schmitz, U.K.** (1992). The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J.* **11**, 3219–3227.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V., Bodicker, M., and Schmitz, U.K.** (1995). The general mitochondrial processing peptidase from wheat is integrated into the cytochrome bc₁-complex of the respiratory chain. *Planta*. **195**, 396–402.
- Carrie, C., Giraud, E., and Whelan, J.** (2009). Protein transport in organelles: dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS J.* **276**, 1187–1195.
- Claros, M.G., and Vincens, P.** (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur. J. Biochem.* **241**, 779–786.
- Cleary, S.P., et al.** (2002). Isolated plant mitochondria import chloroplast precursor proteins *in vitro* with the same efficiency as chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **277**, 5562–5569.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P.** (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J.* **8**, 167–175.
- Duby, G., Oufattole, M., and Boutry, M.** (2001). Hydrophobic residues within the predicted N-terminal amphiphilic alpha-helix of a plant mitochondrial targeting presequence play a major role in *in vivo* import. *Plant J.* **27**, 539–549.
- Duchêne, A.M., et al.** (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **102**, 16484–16489.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G.** (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J. Mol. Biol.* **300**, 1005–1016.
- Emmermann, M., Braun, H.P., and Schmitz, U.K.** (1994). The mitochondrial processing peptidase from potato: a self-processing enzyme encoded by two differentially expressed genes. *Mol. Gen. Genet.* **245**, 237–245.
- Eriksson, A.C., Sjöling, S., and Glaser, E.** (1994). The ubiquinol cytochrome c oxidoreductase complex of spinach leaf mitochondria is involved in both respiration and protein processing. *Biochim. Biophys. Acta.* **1186**, 221–231.
- Geli, V.** (1993). Functional reconstitution in *Escherichia coli* of the yeast mitochondrial matrix peptidase from its two inactive subunits. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **90**, 6247–6251.
- Glaser, E., and Soll, J.** (2004). Targeting signals and import machinery of plastids and plant mitochondria. In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles: Chloroplasts Mitochondria*, Daniell H. and Chase C., eds (Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, Springer), pp. 385–418.
- Glaser, E., Sjöling, S., Szigyarto, C., and Eriksson, A.C.** (1996). Plant mitochondrial protein import: precursor processing is catalysed by the integrated mitochondrial processing peptidase (MPP)/bc₁ complex and degradation by the ATP-dependent proteinase. *Biochim. Biophys. Acta.* **1275**, 33–37.
- Hawltitschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U., and Neupert, W.** (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell.* **53**, 795–806.
- Hedtke, B., Borner, T., and Weihe, A.** (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep.* **1**, 435–440.
- Kitada, S., Shimokata, K., Niidome, T., Ogishima, T., and Ito, A.** (1995). A putative metal-binding site in the beta subunit of rat mitochondrial processing peptidase is essential for its catalytic activity. *J. Biochem.* **117**, 1148–1150.
- Kleffmann, T., et al.** (2004). The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Curr. Biol.* **14**, 354–362.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**, 680–685.
- Martin, W.** (2010). Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **365**, 847–855.
- Menand, B., Marechal-Drouard, L., Sakamoto, W., Dietrich, A., and Wintz, H.** (1998). A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl Acad. Sci. U S A.* **95**, 11014–11019.
- Michl, D., Robinson, C., Shackleton, J.B., Herrmann, R.G., and Klösigen, R.B.** (1994). Targeting of proteins to the thylakoids by bipartite presequences: CF₀ is imported by a novel, third pathway. *EMBO J.* **13**, 1310–1317.
- Molik, S., Karnauchov, I., Weidlich, C., Herrmann, R.G., and Klösigen, R.B.** (2001). The Rieske Fe/S protein of the cytochrome b₆/f complex in chloroplasts: missing link in the evolution of protein transport pathways in chloroplasts? *J. Biol. Chem.* **276**, 42761–42766.
- Morgante, C.V., Rodrigues, R.A., Marbach, P.A., Borgonovi, C.M., Moura, D.S., and Silva-Filho, M.C.** (2009). Conservation of dual-targeted proteins in *Arabidopsis* and rice points to a similar pattern of gene-family evolution. *Mol. Genet. Genomics.* **281**, 525–538.
- Nakai, K., and Horton, P.** (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 34–36.
- Ou, W.J., Ito, A., Okazaki, H., and Omura, T.** (1989). Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. *EMBO J.* **8**, 2605–2612.
- Peeters, N., and Small, I.** (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.* **1541**, 54–63.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J.** (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* **290** (Pt 1), 205–218.
- Richter, S., Zhong, R., and Lamppa, G.** (2005). Function of the stromal processing peptidase in the chloroplast import pathway. *Physiologia Plantarum.* **123**, 362–368.
- Rödiger, A., Baudisch, B., and Klösigen, R.B.** (2010). Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *J. Plant Physiol.* **167**, 620–624.
- Rödiger, A., Baudisch, B., Langner, U., and Klösigen, R.B.** (2011). Dual targeting of a mitochondrial protein: the case study of cytochrome c₁. *Mol. Plant.* **4**, 679–687.

- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J., and Glaser, E. (2002a). A novel *in vitro* system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J.* **30**, 213–220.
- Rudhe, C., Clifton, R., Whelan, J., and Glaser, E. (2002b). N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency. *J. Mol. Biol.* **324**, 577–585.
- Saavedra-Alanis, V.M., Rysavy, P., Rosenberg, L.E., and Kalousek, F. (1994). Rat liver mitochondrial processing peptidase: both alpha- and beta-subunits are required for activity. *J. Biol. Chem.* **269**, 9284–9288.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd edn (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schulte, U., et al. (1989). A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis. *Nature.* **339**, 147–149.
- Small, I., et al. (1999). The strange evolutionary history of plant mitochondrial tRNAs and their aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Hered.* **90**, 333–337.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. (2004). Predotar: a tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics.* **4**, 1581–1590.
- Staiger, C., Hinneburg, A., and Klösgen, R.B. (2009). Diversity in degrees of freedom of mitochondrial transit peptides. *Mol. Biol. Evol.* **26**, 1773–1780.
- Überlacker, B., and Werr, W. (1996). Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Mol. Breeding.* **2**, 293–295.
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* **5**, 1335–1342.
- von Heijne, G., Stepphuhn, J., and Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* **180**, 535–545.
- Yang, M., Jensen, R.E., Yaffe, M.P., Oppliger, W., and Schatz, G. (1988). Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes. *EMBO J.* **7**, 3857–3862.
- Yang, M.J., Geli, V., Oppliger, W., Suda, K., James, P., and Schatz, G. (1991). The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria: interaction of the purified enzyme with signal peptides and a purified precursor protein. Dual Targeting by an Unusual Transport Signal. *J. Biol. Chem.* **266**, 6416–6423.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1. TargetP prediction of organellar transport of the chimeric reporter proteins.

Chimeric Reporter Protein	M*	C*
MPP(1-29)/EYFP	0.954	0.043
MPP(1-66)/EYFP	0.656	0.644
MPP(1-79)/EYFP	0.715	0.642
MPP(1-100)/EYFP	0.662	0.555
MPP(1-150)/EYFP	0.643	0.575
MPP(30-66)/EYFP	0.036	0.823
MPP(30-79)/EYFP	0.049	0.931
MPP(30-100)/EYFP	0.056	0.928

M, mitochondrion; C, chloroplast; *, likelihood of organellar transport

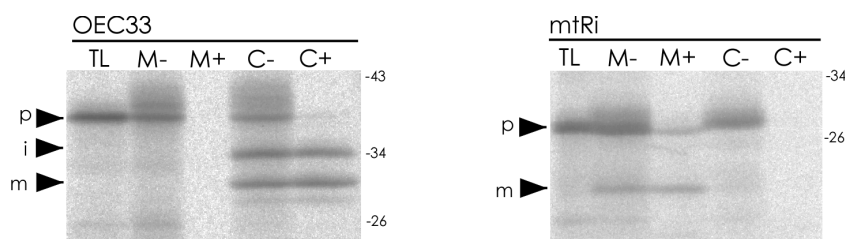


Figure S1. *In organello* protein transport of the 33 kDa subunit of the oxygen evolving system from spinach (*OEC33*) and the mitochondrial Rieske Fe/S from potato (*mtRi*) into mitochondria and chloroplasts isolated from pea. The position of precursor (*p*), intermediate (*i*), and mature (*m*) polypeptides are indicated by arrowheads. For further details, see the legend to Figure 1.

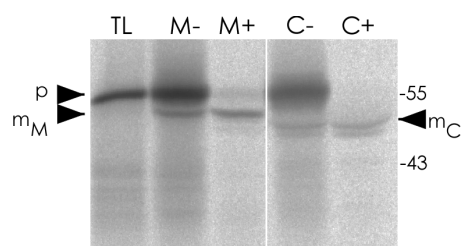


Figure S2. *In organello* protein transport of alpha-MPP2 into mitochondria and chloroplasts isolated from spinach. For further details, see the legend to Figure 1.

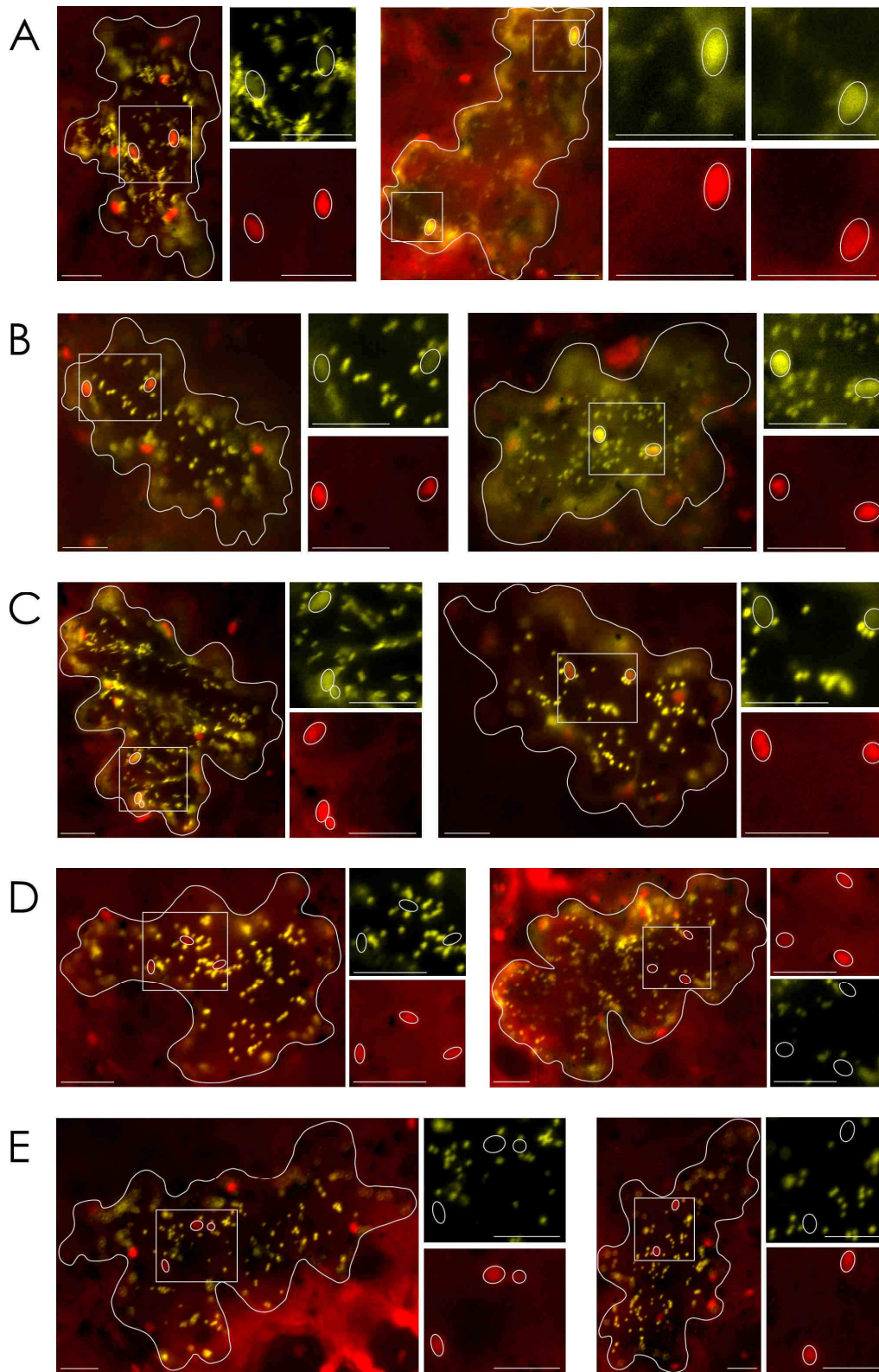


Figure S3. Subcellular localization of MPP(1-150)/EYFP (A), MPP(1-100)/EYFP (B), MPP(1-79)/EYFP (C), MPP(1-66)/EYFP (D), and MPP(1-29)/EYFP (E) in plant cells. The respective coding sequences were transiently expressed in leaf epidermis cells of pea and analyzed by confocal laser scanning microscopy. For further details, see the legend to Figure 3.

Bildgrößen wurden für diese Darstellung angepasst

3.3 Ergänzende Experimente und Ergebnisse

Neben der α -MPP2 wurden zwei weitere kerncodierte Proteine aus *A. thaliana* hinsichtlich ihrer Transporteigenschaften untersucht: das GrpE Proteinhomolog (GrpE) sowie der Elongationsfaktor Tu (EF-Tu). Die GrpE-Familie ist hochkonserviert und ubiquitär in Pro- und Eukaryoten verbreitet. Die Vertreter dieser Familie fungieren als Co-Chaperone indem sie die Faltung bzw. Rückfaltung von freigesetzten bzw. denaturierten Proteinen vermitteln und darüber hinaus im Organelltransport involviert sind (zusammengefasst in Mayer and Bukau, 2005). So besitzt dieses GrpE-Protein Homologie zu einer essentiellen Untereinheit des PAM (*presequence associated motor*)-Komplexes, der zusammen mit TIM23 (siehe Einleitung, Abschnitt 4.2) die Translokation von Vorläuferproteinen von der inneren Mitochondrienmembran in die Matrix vermittelt (Lister et al., 2005). Damit übereinstimmend wurde GrpE bereits im Mitochondrienproteom von *A. thaliana* identifiziert (Heazlewood et al., 2004; Ito et al., 2006). Der Translations-Elongationsfaktor Tu spielt eine zentrale Rolle in der Proteinsynthese indem dieser die Bindung der tRNA an die Ribosomen vermittelt. EF-Tu ist ebenfalls sowohl in Pro- (Weijland et al., 1992) als auch in Eukaryoten (Merrick, 1992) anzutreffen. Auch Mitochondrien und Plastiden beherbergen EF-Tu Proteine zur Synthese der organelleigenen Proteine. So wurde diesem EF-Tu Protein aus *A. thaliana* aufgrund von Ähnlichkeiten zu anderen mitochondriellen Elongationsfaktoren aus verschiedenen Organismen eine Lokalisierung in den Mitochondrien zugesprochen (Kuhlman and Palmer, 1995), die durch Proteom-Analysen bestätigt werden konnte (Kruft et al., 2001; Ito et al., 2006).

In organello Transportexperimenten sowie *in vivo* Analysen belegen ebenfalls die mitochondrielle Lokalisierung beider Proteine (Kapitel 4). Darüber hinaus ist bei beiden Proteinen auch ein Transport in die Chloroplasten zu beobachten (Kapitel 4). Somit konnten zwei weitere Proteine mit dualem Transportverhalten identifiziert werden, das mit den folgenden Experimenten näher charakterisiert wird.

3.3.1 Transportweg dualer Proteine in die Organellen

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl Cyt1 als auch α -MPP2 über Teile des Transportweges der monospezifischen plastidären Proteine transportiert werden (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.2 sowie Kapitel 3, Abschnitt 3.2). Dieses Ergebnis sollte für die zwei dualen Proteine GrpE und EF-Tu mit Hilfe von Konkurrenzexperimenten überprüft werden. Analog zu den mit Cyt1 und α -MPP2 durchgeführten Konkurrenzexperimenten wurde der Transportweg in die Chloroplasten über die TOC/TIC-Komplexe durch Zugabe von ansteigenden Konzentrationen an heterolog überexprimiertem Kompetitorprotein OEC33 gesättigt (Abb. 6).

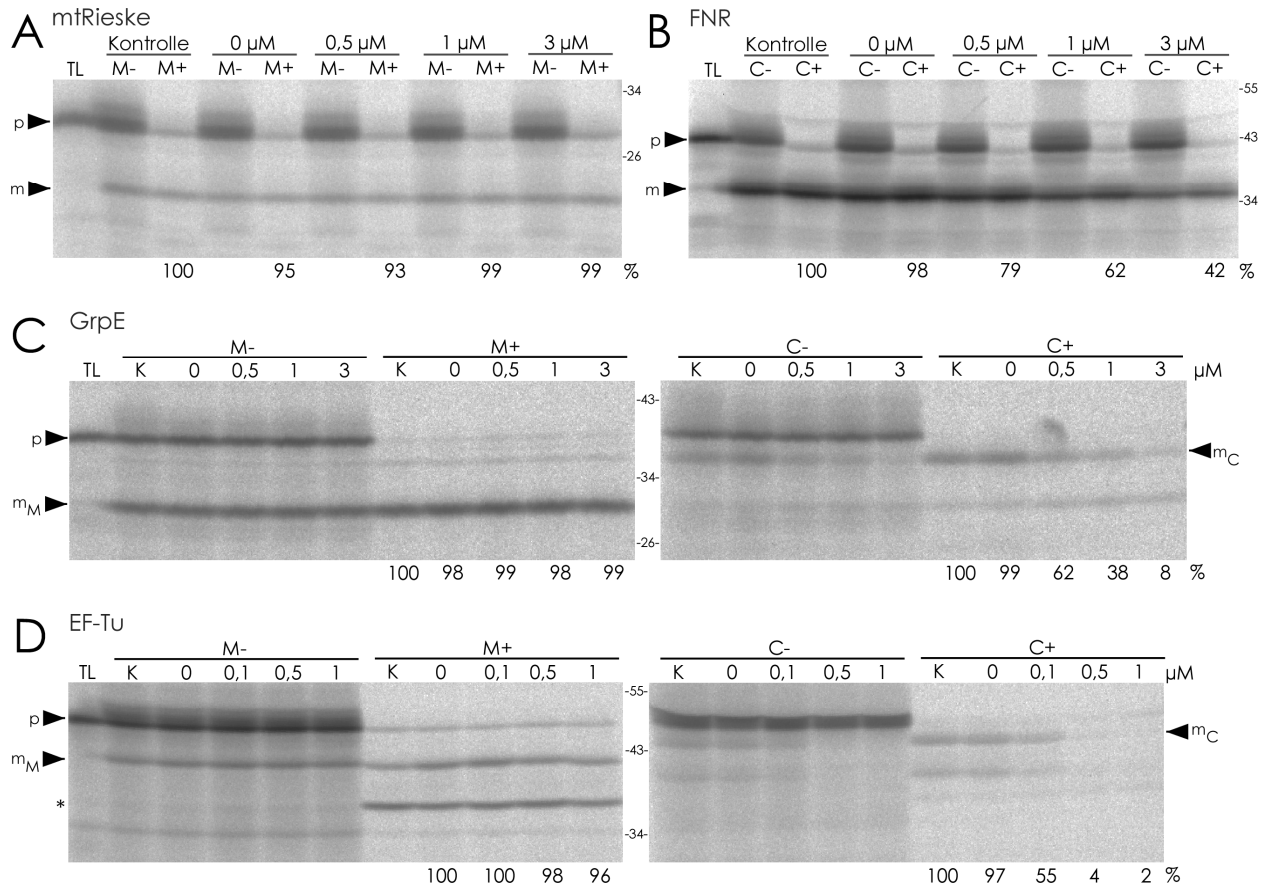


Abbildung 6: OEC33 inhibiert spezifisch den Proteintransport in die Chloroplasten.

In vitro synthetisierte, radioaktiv markierte Vorläuferproteine von mtRieske aus Kartoffel (A), FNR aus Spinat (B) sowie GrpE (C) und EF-Tu (D) aus *A. thaliana* wurden für 20 min bei 25°C mit entweder Mitochondrien (Spuren M) oder Chloroplasten (Spuren C), die aus 8 Tage gewachsenen Erbsenpflanzen isoliert wurden, inkubiert. Der Import erfolgte mit Ausnahme des Standardimportansatzes (Spuren Kontrolle bzw. K) in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen an in *E. coli* überexprimierten OEC33 (Angaben oberhalb der jeweiligen Spuren). Da das Kompetitorprotein in Harnstoff gelöst ist, wurde jeder Importansatz einer Kompetitorreihe mit Ausnahme der Kontrolle unter identischen Harnstoffkonzentrationen (74 mM bei den Substraten A-C, 25 mM bei Substrat D) durchgeführt. Nach der Importreaktion wurden die Fraktionen gewaschen und entweder mit Thermolysin versetzt (Spuren M+, C+) oder blieben unbehandelt (Spuren M-, C-). Stöchiometrische Mengen jeder Organellfraktion, entsprechend 50 μg Protein (Mitochondrien) bzw. 12,5 μg Chlorophyll (Chloroplasten) wurden mittels eines 10-15 % SDS-Polyacrylamid Gradientengels aufgetrennt und mit Autoradiographie visualisiert. Ein Aliquot des Translationsansatzes (1 μl, entspricht 10 % der zugegebenen Menge an Translation in jedem Importansatz) wurde in den Spuren TL aufgetragen. Die Positionen des Vorläuferproteins (p) sowie des reifen Proteins (m) bzw. der Prozessierungsprodukte der Mitochondrien (m_M) und Chloroplasten (m_C) sind durch Pfeilspitzen markiert. Das apparente Molekulargewicht der Markerproteine ist in kDa angezeigt. Die relative Menge des translozierten Proteins (mit Pfeilspitze markiert) der Thermolysin-behandelten Fraktion wurde quantifiziert (angegeben in Prozent, bezogen auf den Standardimportansatz ohne Zugabe von Kompetitorprotein und Harnstoff) und ist unterhalb der entsprechenden Spuren aufgeführt. Im Kompetitorsexperiment D wurde die relative Menge an transloziertem Protein in den Mitochondrien auf die Harnstoffkontrolle (Spur 0 μM) bezogen da die Menge in der Kontrolle höchstwahrscheinlich durch Pipettierfehler verfälscht ist. Der Stern in D markiert ein Degradationsprodukt, das durch externe Zugabe von Thermolysin entsteht. In den Experimenten C und D sind weitere Signale unterhalb des markierten Prozessierungsprodukts der Chloroplasten nachweisbar, die bei jedem Experiment auftraten und vermutlich ebenfalls Prozessierungsprodukte darstellen aber nicht intensiver analysiert wurden im Rahmen dieser Arbeit.

Falls der Kompetitor und das radioaktiv markierte Substrat über Komponenten des identischen Importweges transportiert werden, nimmt die Menge an importiertem Substrat signifikant ab in Abhängigkeit von der zugegebenen KompetitorKonzentration. Im Fall von GrpE sinkt der Import in die Chloroplasten in Gegenwart von 3 μM Kompetitorprotein auf weniger als 10 % bezogen auf den Ausgangswert in der Kontrollreaktion (Abb. 6C). Der Transport von EF-Tu in die Chloroplasten wird bereits bei Zugabe von 0,5 μM an OEC33 um ca. 95 % reduziert (Abb. 6D). Im Gegensatz dazu zeigt das Substrat FNR in Gegenwart der höchsten verwendeten KompetitorKonzentration eine vergleichsweise geringe aber dennoch signifikante Reduktion des Importes um ca. 50 % (Abb. 6B). Vermutlich ist die variable Konkurrenzeffizienz bei Verwendung des identischen Kompetitors auf unterschiedliche Affinitäten der Transitpeptide der verschiedenen Transportsubstrate zu dem jeweiligen Rezeptor zurückzuführen. Dennoch zeigt das Ergebnis eindeutig, dass sowohl GrpE als auch EF-Tu über Teile der generellen Importroute monospezifischer Plastidenproteine transportiert werden. Die Absättigung des Chloroplastenimportes durch OEC33 ist spezifisch, da der mitochondrielle Transport beider dualen Proteine (Abb. 6C, 6D) sowie des mitochondriellen Kontrollsubstrates mtRieske (Abb. 6A) mit ansteigender Menge an Kompetitorprotein unverändert bleibt.

Zusätzlich zu dem plastidären Transportweg sollte auch der Weg in die Mitochondrien mit Hilfe der Konkurrenzexperimente analysiert werden. Allerdings war für die Absättigung des mitochondriellen Transportweges kein monospezifischer Kompetitor in den dafür notwendigen Konzentrationen verfügbar. Aus diesem Grund wurde heterolog überexprimiertes Cyt1 für diese Untersuchungen verwendet (Abb. 7), das als duales Protein der Mitochondrien und Chloroplasten identifiziert wurde (siehe Kapitel 2).

Erwartungsgemäß sollte bei Zugabe von Cyt1 sowohl der mitochondrielle als auch der plastidäre Import des Substrates reduziert werden in dem Fall, dass Cyt1 und das Substrat Teile des identischen Transportweges nutzen. Die zwei monospezifischen Substrate mtRieske und FNR zeigen in Gegenwart des Kompetitors Cyt1 einen reduzierten Import in das jeweilige Organell (Abb. 7A, 7B). Der mitochondrielle Import des mtRieske fällt bei Zugabe von 2 μM Kompetitorprotein signifikant um nahezu 90 % ab (Abb. 7A). Im Gegensatz dazu führt die Zugabe der doppelten Konzentration an Kompetitorprotein zu einer vergleichsweise geringeren Reduktion des Imports von FNR in die Plastiden um ca. 50 % (Abb. 7B). Ein ähnliches Ergebnis wurde in Konkurrenzanalysen mit einem weiteren plastidären monospezifischen Substrat, OEC33, und Cyt1 als Kompetitorprotein erzielt (Daten nicht gezeigt). Folglich besitzt Cyt1 vermutlich eine geringere Affinität zu den plastidären Rezeptoren als zu den der Mitochondrien. Dennoch zeigen diese Experimente eindeutig, dass Cyt1 die Kompetenz besitzt sowohl den mitochondriellen als auch den plastidären Import verschiedener Substrate zu reduzieren und somit als Kompetitorprotein geeignet ist.

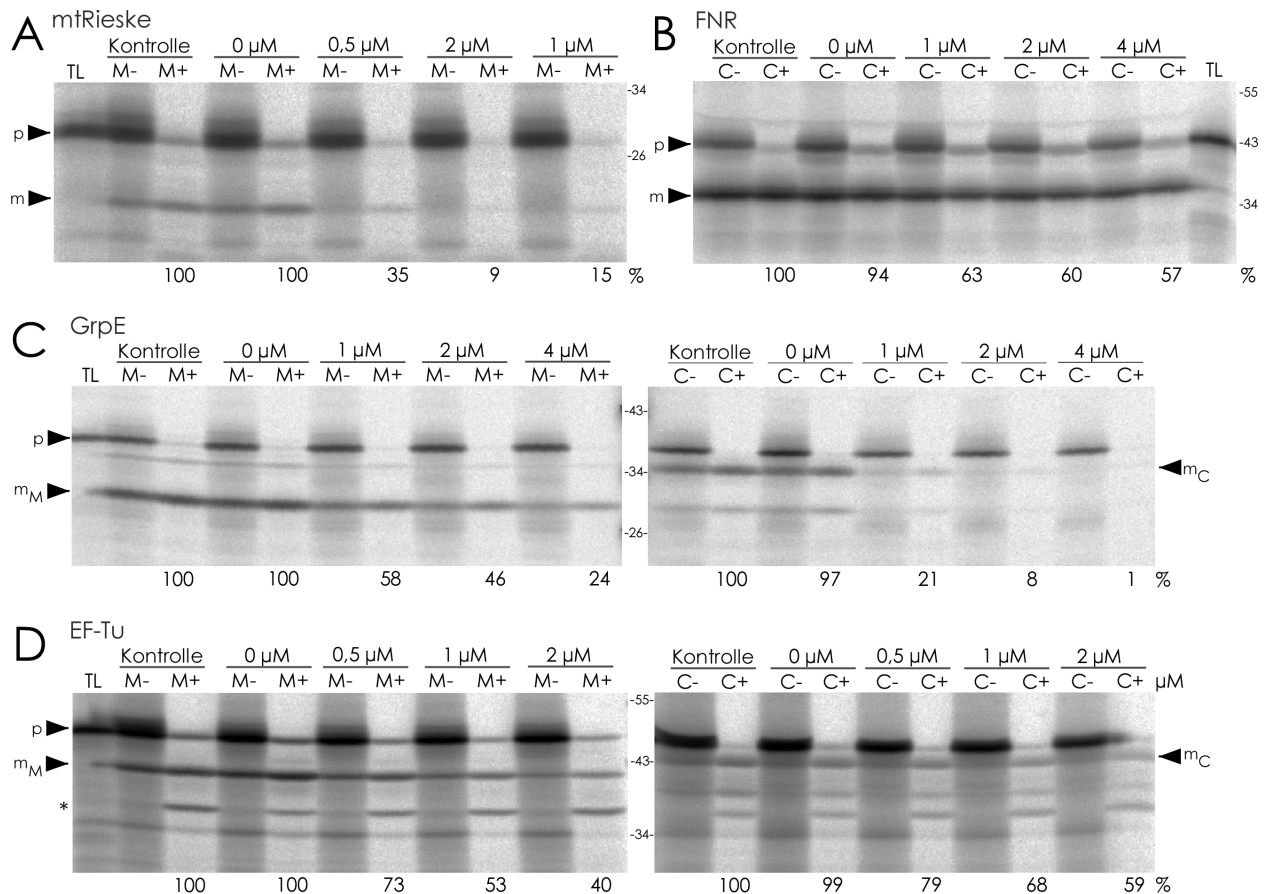


Abbildung 7: Cytc1 reduziert sowohl den mitochondrialen als auch den plastidären Import.

In organello Konkurrenzexperimente von mtRieske aus Kartoffel (A), FNR aus Spinat (B) sowie GrpE (C) und EF-Tu (D) aus *A. thaliana* in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen an in *E. coli* überexprimiertem Cytc1. Für die Konkurrenzexperimente A und D wurden präparierte Cytc1-inclusion bodies verwendet und die Importansätze mit Ausnahme des Standardimportansatzes (*Spuren Kontrolle*) fanden in Anwesenheit von 250 mM Harnstoff statt. In den Konkurrenzexperimenten B und C wurde aufgereinigtes Cytc1 (Aufreinigung wurde freundlicherweise durchgeführt von M. Jakob) eingesetzt und die Harnstoffkonzentration in allen Importansätzen außer in der Kontrollreaktion betrug 230 mM. Weitere Details sind in der Legende zu Abb. 6 aufgeführt.

Damit übereinstimmend ist der Transport der dualen Substrate GrpE und EF-Tu in beide Organellen in Anwesenheit des Kompetitors beeinträchtigt (Abb. 7C, 7D). So wird durch Zugabe von 4 μM Cytc1 der Transport von GrpE in die Mitochondrien auf ein Viertel des Ausgangswertes reduziert wohingegen der plastidären Import unter diesen Bedingungen nahezu vollständig inhibiert ist (Abb. 7C). Den umgekehrten Fall zeigt das Experiment mit dem Substrat EF-Tu: der mitochondrielle Import ist bei einer Konzentration von 2 μM auf 40 % reduziert und somit stärker beeinträchtigt als der Transport in die Chloroplasten, der auf nahezu 60 % gesenkt wird (Abb. 7D). Die Effizienz der Konkurrenz fällt somit bei beiden Substraten im Vergleich unterschiedlich aus. Als Ursache dafür ist vermutlich wiederum die variable Bindungsaffinität des Transitpeptides zu dem jeweiligen Organellrezeptor denkbar. Ungeachtet dessen belegen diese Ergebnisse zweifelsfrei, dass der Import in die Mitochondrien bzw. in die Chloroplasten von sowohl GrpE als auch EF-Tu über jeweils identische Transportwegkomponenten erfolgt wie von Cytc1.

3.3.2 Einfluss des Translationssystems auf die Organellespezifität dualer und monospezifischer Proteine

Die *in vitro* Translation eines Vorläuferproteins wird in einem zellfreien System, meistens Retikulocytenlysat (RL) oder alternativ Weizenkeimextrakt (WGE, *wheat germ extract*), durchgeführt. Im Gegensatz zu dem tierischen Translationssystem RL konnten im WGE pflanzenspezifische Komponenten, z. B. eine cytosolische Kinase zur Phosphorylierung plastidärer Transitpeptide, nachgewiesen werden (Waegemann and Soll, 1996), für die ein möglicher regulatorischer Einfluss auf die Organellespezifität diskutiert wird (siehe Einleitung, Abschnitt 3). Dieser mögliche Einfluss sollte auch hinsichtlich des dualen Transportverhaltens untersucht werden. Dazu wurden sowohl duale Proteine als auch verschiedene monospezifische Substrate in WGE translatiert und diese für *in organello* Transportexperimente eingesetzt (Abb. 8).

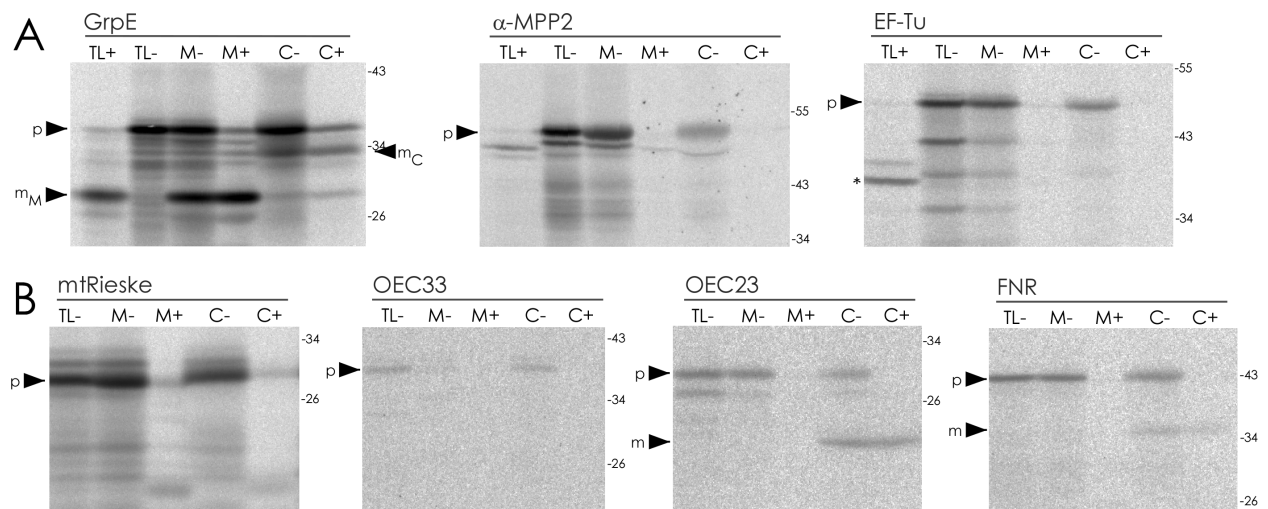


Abbildung 8: Die Synthese in WGE kann zu importinkompetenten Translationsprodukten führen.

In organello Transportexperimente mit in WGE (Promega, Madison, USA) synthetisierten Translationsprodukten von Proteinen mit dualer (A) oder monospezifischer (B) Lokalisierung. Die Translations- und Importreaktionen fanden unter den Bedingungen statt, wie die Synthese dieser Proteine in RL und das anschließende *in organello* Transportexperiment. In den Spuren TL+ wurde ein Aliquot des mit Thermolysin behandelten Translationsansatzes aufgetragen. Weitere Details sind in der Legende zu Abb. 6 aufgeführt.

In WGE translatiertes GrpE wird nach Inkubation mit sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten in beide Organellen transportiert und prozessiert (Abb. 8A). Das Vorläuferprotein sowie die prozessierten Produkte weisen ein identisches apparentes Molekulargewicht auf wie die Produkte, die nach der Synthese mit RL und anschließendem *in organello* Transportexperiment entstehen (zum Vergleich siehe Abb. 6C und 7C, Kontrollansatz). Auffällig im Translationsansatz von GrpE mit WGE ist das Auftreten mehrerer Nebenprodukte, die zusätzlich während der Synthese des Vorläuferproteins entstehen (Abb. 8A) und für die Translation in RL nicht beobachtet werden konnten (zum Vergleich siehe Abb. 6C und 7C, Translationsspur). Die Translationsansätze von α -MPP2 sowie des EF-Tu zeigen ebenfalls mehrere Translationsprodukte, wobei das besonders auffällig für das letztere Protein ist. Die entstandenen Translationsprodukte beider Substrate zeigen jedoch keinen Import, weder in die Mitochondrien noch in die Chloroplasten trotz Bindung des

Vorläuferproteins an die Organellen (Abb. 8A, Protease-unbehandelte Organellfraktionen). Folglich sind durch die Synthese mit WGE importinkompetente Proteine entstanden, da der parallel durchgeführte Import von GrpE (Abb. 8A) eindeutig belegt, dass die verwendeten Organellen transportkompetent waren. Die Analysen der Kontrollproteine führten zu einem ähnlichen Ergebnis (Abb. 8B): weder das Translationsprodukt des mtRieske noch des OEC33 können importiert werden, lediglich eine Bindung an das Organell ist nachzuweisen. Eine Inkubation der Organellen mit dem Translationsansatz von OEC23 oder FNR zeigt dagegen einen Import in die Chloroplasten sowie eine anschließende Prozessierung (Abb. 8B). Allerdings ist beim letzteren Protein sowohl das translatierte Vorläuferprotein als auch die Menge an importiertem Protein signifikant schwächer verglichen mit RL synthetisiertem FNR (zum Vergleich siehe Abb. 6B und 7B, Kontrollansatz). Ähnlich wie bei den dualen Substraten ist im Fall des OEC23 zusätzlich zu dem Vorläuferprotein ein weiteres Produkt mit höherer Mobilität nach SDS-PAGE im Translationsansatz zu detektieren.

Diese Ergebnisse belegen, dass sich die Translationsprodukte mit WGE im Vergleich zu denen mit RL bei vielen getesteten Substraten grundlegend unterscheiden. Zum einen sind weitere Nebenprodukte im jeweiligen Translationsansatz zu detektieren, die auf eine unvollständige Synthese des jeweiligen Proteins hindeuten könnten. Zum anderen führte die Synthese mit WGE bei vier Proteinen zu importinkompetenten Translationsprodukten, wobei die Lokalisierung des jeweiligen Proteins irrelevant ist.

Die Synthese von importinkompetenten Vorläuferproteinen mittels WGE ist bereits für weitere Substrate beschrieben (Schleiff et al., 2002^b; Dessi et al., 2003). Die fehlende Importkompetenz wird vermutlich durch spezifische Bestandteile des WGE verursacht, die an das Vorläuferprotein binden und somit bspw. für den Import wesentliche Merkmale maskieren können. Inwiefern diese WGE spezifischen Komponenten den Import stören, wurde im folgenden Experiment untersucht. Dazu wurden dem RL-Translationsansatz diverser Substrate nach der Synthesereaktion verschiedene Mengen an WGE zugegeben und dieser unmittelbar danach mit den isolierten Organellen inkubiert (Abb. 9).

In dem Fall, dass Faktoren des WGE einen störenden Einfluss auf den Import haben, sollte die Menge an importiertem Protein nach Zugabe von WGE reduziert werden. Tatsächlich führt die Zugabe von WGE bei allen drei Substraten zu einer signifikanten Reduktion des Importes bezogen auf den parallel durchgeführten Standard *in organello* Ansatz ohne WGE. Allerdings variiert das Ausmaß an Reduktion des Imports in Abhängigkeit vom Substrat (Abb. 9). So ist der Import von GrpE bei Zugabe von WGE verglichen mit den anderen Substraten am geringsten gestört: der mitochondrielle Import bleibt bei ca. 90 % erhalten, wohingegen der plastidäre auf nahezu 60 % sinkt (Abb. 9A). Im Fall der α -MPP2 sowie des EF-Tu verursacht die Gegenwart von bereits 2,5 μ l WGE einen drastischen Abfall des plastidären Importes auf ca. 50 %. Dagegen ist der Transport in die Mitochondrien bei dieser zugeführten Menge an WGE relativ konstant im Vergleich zum Kontrollansatz (Abb. 9B, 9C). Die Zugabe der doppelten Menge an WGE reduziert den Import beider Proteine erneut: der Transport in die Mitochondrien sinkt auf ca. 85 %, im Gegensatz dazu fällt der plastidäre Import der α -MPP2 auf 45 % und der des EF-Tu sogar auf nahezu ein Viertel der Standardreaktion (Abb. 9B, 9C). Auffällig bei diesen beiden Substraten ist das Auftreten eines zusätzlichen Produktes im Translationsansatz nach Zugabe

von WGE, das in beiden Fällen dem apparenten Molekulargewicht des Prozessierungsproduktes der Mitochondrien entspricht. Darüber hinaus kann der Translationsansatz von GrpE, α -MPP2 und EF-Tu wesentlich weniger von der extern zugegebenen Protease degradiert werden (Abb. 9A-C, Proteasebehandelter Translationsansatz). Besonders stark ist dies bei EF-Tu zu erkennen (Abb. 9C). Interessanterweise ist der Transport der drei Substrate in die Plastiden erheblich stärker reduziert verglichen mit dem Transport in die Mitochondrien.

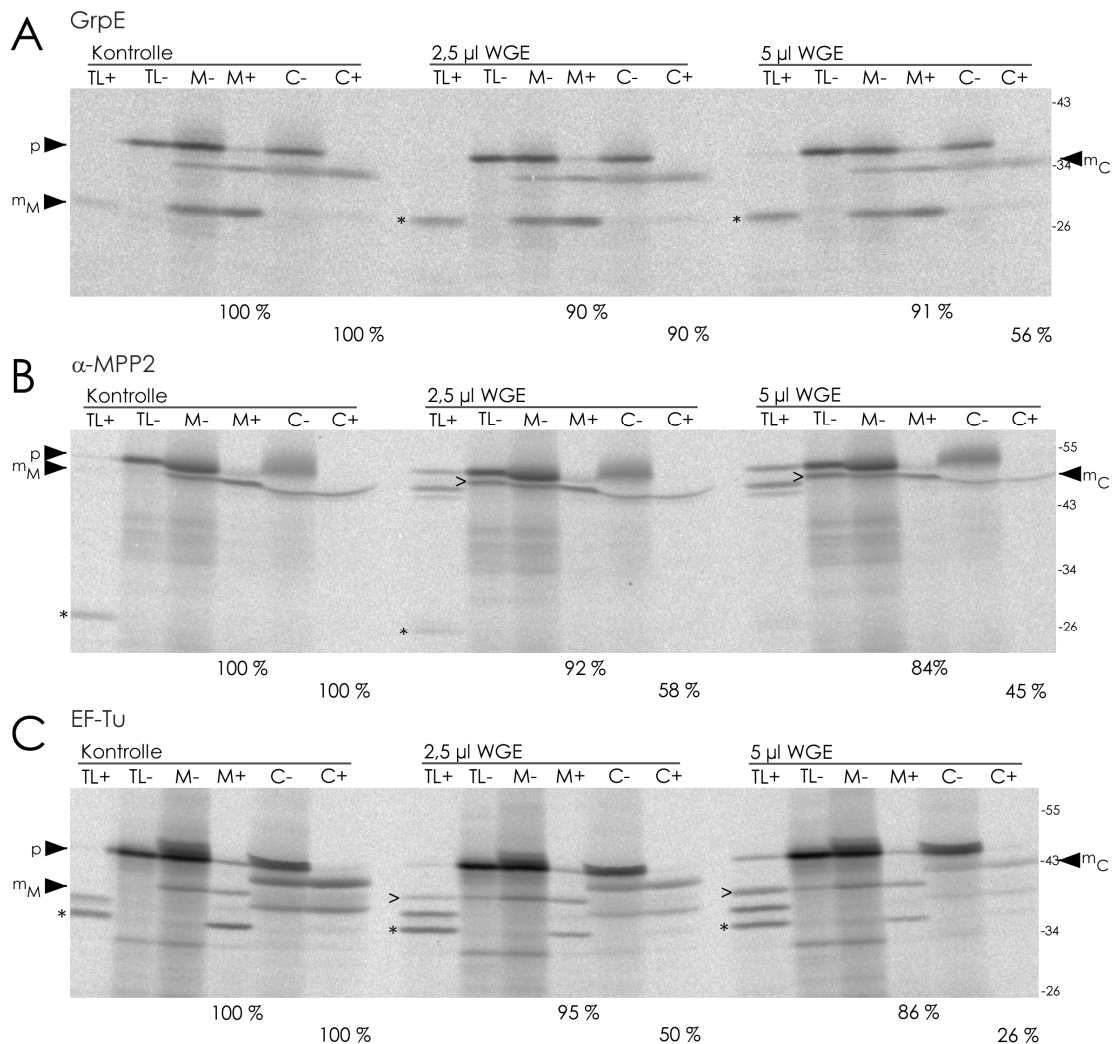


Abbildung 9: WGE enthält Transport-inhibierende Komponenten.

In organello Transportexperimente von in RL (Promega, Madison, USA) synthetisierten GrpE (A), α -MPP2 (B) sowie EF-Tu (C) unter Einfluss von WGE. Nach abgeschlossener Translationsreaktion mit RL wurden zu 5 µl dieses Ansatzes entweder 5 µl Importpuffer (*Spuren Kontrolle*) oder 2,5 µl WGE und 2,5 µl Importpuffer (*Spuren 2,5 µl WGE*) oder 5 µl WGE (*Spuren 5 µl WGE*) zugegeben und unmittelbar danach mit den Organellen inkubiert. Demzufolge wurde für diese Experimente die Hälfte der sonst verwendeten Menge an Translation eingesetzt. Die *offene Pfeilspitze* markiert die Produkte im Translationsansatz, die in ihrer Mobilität dem jeweiligen Prozessierungsprodukt der Mitochondrien entsprechen. Weitere Details sind in den Legenden zu Abb. 6 und Abb. 8 aufgeführt.

Diese Experimente deuten daraufhin, dass im WGE spezifische Komponenten enthalten sind, die an das RL-synthetisierte Vorläuferprotein binden und dadurch den Zugang für die zugegebene Protease erschweren. Gleichzeitig könnte durch eine Bindung dieser Komponenten an das Vorläuferprotein die für den

Organelltransport essentielle(n) Information(en) maskiert und dadurch der Import in das jeweilige Organell gestört werden. Das Auftreten eines Produktes im Translationsansatz auf Höhe des mitochondrialen Prozessierungsproduktes bei α -MPP2 sowie EF-Tu sind Hinweise für eine Kontamination mit der mitochondrialen Prozessierungspeptidase im WGE, wodurch ein Teil der Vorläuferproteine bereits vor dem Import in das jeweilige Organell prozessiert werden könnten und damit importinkompetente Substrate entstehen.

3.3.3 Transport dualer Proteine in die Organellen in Abhängigkeit von der Zeit

Da im vorherigen Experiment (Abb. 9) der Plastidenimport signifikant stärker reduziert ist als der Mitochondrientransport stellte sich die Frage ob der Transport in die Chloroplasten grundsätzlich langsamer bzw. verzögert abläuft. Aus diesem Grund wurde der Import von drei dualen Proteinen in beide Organellen zu verschiedenen Zeitpunkten gestoppt um so die Menge an importiertem Protein zu ermitteln (Abb. 10).

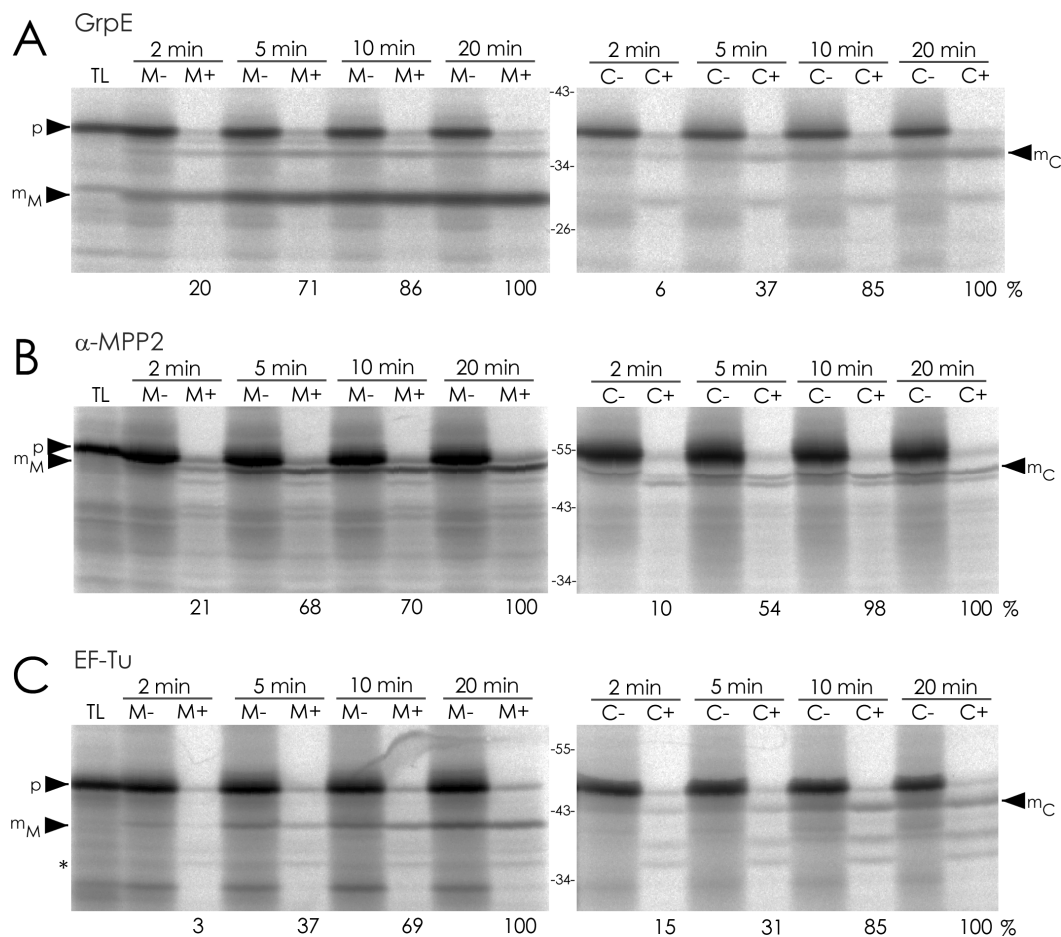


Abbildung 10: Der Import in beide Organellen erfolgt mit ähnlicher Kinetik.

In organello Transportexperimente von GrpE (A), α -MPP2 (B) sowie EF-Tu (C) in Abhängigkeit von der Zeit. Die Importreaktionen wurden zu vier verschiedenen Zeitpunkten gestoppt (*Spuren 2, 5, 10 oder 20 min*) indem die Organellen durch Zentrifugation vom Translationsansatz getrennt und anschließend gewaschen wurden. Die Inkubation der Organellen mit dem Translationsansatz für 20 min entspricht den Standardbedingungen einer Importreaktion. Weitere Details sind in der Legende zu Abb. 6 aufgeführt.

Erwartungsgemäß nimmt die Menge an transloziertem Protein mit fortschreitender Inkubationszeit der Organellen mit dem jeweiligen Translationsansatz zu: nach fünf Minuten wurde jedes der Vorläuferproteine zu einem Drittel in das jeweilige Organell transportiert wohingegen nach der Hälfte der gesamten Zeit (10 min) bereits zwei Drittel an transloziertem Protein detektierbar sind (Abb. 10A-C). Folglich ist bereits nach kürzeren Inkubationszeiten bei jedem Substrat ein Import in das jeweilige Organell nachzuweisen, was auf eine spezifische und effiziente Erkennung des Proteins durch die Organellrezeptoren hinweist. Allerdings ist die Kinetik des Proteinimports in beide Organellen beim Vergleich mehrerer Substrate unterschiedlich, was besonders bei den frühen Zeitpunkten (2 und 5 min) zu beobachten ist. So ist die Menge an akkumuliertem Protein in die Mitochondrien im Fall von GrpE und α -MPP2 nach zwei bzw. fünf Minuten deutlich höher als in den Chloroplasten (Abb. 10A, 10B), was zeigt dass der Transport in die Mitochondrien anfänglich effizienter erfolgt. Im Gegensatz dazu zeigt EF-Tu nach zwei Minuten einen signifikant höheren Chloroplastenimport, allerdings sind nach fünf Minuten die Mengen an transloziertem Protein in beiden Organellen nahezu identisch (Abb. 10C). Für die Substrate α -MPP2 und EF-Tu ist nach der 10 min eine höhere Menge an akkumuliertem Protein in dem Chloroplasten zu detektieren, was im Fall der α -MPP2 nahezu 100 % der gesamten transportierten Menge entspricht (Abb. 10B, 10C). Vom GrpE wurden zu diesem Zeitpunkt nahezu identische Proteinmengen in beide Organellen transportiert (Abb. 10A). Diese Resultate widerlegen die anfänglich Annahme, dass der Chloroplastenimport langsamer verläuft als der Transport in die Mitochondrien. Vielmehr zeigen die Zeitserienexperimente, dass es nicht möglich ist eines der beiden Organellen eine höhere der Transporteffizienz in Abhängigkeit von der Zeit zuzuordnen. Stattdessen wird das jeweilige Substrat mit ähnlicher Kinetik sowohl in die Mitochondrien als auch in die Chloroplasten importiert. Ein identisches Resultat zeigten *in vivo*-Zeitexperimente, bei denen ein simultaner Transport in beide Organellen beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

KAPITEL 4

4 Die Ausnahme bestätigt die Regel? - *Dual targeting* kerncodierter Proteine der endosymbiontischen Organellen

4.1 Zusammenfassung

Dual targeting war anfänglich als eine Art Einzelphänomen beschrieben, das nur bei einer Handvoll Proteinen nachgewiesen wurde (Small et al., 1998). Allerdings konnten in den letzten Jahren immer mehr duale Proteine identifiziert werden, sodass dieses Phänomen offensichtlich weiter verbreitet ist, als ursprünglich angenommen. Doch in welchem Ausmaß *dual targeting* bei den Organellproteinen tatsächlich auftritt, ist noch völlig unklar. Die Entdeckung dieser Proteine erfolgte ausschließlich per Zufall, da offensichtlich keine konservierten Sequenzmotive in dualen Transitpeptiden existieren (siehe Einleitung, Abschnitt 5.2) und somit auch keine versierten Programme zur Ermittlung dieser Proteine verfügbar sind. Aus diesem Grund wurde ein bioinformatisch basierter Ansatz zur Identifizierung dualer Proteine entwickelt. In diesem Ansatz sollten im Genom von *A. thaliana* codierende Sequenzen für potentiell dual lokalisierte Proteine identifiziert werden. Dazu wurden im ersten Schritt homologe Sequenzen sowohl zu α -Proteo- als auch zu Cyanobakterien gesucht, da diese Organismen den potentiellen Vorfahren der Mitochondrien (Gray et al., 1999) bzw. Chloroplasten (Douglas, 1998) entsprechen und duale Proteine höchstwahrscheinlich Merkmale von beiden Organellen besitzen (Peeters and Small, 2001). Insgesamt wurden ca. 2000 abgeleitete Proteine mit Homologien zu beiden potentiellen Vorfahren im Kerngenom von *A. thaliana* identifiziert. Im nächsten Schritt wurde die potentielle Lokalisierung dieser 2000 Proteine mittels geeigneter Computerprogramme bestimmt. In diesem Fall wurde das Programm TargetP (Emanuelsson et al., 2000) verwendet, das basierend auf den N-terminalen 150 Aminosäuren eines Proteins eine Wahrscheinlichkeit angibt, ob dieses ein mTP bzw. cTP trägt und damit das Potential besitzt in Mitochondrien bzw. Chloroplasten transportiert zu werden. Für ca. 700 Proteine wurde ein mTP bzw. cTP mittels TargetP ermittelt. Interessanterweise wurde für die Mehrzahl dieser Proteine eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Lokalisierung sowohl in den Mitochondrien als auch in den Plastiden angegeben, was ein Indiz für ein *dual targeting* sein könnte. Die Differenz zwischen der Wahrscheinlichkeit, dass das Protein ein mTP und cTP trägt war die Grundlage für die Einteilung dieser 700 ermittelten Proteine in insgesamt zehn Subgruppen. Dabei wird für die Proteine in einer niedrigen Subgruppe (entspricht Subgruppe A), also mit einer geringen Differenz zwischen beiden Vorhersagewerten, eine höhere Tendenz für *dual targeting* erwartet. Dementsprechend wurden in den höheren Subgruppen überwiegend monospezifische Proteine erwartet. Um diese Vorhersagen durch TargetP und die daraus resultierende Klassifizierung dieser Proteine zu überprüfen, wurden aus niedrigen (entspricht Klassen I und II), mittleren (entspricht Klasse III) sowie aus den höchsten Subgruppen (entspricht Klasse IV) jeweils vier Proteine ausgewählt (Tabelle 1) und diese 16 Kandidatenproteine mit den in den vorangegangenen Abschnitten beschriebenen *in organello*- und *in vivo*-Transportexperimenten analysiert.

Für die *in vivo* Analysen wurden zunächst chimäre Reporterkonstruktionen hergestellt, bestehend aus den codierenden Sequenzen für die N-terminalen 100 Aminosäuren des Kandidatenproteins und EYFP, die unter

der Kontrolle des 35S CaMV Promotors transient in transformierten Epidermiszellen von Erbsenblättern exprimiert wurden. Es zeigt sich, dass bei sieben von acht der Kandidaten der Klassen I und II eine Markierung beider Organellen nachweisbar ist, wohingegen für einen Kandidaten (ATPS) die EYFP-Fluoreszenz ausschließlich in den Mitochondrien zu detektieren ist. Generell weisen beide Organellen im Vergleich innerhalb einer transformierten Zelle verschiedene Fluoreszenzintensitäten auf, die höchstwahrscheinlich durch unterschiedliche Transitpeptidaffinitäten der Kandidatenproteine zum jeweiligen Organellrezeptor verursacht werden und somit in unterschiedliche Organellpräferenzen der Proteine resultieren. Die duale Lokalisierung für sieben der acht Kandidatenproteine konnte mit komplementierenden *in organello* Transportexperimenten bestätigt werden (Tabelle 1). Interessanterweise sind auch mit diesem Versuchsansatz verschiedene Präferenzen der Kandidaten zu den Organellen zu detektieren, wodurch unterschiedliche importierte Mengen in den Organellen akkumulieren. Die verschiedenen Organellpräferenzen entsprechen tendenziell denen der *in vivo* Experimente. Die monospezifische Lokalisierung der ATPS in den Mitochondrien ist ebenfalls mittels des *in organello* Ansatzes nachweisbar.

Tabelle 1: Übersicht der *in silico* ermittelten Proteine, die mittels *in vivo* und *in organello* Transportexperimente analysiert wurden.

Klasse	Subgruppe	Protein	<i>in silico</i>		<i>in vivo</i>	<i>in organello</i>	
			mTP*	cTP*	Reporterfusion	authentisches Protein	Reporterfusion
I	A	ATPS	0,827	0,808	M	M	
		GCS	0,639	0,617	M/C	M/C	
		α -MPP2	0,643	0,575	M/C	M/C	
		EF-Tu	0,47	0,556	M/C	M/C	
II	B	OhmT	0,435	0,568	M/C	M/C	
		GrpE	0,743	0,601	M/C	M/C	
		AntS	0,470	0,657	M/C	M/C	
		PDF	0,547	0,739	M/C	M/C	
III	C	GgpS	0,665	0,462	C	C	
		DhoDH	0,681	0,474	M/C	M/C	
		GAPDH	0,438	0,674	C	M/C	M/C
		Gtred	0,635	0,346	M/C	M/C	
		:					
IV	I	FumH	0,904	0,071	M/C	M/C	
		SHBP	0,054	0,937	C	M/C	M/C
	J	NADH	0,949	0,040	M/C	M	M/C
		DXPS	0,020	0,956	C	M/C	M/C

m/cTP, mitochondrielles/plastidäres Transitpeptid; *, Wahrscheinlichkeit für Organelltransport; M, Mitochondrien; C, Plastiden

Die Kandidatenproteine der Klasse III wurden ebenfalls mit beiden experimentellen Ansätzen untersucht (Tabelle 1) mit dem Ergebnis, dass für zwei von insgesamt vier Proteinen zweifelsfrei *dual targeting* nachweisbar ist. Im Gegensatz dazu zeigt das Protein GgpS einen Transport ausschließlich in die Plastiden. Die Analyse des vierten Kandidatenproteins, GAPDH, führte zu diskrepanten Ergebnissen: dieses Proteins ist nach biologistischer

Transformation von Blattgewebe ausschließlich in den Plastiden zu detektieren wohingegen ein Import in sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten mittels *in organello* Transportexperimenten nachweisbar ist. Die Diskrepanz könnte auf das Fehlen von cytosolischen Faktoren im *in organello* Versuchsansatz zurückzuführen sein. Ungeachtet dessen ist in dieser Klasse für die Hälfte der Proteine ein duales Transportverhalten belegbar.

Zusätzlich zu den Kandidatenproteinen für *dual targeting* wurden vier Proteine analysiert (Tabelle 1), die eine hohe Wahrscheinlichkeit für die Lokalisierung entweder in den Mitochondrien oder Chloroplasten aufweisen. Demzufolge wurde für diese vier Substrate ein monospezifisches Transportverhalten erwartet. Allerdings konnte für keines dieser Proteine tatsächlich Monospezifität zweifelsfrei nachgewiesen werden. Stattdessen zeigen die zwei mitochondriellen Substrate (FumH und NADH) *dual targeting* nach transienter Expression. Für FumH ist dieses duale Transportverhalten mittels komplementierender *in organello* Experimente eindeutig detektierbar wohingegen NADH einen Import ausschließlich in die Mitochondrien zeigt. Die Analyse der beiden plastidären Proteine (SHBP und DXPS) führte zu dem entgegengesetztem Ergebnis: bei beiden Proteinen erfolgt ein Import sowohl in die isolierten Mitochondrien als auch in die Chloroplasten, jedoch ist in transformierten Pflanzenzellen eine Markierung ausschließlich der Plastiden zu detektieren. Diese Diskrepanz ist vermutlich wiederum auf die Abwesenheit regulatorischer Faktoren des Cytosols im *in organello* Versuchsansatz zurückzuführen. Dennoch wurde in dieser Klasse trotz eindeutiger Vorhersage für Kandidaten mit einem monospezifischen Transitpeptid ein duales Protein zweifelsfrei identifiziert.

Um die Lokalisierung der Proteine mit diskrepanten Ergebnissen intensiver zu untersuchen wurde für diese vier Proteine (GAPDH, NADH, SHBP, DXPS) ein weiteres Experiment durchgeführt: die chimäre Reporterkonstruktion dieser Substrate wurde *in vitro* translatiert und mit isolierten Organellen in einem *in organello* Transportexperiment inkubiert. Bei allen vier analysierten Proteinen erfolgt ein Import der chimären Reporterkonstruktion in beide Organellen. Folglich ist für GAPDH, SHBP und DXPS, bei denen auch das authentische Vorläuferprotein in beide isolierte Organellen importiert wird, die Gegenwart des Cytosols entscheidend um den Transport in die Mitochondrien zu verhindern. Im Fall der NADH, die nur als authentisches Vorläuferprotein einen monospezifischen Transport zeigt, ist das Fehlen des reifen Proteinanteils offensichtlich die Ursache für die duale Lokalisierung, da diese unabhängig vom Cytosol mit beiden Versuchsansätzen zu detektieren ist. Demzufolge sind für einige Proteine zusätzliche Faktoren, wie das Cytosol bzw. der reife Proteinanteil, an der intrazellulären Sortierung beteiligt.

Mit Hilfe des systematischen Ansatzes konnten insgesamt zehn neue duale Proteine identifiziert werden, sodass derzeit ca. 90 Proteine mit *dual targeting* Charakter bekannt sind. Hochgerechnet ist davon auszugehen, dass insgesamt mehrere Hundert Proteine ebenfalls zum Transport in beide Organellen befähigt sind. Folglich ist die Anzahl an dualen Proteinen deutlich höher als erwartet und scheint eine basale Eigenschaft vieler Organellproteine zu sein, die bspw. auf eine Unspezifität der Transitpeptide zurückzuführen sein könnte und somit eventuell einen evolutionären "Überrest" darstellt.

The exception proves the role? - Dual targeting of nuclear encoded proteins into endosymbiotic organelles

Bianca Baudisch[‡], Uwe Langner^{*‡}, Ingo Garz, and Ralf Bernd Klösigen

Institute of Biology - Plant Physiology, Martin Luther University Halle-Wittenberg,
Weinbergweg 10, 06120 Halle (Saale), Germany

([‡]) Both authors contributed equally to this work.

(^{*}) Corresponding author: Uwe Langner

Phone: + 49 - 345 - 55 26 204

Fax: + 49 - 345 - 55 27 095

Email: uwe.langner@pflanzenphys.uni-halle.de

Running title: Nuclear encoded organelle proteins with dual targeting properties

Key words: protein transport, dual targeting, mitochondria, chloroplast, transit peptide,

ABSTRACT

Plant cells harbour two types of endosymbiotic organelles, notably mitochondria and plastids. In both cases is the majority of their proteins encoded in the nucleus, in consequence of the endosymbiotic gene transfer, and post-translationally "re"-imported into the respective target organelle. The corresponding transport signals called transit peptides or presequences are usually specific for a single of these organelles but in recent years more and more proteins have been identified which carry transit peptides that are capable of mediating transport into both mitochondria and plastids. As a first step to estimate the number of proteins with such dual targeting properties within plant cells, we have screened the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana* for genes of endosymbiotic origin that encode precursor proteins with N-terminal transit peptides. These were classified according to the respective targeting specificity predicted by the TargetP software package. Selected examples of various protein classes were subsequently analysed by protein transport experiments employing both isolated intact chloroplasts and mitochondria as well as transient transformation assays using suitable fluorescent reporter constructions. With this approach, we identified an unexpected high proportion of proteins with dual targeting properties suggesting that such transport phenomena are more abundant than usually anticipated. This is further support for the hypothesis that dual targeting is an evolutionary remnant and a direct consequence of the two consecutive endosymbiotic events.

INTRODUCTION

Mitochondria and chloroplasts are the result of two consecutive endosymbiotic events in which prokaryotic organisms, namely an alpha-proteobacterium and a cyanobacterium, were successively taken up by a host cell and incorporated as organelles (Giovannoni et al., 1988; Douglas, 1998; Gray et al., 1999). The establishment of these organelles was in both cases accompanied by a massive transfer of genetic information, predominantly from the endosymbiont to the host nucleus (Martin and Herrmann, 1998; Bock and Timmis, 2008). As a consequence of this, many proteins encoded by such genes have to be transported "back" into the respective organelle after synthesis. For this purpose, they are synthesised in the cytosol as precursor polypeptides carrying N-terminal extensions called presequences or transit peptides that comprise the entire information for organelle targeting and import. In most instances, this transport is monospecific, i.e. a given protein is targeted specifically into either mitochondria or chloroplasts. However, in the past years a number of proteins were identified which show a dual targeting behaviour, i.e., they are imported into both endosymbiotic organelles. In some cases, such dual targeting results from transit peptides comprising two independent transport signals in tandem. Due to differential transcription, splicing, and/or translation processes either of the two signals can be exposed at the N-terminus of the precursor protein where it determines the target organelle. In other instances though, dual targeting is mediated by ambiguous transit peptides, which are able to interact with protein transport machineries of both endosymbiotic organelles (reviewed in Peeters and Small, 2001; Karnieli and Pines, 2005).

The number of proteins with dual organelle specificity is not known because their transport properties were mostly identified by accident (e.g., Creissen et al., 1995; Rödiger et al., 2011) which does not allow for any serious calculation. Furthermore, it is also not known which features of a transit peptide determine if it has monospecific or dual targeting properties. Consequently, none of the established software packages predicting subcellular localisation of a protein, like PSORT (Nakai and Horton, 1999), TargetP (Emanuelsson et al., 2000), or Predotar (Small et al., 2004), takes dual targeting into both chloroplasts and mitochondria into account. We have therefore tried to roughly estimate the number of proteins with dual targeting properties by a combination of *in silico* genome analysis and protein transport experiments. First, we have screened the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana* for genes encoding proteins with transit peptides which were then classified into different groups according to their prediction values for either chloroplasts or mitochondria. Several candidates from these groups were then analysed with respect to their organelle transport properties using both *in vivo* and *in organello* protein transport experiments.

RESULTS

Selection of candidate proteins

In order to identify candidate proteins for dual targeting into mitochondria and chloroplasts, we screened the nuclear genome of *Arabidopsis thaliana* for protein encoding genes with homology to alpha-proteobacteria

and/or cyanobacteria. As representatives of mitochondrial ancestors, *Rickettsia prowazekii* and *Rhizobium meliloti* (both living intracellularly within human and plant cells, respectively) as well as *Caulobacter crescentus* as an example of a free-living prokaryote were used. With respect to chloroplasts, the cyanobacteria *Synechocystis* PCC 6803 (unicellular), *Anabaena* PCC 7120 (filamentous), and *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (unicellular, thermophilic) were used. From this approach, approximately 2000 non-redundant protein encoding genes with homology to the ancestors of both plastids and mitochondria were identified.

To get a first hint of the presumed subcellular localisation of the corresponding proteins, the N-terminal 150 amino acid residues of the deduced polypeptide sequences were analysed with the software package TargetP, which predicts the likelihood of organellar targeting of given protein sequences (Emanuelsson et al., 2000). Applying an arbitrary threshold level of 0.8 for the probability of targeting to endosymbiotic organelles in general, approximately 30 % of the protein sequences were selected. Among those, many proteins are clearly predicted to be targeted to only one of the endosymbiotic organelles. However, in an unexpected large number of cases the prediction values for the two organelles were remarkably similar, i.e., the software calculated comparable likelihood of targeting into each, chloroplasts and mitochondria.

For a more detailed classification, we have arranged these candidate proteins into sub-groups taking the difference of the prediction values for mitochondrial targeting (mTP) and chloroplast targeting (cTP) as distinctive feature (Tab. 1). The sub-groups were ranked with increasing difference between mTP and cTP prediction values ($\text{Abs } |mTP - cTP|$), starting with proteins with an almost identical prediction for both organelles (class I) and ending with those proteins for which an almost exclusive localisation in either mitochondria or chloroplasts is predicted (class IV). In class I, proteins with dual targeting properties are assumed to be enriched, while proteins of class IV are probably transported exclusively into one of the two endosymbiotic organelles. Remarkably, in each sub-group comparable numbers of candidates are found, although candidate proteins with predicted single organelle specificity are slightly overrepresented.

From each of the classes I to III ($\text{Abs } |mTP - cTP| \leq 0.1$, $\text{Abs } |mTP - cTP| > 0.1 \leq 0.2$, and $\text{Abs } |mTP - cTP| > 0.2 \leq 0.3$, respectively), four candidates were chosen for the analysis. Among these is one protein, the subunit of the mitochondrial processing peptidase, which was recently shown already to exhibit dual targeting properties (Baudisch and Klösgen, 2011). As a control, also four proteins from class IV ($\text{Abs } |mTP - cTP| > 0.8$) were included in the analysis, two each with prediction for chloroplasts and mitochondria respectively.

Almost all transit peptides of candidate proteins from classes I and II show dual targeting properties in transient transformation assays

As a first step to investigate the organelle targeting specificity of the candidate proteins of classes I and II, *in vivo* transport experiments were performed. For this purpose, epidermal cells of pea leaves were transiently transformed by biolistic transformation with artificial genes encoding chimeric reporter proteins under the control of the 35S promoter of Cauliflower Mosaic Virus. Each chimeric reporter protein consisted of the N-

terminal 100 residues of a candidate precursor protein, which should comprise the complete information for targeting and transport of the protein into its target organelle (e.g. Berglund et al., 2009), fused to EYFP (enhanced yellow fluorescent protein) (Figure 1A). The subcellular localisation of the fluorescent reporter proteins in the transformed cells was analysed by confocal laser scanning microscopy. It turned out that all reporter proteins based on candidates of classes I and II co-localise with the mitochondria of the transformed cell, i.e. they are detectable as highly mobile punctuate structures with a size of approximately 0.5 μ m (Figure 1B-H). Furthermore, with one exception they all show EYFP fluorescence also in plastids, as demonstrated by co-localisation of the EYFP signal with the autofluorescence signal of chlorophyll (Figure 1C-H). This demonstrates that the N-terminal 100 residues of seven from eight candidate proteins belonging to classes I and II, notably GCS, MPP, EF-Tu, OhmT, GrpE, AntS, and PDF, comprise transport signals that are capable of recognising both endosymbiotic organelles as targets. The only exception is ATPS for which such dual targeting cannot be observed (Figure 1A).

The efficiency of transport into either mitochondria or plastids, as indicated by the relative intensity of EYFP fluorescence accumulating in either of the organelles, is apparently not identical in all instances. Only cells expressing GrpE(1-100)/EYFP or OhmT(1-100)/EYFP show similar EYFP fluorescence in both organelles (Figure 1E, F), while in all other cases preferential accumulation of the reporter in only one type of organelles is observed. Four chimeras, notably GCS(1-100)/EYFP, MPP(1-100)/EYFP, EF-Tu(1-100)/EYFP, and AntS(1-100)/EYFP exhibit stronger EYFP fluorescence in mitochondria (Figure 1B-D,G), while in cells expressing PDF(1-100)/EYFP the reciprocal result, i.e. predominant EYFP fluorescence in plastids, is observed (Figure 1H). Such variability in organelle-linked EYFP fluorescence depending on the reporter construct might point to different affinities of the transit peptides for the respective transport receptors, although it must be considered that detailed quantification is not possible with such microscopy analyses due to the potential influence of parameters like expression rate or protein stability.

Candidate proteins of classes I and II show dual targeting also in organello assays

Such quantification is possible though with *in organello* assays in which radiolabeled precursor proteins obtained by *in vitro* translation in cell-free translation systems are incubated with freshly isolated intact mitochondria or chloroplasts. Analysing the authentic precursors of the eight candidate proteins of classes I and II with such *in organello* import experiments, it turned out that again all proteins except ATPS show dual targeting and import (Figure 2B-G). Within the organelles, the precursor proteins are processed to products of higher mobility upon SDS-PAGE that are resistant to protease added externally to the assays after the import reaction, proving that they are the result of complete internalisation of the candidate proteins into the respective organelles. In case of GCS, OhmT, AntS, and PDF the size of the processing products accumulating in either mitochondria or chloroplasts is identical for the candidate proteins suggesting that they were cleaved at the same position within the precursor polypeptide (Figure 2B, D, F, G). With OhmT an additional cleavage product within the chloroplasts is observed (Figure 2D). In other instances though, the processing products of the two organelles

have different mobility upon SDS-PAGE (Figure 2A, C, E), in line with earlier observations made, for example, with Cytc1 which likewise shows different processing products accumulating in the two organelles (Rödiger et al., 2011).

Quantification of the amount of protein accumulating in either of the organelles after import, which is enabled by the radioactive labelling of the precursor proteins applied in the assays, demonstrates that in the case of GCS and EF-Tu the amount of processing product accumulating within the mitochondria is much higher than in chloroplasts (Figure 2B, C), which is consistent with the results obtained by *in vivo* studies (Figure 1C, D). In contrast, for the PDF more of the processing product is detectable within the chloroplasts (Figure 2G) and thus confirmed the tendency observed in the transient expression studies described above. Only for OhmT, GrpE, AntS the relative amounts of processing product accumulating within both organelles *in organello* (Figure 2D-F) compared to the *in vivo* studies (Figure 1E-G) changes to a minor degree.

Consistent results between the *in vivo* and *in organello* experiments are also observed for ATPS, the only candidate exhibiting monospecific targeting characteristics in the transient transformation assays. The protein is efficiently imported also into isolated intact mitochondria where it is cleaved to a distinct single product with an apparent size of 50 kDa, which is resistant against protease added externally to the organelles after import (Figure 2A). Incubation of the ATPS precursor with chloroplasts, on the other hand, results only in some binding of the protein to the surface of the isolated organelles, whereas neither specific processing products nor protease resistance can be observed (Figure 2A). This reconfirms the result of monospecific mitochondrial targeting of the ATPS fusion protein obtained by *in vivo* studies (Fig. 1B).

Organelle specificity of class III candidates

Next, we have analysed the organelle targeting specificities of those proteins that were grouped into class III, i.e. which show a slightly larger difference in the mTP and cTP prediction values (0.2 - 0.3). Again, *in vivo* and *in organello* experiments comparable to those described above were performed and it turned out that two of the four candidates, DhoDH and Gtred, show dual targeting in both assays. The precursors were imported into isolated mitochondria and chloroplasts where they are processed to identical products that are resistant to externally added protease (Figure 3F, H). Likewise, confocal laser scanning microscopy of epidermal cells transiently expressing either of the two reporter constructions (DhoDH(1-100)/EYFP, Gtred(1-100)/EYFP) demonstrate localisation of the fluorescent reporter in both organelles (Figure 3B, D).

In contrast, GgpS shows monospecific targeting to chloroplasts. Incubation of the radiolabeled precursor with isolated organelles results in the import and fully internalisation of the protein into the chloroplasts (Figure 3E). Although the precursor shows some binding to the mitochondrial envelope, neither specific processing nor protease resistance can be observed. This is in line with the results obtained by confocal microscopy. Cells expressing the GgpS(1-100)/EYFP show EYFP fluorescence solely in plastids as demonstrated by co-localisation of the EYFP signal with chlorophyll autofluorescence (Figure 3A).

Such co-localisation of EYFP and chlorophyll is detectable in cells expressing GAPDH(1-100)/EYFP, the last member of class III candidates (Figure 3C). Again, labelling of the mitochondria is not observed, which suggests that the GAPDH is able to target the passenger exclusively to the plastids *in vivo*. However, the authentic precursor of the GAPDH shows an import into both isolated organelles (Figure 3G). Within both organelles, the precursor is processed to a distinct single product of apparently 43 kDa that is protected against externally added protease which confirms complete internalisation into the chloroplasts as well as mitochondria. This is the first example in which the results from the two assay systems differ from each other not only quantitatively but also qualitatively. The reason is not yet known but the principle differences in the methodology of the two assay systems might turn out to be helpful to finally unravel all processes involved in protein targeting and transport in detail.

Even the presumed monospecific candidates of class IV are not strictly monospecific

As a control for the quality of our prediction approach, we have also analysed the candidates, which were predicted for either mitochondria or chloroplasts. Unexpectedly, neither of these candidates shows in fact monospecific targeting behaviour in both assays.

The two candidates for strictly mitochondrial localisation (FumH and NADH) show targeting to both mitochondria and plastids after transient expression of the corresponding chimeric reporter proteins (FumH(1-100)/EYFP, NADH(1-100)/EYFP) targeting to the both mitochondria and plastids as demonstrated by co-localisation of the EYFP signal with chlorophyll fluorescence (Figure 4A, B). In case of FumH dual targeting is also observed with *in organello* assay (Figure 4E). In this instance the processing product is fully resistant against externally added protease due to the full internalisation of the protein by the organelles. Together these findings prove that also in the group of proteins predicted for monospecific targeting, proteins with dual targeting properties even be found.

Incubation of authentic NADH with isolated organelles, however, results in import exclusively into mitochondria. With chloroplasts, only some binding is observed but neither specific processing product nor protease resistance within chloroplasts can be found (Figure 4F). Thus, NADH shows different targeting behaviour with *in organello* and *in vivo* experiments.

Exactly opposite results and thus similar (results) as those obtained with GAPDH are found for the two candidates predicted for strict chloroplast localisation. The proteins SHBP and DXPS are transported into both endosymbiotic organelles *in organello* and cleaved by the respective organellar processing peptidase to two distinct products with the same mobility upon SDS-PAGE (Figure 4G, H). Confocal laser scanning microscopy of epidermal leaf cells expressing either SHBP(1-100)/EYFP or DXPS(1-100)/EYFP show however targeting only to plastids demonstrated by co-localisation of the EYFP signal with chlorophyll fluorescence (Figure 4C, D). No co-localisation of the EYFP signal with mitochondria is observed upon transient expression of these

chimeric reporter constructions. Consequently both proteins show with *in organello* experiments dual targeting but *in vivo* targeting solely to plastids.

DISCUSSION

The number of proteins with dual targeting properties is unexpectedly high

To date, an estimate of relevance of proteins with dual targeting properties remains elusive. In order to appraise the number of proteins which recognise both endosymbiotic organelles as target, an *in silico* approach consisting of homology alignment and prediction of subcellular localisation was designed and the subcellular localisation of candidate proteins was analysed using a combination of *in vivo* and *in organello* transport experiments. In first instance, the analysis shows that from approximately 2000 sequences of *Arabidopsis thaliana*, which are quite homologue to cyanobacteria as well as alpha-proteobacteria, nearly one third is predicted to carry a transit peptide responsible for the transport in at least one of both mitochondria and chloroplasts. Among those, surprisingly many proteins have prediction values for the two organelles, which were remarkably similar.

The first result is that all candidate proteins show import into one of the two endosymbiotic organelles *in vivo* as well as *in organello* assays. Therefore, TargetP (Emanuelsson et al., 2000) is apparently able to detect proteins carrying a transit peptide of endosymbiotic organelles. Furthermore, it turned out that in classes I and II, which show a high likelihood of targeting of both mitochondria and chloroplasts the probability for dual targeting behaviour is increased. Seven out of eight analysed candidate proteins of class I and II can be located in both mitochondria and chloroplasts irrespective of the experimental method used. Moreover, 50 % of tested candidate proteins of class III, which indicate a slightly larger difference in the mTP and cTP prediction values, showed also dual targeting behaviour. Based on these findings approx. 100 proteins with dual targeting properties in class I to III can be expected and therefore the number of all known dual targeted proteins to date will be more than doubled with one stroke. Additionally, it can be assumed that considerably more proteins with dual targeting behaviour can be found because even the presumed monospecific candidates of class IV show also dual targeting. Therefore, in these groups additional proteins with dual targeting properties can be expected. Particularly in class I and II, the high level of agreement of *in silico* approach and *in vivo* as well as *in organello* approach demonstrates their applicability to detect nucleus encoded organelle proteins with dual targeting behaviour. Furthermore, our results suggest the likelihood of dual targeting of a given protein is increases when the difference between mTP and cTP is downwards.

An estimation of the occurrence of dual targeting in the whole organelle proteome *Arabidopsis thaliana* is difficult because nearly the half of the proteins have not been passed our stringent parameters of the alignment and are consequently absent in our analysis. In our selected group of candidate proteins nearly one third of approximately 80 known dual targeted proteins (summarised in Berglund et al., 2009; Carrie et al., 2009b; Morgante et al., 2009) were found (see Supplemental Table S1). In addition to that nearly half of approx. 100

potential dual proteins derived from SUBA database (Heazlewood et al., 2007; Carrie et al., 2009a) are included in this selected group of candidates (see Supplemental Table S1). Hence, our approach is not able to detect all dual targeted proteins and so the amount of expected number of proteins with dual targeting properties is apparently underestimated. Supporting evidence comes from the analysis of the yeast proteome (Dinur-Mills et al., 2008), which shows dual targeting is a widely abundant incidence. Taken together, it would not be surprising if several hundred of nuclear encoded proteins of the model plant *Arabidopsis thaliana* with the capacity to target both mitochondria and chloroplast will be found.

Organelle specificity also depends on cytosolic factors or the passenger protein

In a few cases, inconsistent results were obtained with *in vivo* and *in organello* analyses. In three cases, dual targeting was found with the *in organello* but not with the *in vivo* approaches whereas in one case the exactly opposite result was obtained. Although the transit peptide of the precursor protein is a predominant feature in protein targeting specificity, other factors also play a role in this process. For example cytosolic sorting mechanisms or the mature part of the precursor protein influence the organelle specificity. One obvious disadvantage of the *in vivo* experiments is that only chimeric reporter constructions can be used to visualise the subcellular localisation in plant tissue. To rule out that the inconsistent results of the four candidates is caused by the artificial passenger EYFP or the absent of the cytosol we performed further *in organello* experiments with the respective chimeric reporter construction as substrate (Figure 5). It turned out that these chimeric reporter proteins are capable to be imported into isolated mitochondria as well as chloroplasts. Consequently the three candidates GAPDH, SHBP and DXPS show dual targeting properties in the *in organello* transport experiments irrespective if the authentic or the chimeric reporter protein were used. Hence, the monospecific targeting to exclusively plastids *in vivo* is realised by regulatory factors of the cytosol that prevents "mistargeting" to the mitochondria. Nevertheless the capacity of the organelle to recognise and take up a foreign passenger protein demonstrates the similar endosymbiotic origin of both transport machineries.

In contrast to that, the NADH show monospecific targeting exclusively to mitochondria as authentic polypeptide but dual targeting behaviour as chimeric reporter construction *in organello* as well as *in vivo*. Therefore, the observed discrepancy is apparently caused by the passenger protein EYFP, i.e. some important elements in the mature part of the NADH that prevent transport into the "wrong" organelle are absent in the chimeric protein und resulted in to an import additionally into chloroplasts. Further evidence that the mature part plays role in organelle specificity is demonstrated by the analysis of Kavanagh et al., 1988, Chew and Whelan (2003) or Carrie et al. (2008). A combination of several experimental approaches can avoid misinterpretation concerning the intracellular sorting mechanisms. Unfortunately only few proteins with dual targeting properties have got been studied in such a way but this should be a future challenge in this area.

Why so much dual targeting?

Our results show an unexpected high number of dual targeted proteins which strongly suggests that dual targeting is an abundant phenomenon. Some of these proteins might provide a function in both target organelles because mitochondria and chloroplasts share many common enzymatic steps that are catalysed by location-specific proteins. For example the aminoacyl-tRNA synthetases (Duchêne et al., 2005) are essential for translation within either of the organelles, just as well the RNA polymerase RpoT2 (Hedtke et al., 2000) or the glutathione reductase (Creissen et al., 1995). On the other hand functionality of a given protein is not necessary a prerequisite for its import as demonstrated by the dual targeting behaviour of cytochrome *c_t*, for which a function in chloroplasts is not at all likely (Rödiger et al., 2011). And of course, also some of the proteins with expected dual targeting properties might be functional in only one of the two organelles. Thus, it is surprisingly why such proteins are dual targeted to both organelles. It raises the possibility that protein sorting between mitochondria and chloroplasts is not strictly specific. Instead, it might be acceptable for the cell as long as the degree of mistargeting into the "wrong" organelle is not sufficiently harmful to cause negative selective pressure. In those instances where the protein provides a function in both organelles, dual targeting properties might allow faster response to changing physiological environments. In all other cases, it might be an option for the cell to develop new functions (Martin, 2010). Consequently latent dual targeting to these both organelles could be the rule for proteins that are so far assumed to be monospecific and is not an exception among mitochondrial and chloroplast transit peptides. It might instead represent an evolutionary remnant of the development of transit peptides (Staiger et al., 2009).

METHODS

Selection of candidate proteins and prediction of their subcellular localisation

The databases of the non-redundant genes encoding proteins from *Arabidopsis thaliana*, *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Yang and McFadden, 1994, Kaneko et al., 2003, Kaneko et al., 1996), *Nostoc* sp. PCC 7120 (Kaneko et al., 2001), *Thermosynechococcus elongatus* BP-1 (Nakamura et al., 2002), *Rickettsia prowazekii* strain Madrid E (Andersson et al., 1998), *Caulobacter crescentus* strain CB15 (Niermann et al., 2001), *Rhizobium meliloti* strain 1021 (Barnett et al., 2001, Finan et al., 2001, Galibert et al., 2001, Capela et al., 2001) were taken from the European Bioinformatics Institute server (<http://www.ebi.ac.uk/integr8>). Protein sequences deduced from the *Arabidopsis thaliana* genome were aligned with those of the selected representatives of both cyanobacteria and alpha-proteobacteria by using the BlastP algorithm (Altschul et al., 1990 & 1997) (algorithm parameter: expect value $\leq 10^{-10}$). Approximately 2000 proteins passed both alignments and were further analysed concerning their predicted subcellular localisation. The prediction of subcellular localisation of candidate proteins was performed using the software package TargetP V1.0 (Emanuelsson et al., 2000) using 'plant' mode without cutoff restrictions. Protein sequences passing the arbitrary threshold level $mTP + cTP \geq 0.8$ (~ 700 in total) were

ranked using their difference score of predicted subcellular localisation ($Abs |mTP - cTP|$) and used as some for candidates.

Reporter constructions

Full-size cDNA clones encoding the authentic candidate proteins from *Arabidopsis thaliana* were obtained from the Arabidopsis Biological Resource Center (USA) and the "Institut National de la Recherche Agronomique" (France). The reporter constructions encoding the fusion proteins were generated by PCR amplification as described in Rödiger et al. (2011).

All chimeric constructions as well as the authentic cDNAs were cloned with the two plasmid vectors pBAT (Annweiler et al., 1991) and pRT100 Ω /*Not*/*Asc* (Überlacker and Werr, 1996), which are suitable for *in vitro* transcription and transient gene expression in plants, respectively.

Protein transport experiments

In organello experiments were performed as described in Rödiger et al. (2010). Biolistic transformation of epidermal cells of pea leaves followed the protocol published in Rödiger et al. (2011). Confocal laser scanning microscopy after transient expression was performed according to Baudisch and Klösgen (2011).

Miscellaneous

Gel electrophoresis of proteins under denaturing conditions was carried out according to Laemmli (1970). The gels were exposed to phosphorimaging screens and analysed with a Fujifilm FLA-3000 (Fujifilm, Düsseldorf, Germany) using the software packages BASReader (version 3.14) and AIDA (version 3.25) (Raytest, Straubenhardt, Germany). Protein concentration was determined according to Bradford (1976), chlorophyll concentration according to Arnon (1949). All other methods followed published protocols (Sambrook and Russell, 2001).

FIGURES AND FIGURE LEGENDS

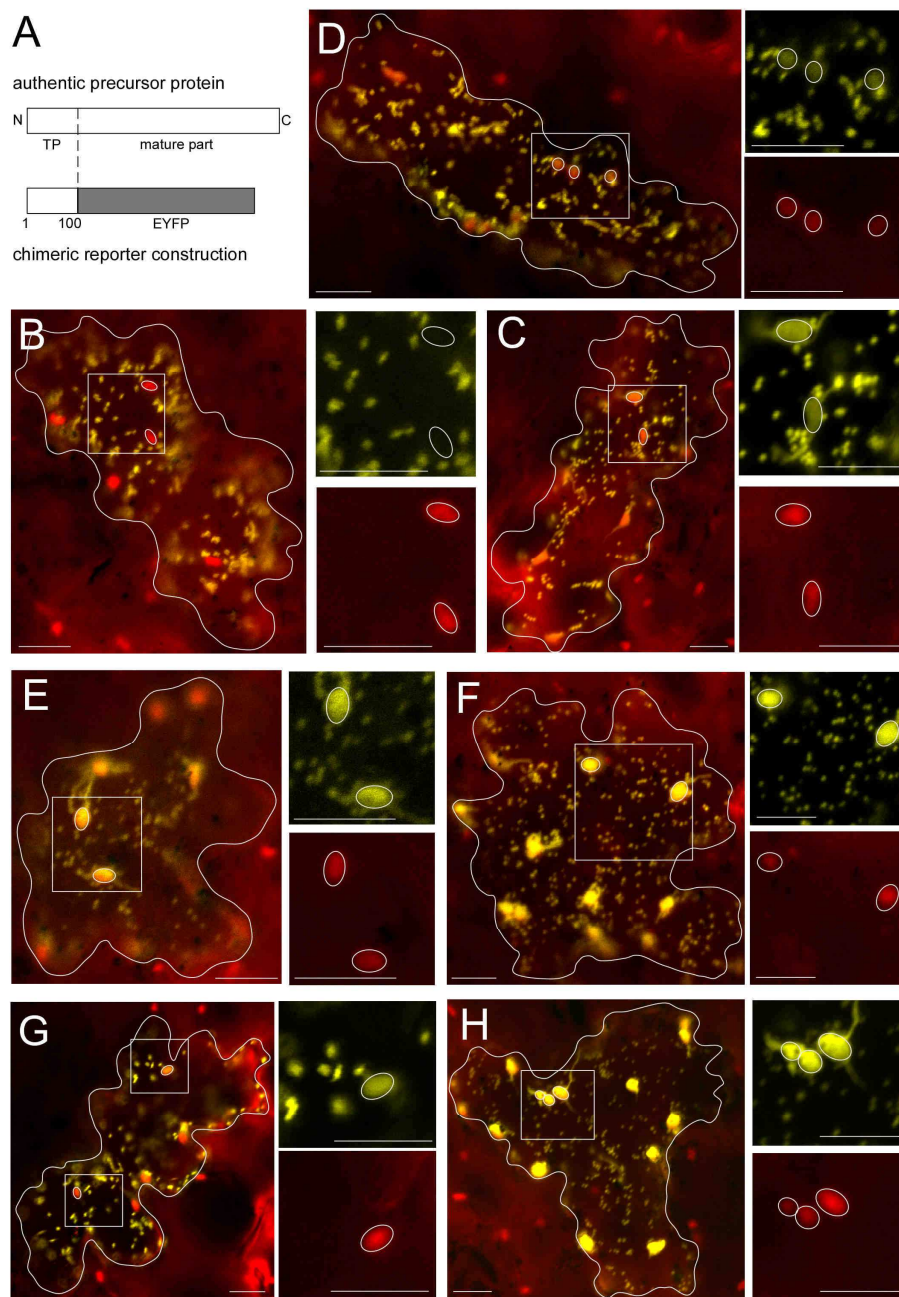


Figure 1. Subcellular localization of chimeric reporter constructions of the candidate proteins of class I+II in epidermal cells of pea leaves.

(A) Schematic representation of a *chimeric reporter construction* consisting of N-terminal 100 amino acids (*white boxes*) fused to EYFP (*grey boxes*). The *authentic precursor protein* consisting of the transit peptide (*TP*) and the *mature part* is depicted for comparison.

(B-H) The coding sequences of ATPS(1-100)/EYFP (B), GCS(1-100)/EYFP (C), EF-Tu(1-100)/EYFP (D), OhmT(1-100)/EYFP (E), GrpE(1-100)/EYFP (F), AntS(1-100)/EYFP (G), and PDF(1-100)/EYFP (H) were transiently expressed under the control of the 35S CaMV promoter after biolistic transformation of leaf epidermis cells of pea and analysed by confocal laser scanning microscopy. Overlay pictures of both the YFP channel (displayed in *yellow*) and the chlorophyll channel (displayed in *red*) are shown. The borders of the transformed cells are depicted by a continuous *white line*. The *squares* highlight areas of the transformed cells that are shown in higher magnification separately for the YFP channel (*upper panels*) and the chlorophyll channel (*lower panels*). The position of representative plastids of each cell is encircled for better visualization. The scale bars correspond to 10 μm .

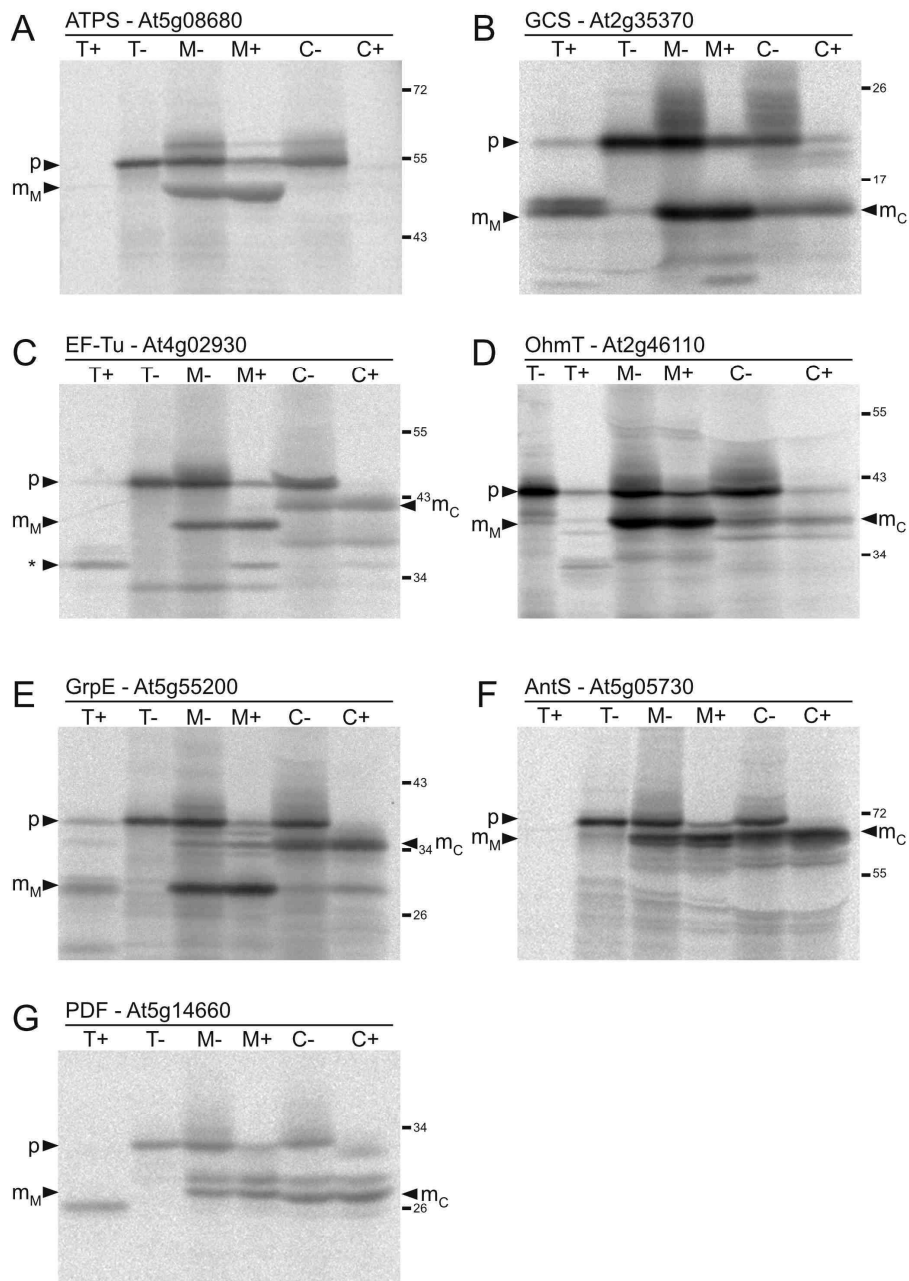


Figure 2. *In organello* protein transport experiments of candidate proteins of class I+II with isolated pea organelles.

Radiolabelled precursor of ATPS (A), GCS (B), EF-Tu (C), OhmT (D), GrpE (E), AntS (F), and PDF (G) from *Arabidopsis thaliana* was obtained by coupled *in vitro* transcription/translation of the corresponding cDNA clone and incubated for 20 min at 25 °C with either intact mitochondria (*lanes M*) or chloroplasts (*lanes C*) from pea (*single assays*). After the import reaction, the organelles were recovered by centrifugation and treated with thermolysin (*lanes M+*, *C+*) or mock-treated (*lanes M-*, *C-*). Stoichiometric amounts of each fraction corresponding to 50 µg protein (mitochondria) or 12.5 µg chlorophyll (chloroplasts) were separated on 7.5-12.5 % SDS polyacrylamide gradient gel and visualised by phosphorimaging. Aliquots of the *in vitro* translation assays (1 µl, corresponding to 10 % of the protein added to each import reaction) were loaded in *lanes TL*. The position of precursor protein (*p*) and terminal processing products accumulating in mitochondria (*m_M*) and chloroplasts (*m_C*) are indicated by arrowheads. The size of molecular marker proteins is given in kDa.

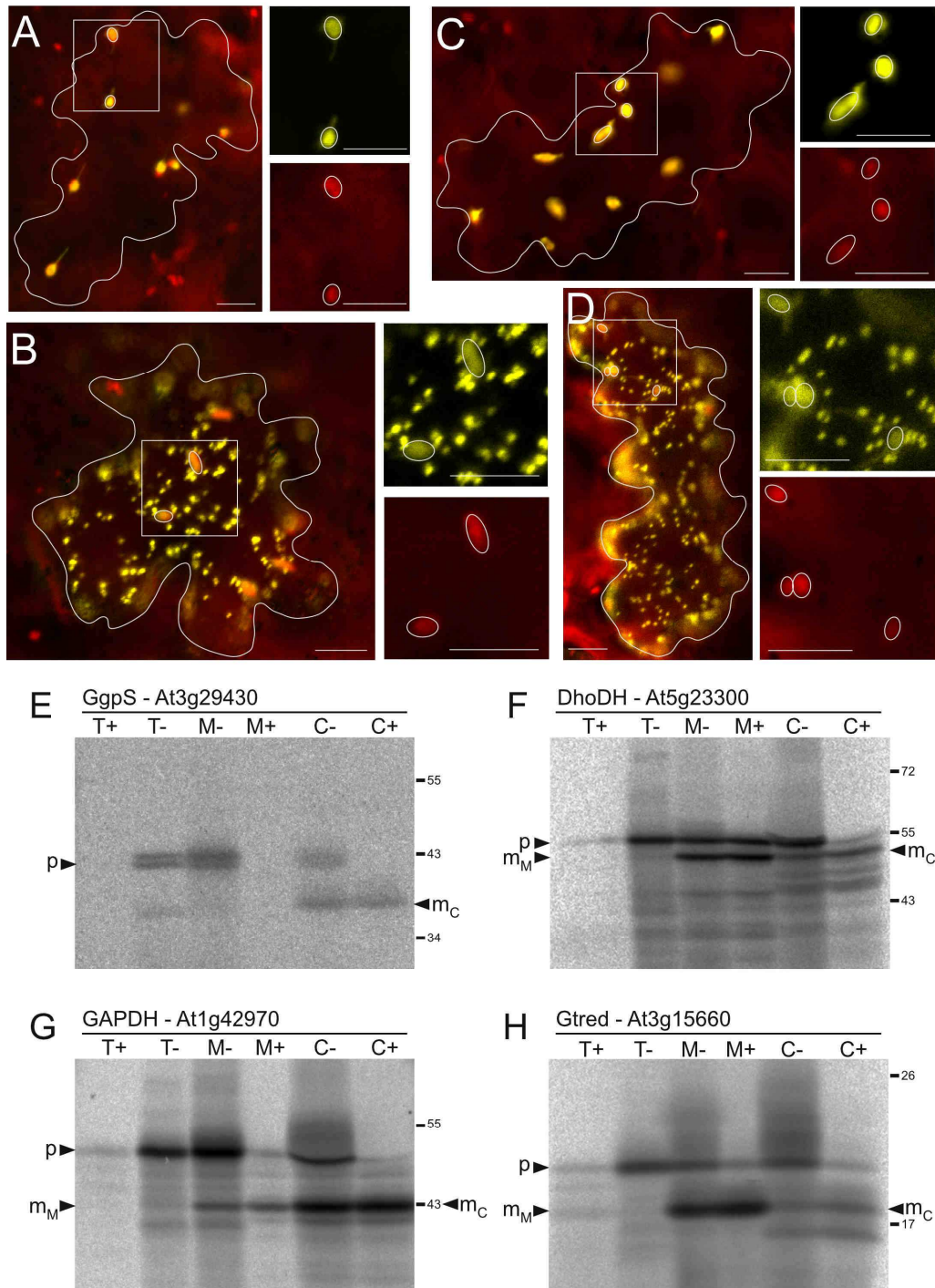


Figure 3. Targeting specificity of the candidate proteins of class III.

(A-D) The coding sequences of GgpS(1-100)/EYFP (A), DhoDH(1-100)/EYFP (B), GAPDH(1-100)/EYFP (C), and Gtred(1-100)/EYFP (D) were transiently expressed under the control of 35S CaMV promoter after biolistic transformation of leaf epidermis cells of pea and analysed by confocal laser scanning microscopy. For further details, see the legend to Figure 1.

(E-H) *In organello* protein transport experiments with GgpS (E), DhoDH (F), GAPDH (G), and Gtred (H). For further details, see the legend to Figure 2.

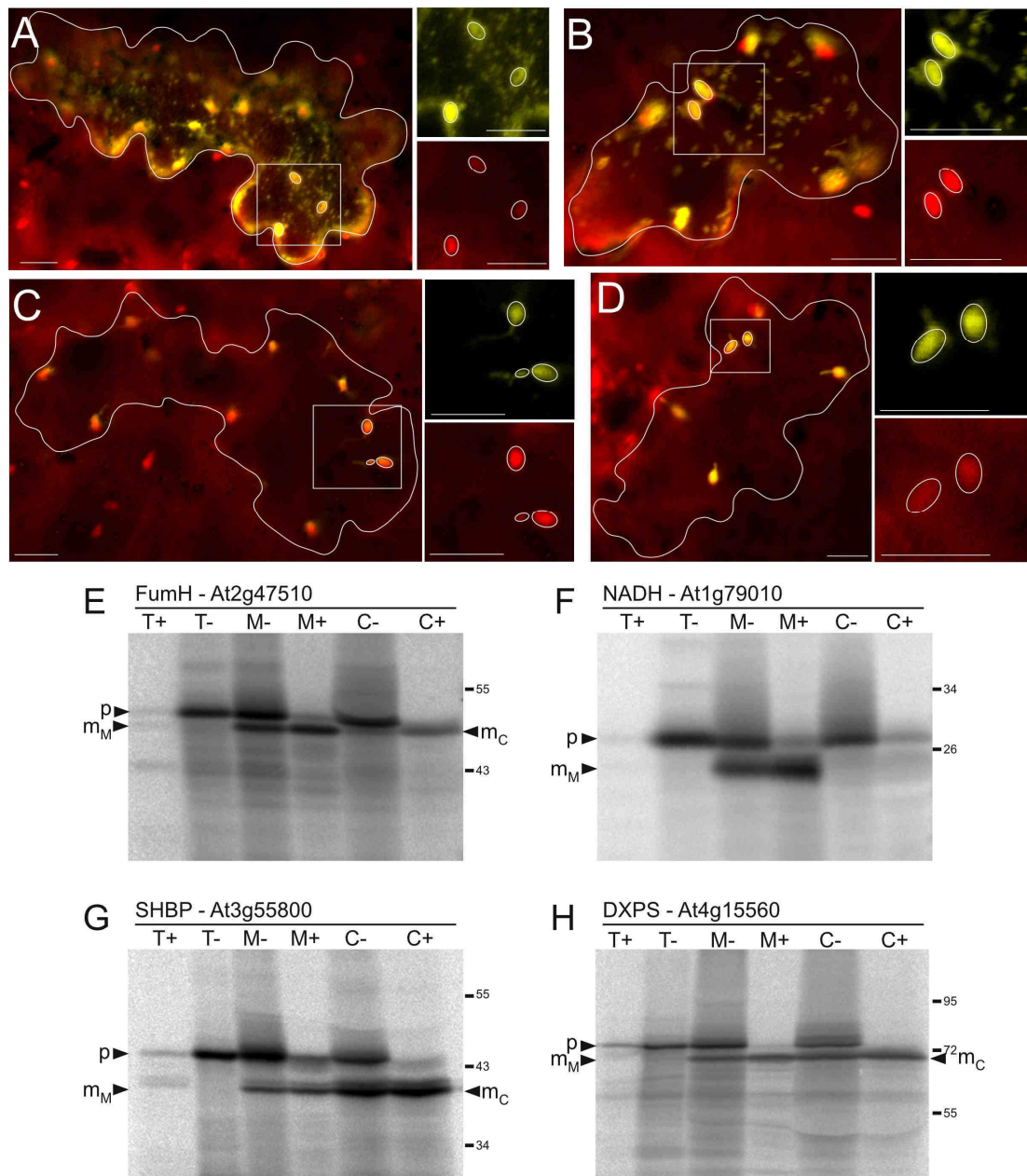


Figure 4. Targeting specificity of the candidate proteins of class IV.

(A-D) The coding sequences of FumH(1-100)/EYFP (A), NADH(1-100)/EYFP (B), SHBP(1-100)/EYFP (C), and DXPS(1-100)/EYFP (D) were transiently expressed under the control of 35S CaMV promoter after biolistic transformation of leaf epidermis cells of pea and analysed by confocal laser scanning microscopy. For further details, see the legend to Figure 1.

(E-H) *In organello* protein transport experiments with FumH (E), NADH (F), SHBP (G), and DXPS (H). For further details, see the legend to Figure 2.

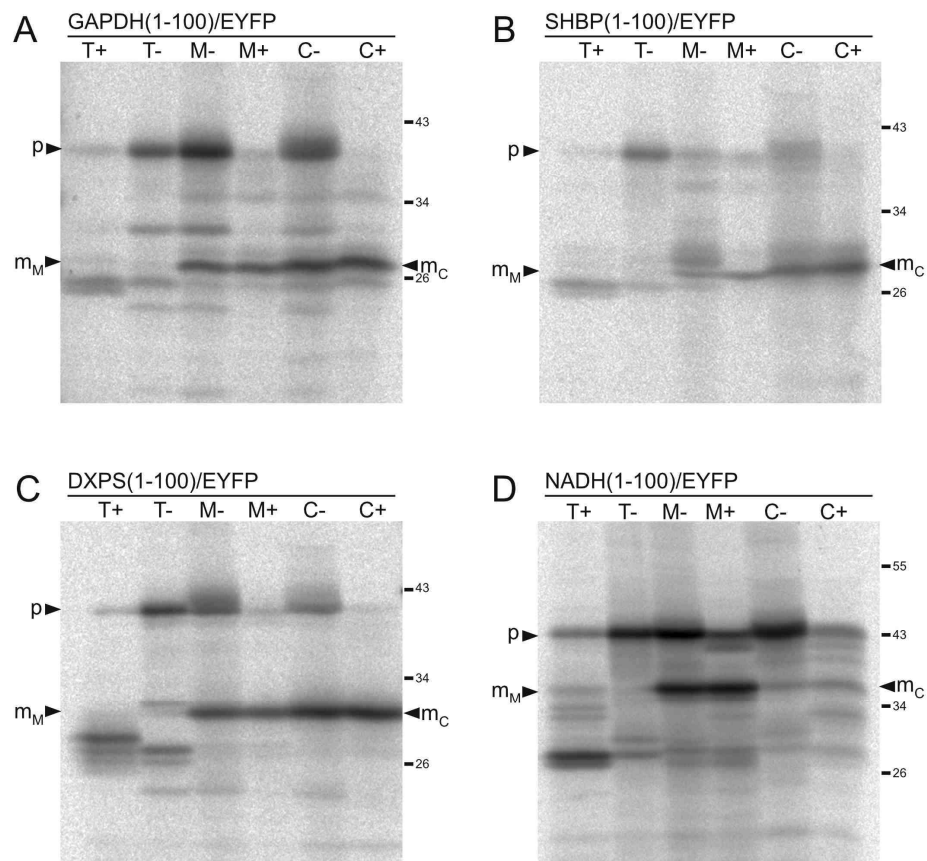


Figure 5. Organelle specificity of chimeric reporter proteins.

In organello protein transport experiments with GAPDH(1-100)/EYFP (A), SHBP(1-100)/EYFP (B), DXPS(1-100)/EYFP (C), and NADH(1-100)/EYFP (D) into isolated mitochondria and chloroplasts. For further details, see the legend to Figure 2.

TABLES

Table 1. Classification of homologous sequences of *A. thaliana* based on prediction scores of mitochondria and chloroplast targeting peptide (mTP, cTP) identified by TargetP

Sub-Group	Abs cTP – mTP	Number	Class
A	≤ 0.1	39	I
B	> 0.1 ≤ 0.2	26	II
C	> 0.2 ≤ 0.3	29	III
D	> 0.3 ≤ 0.4	37	
E	> 0.4 ≤ 0.5	48	
F	> 0.5 ≤ 0.6	60	
G	> 0.6 ≤ 0.7	66	
H	> 0.7 ≤ 0.8	103	
I	> 0.8 ≤ 0.9	140] IV
J	> 0.9	103	

Table 2. Selected candidate proteins identified by the *in silico* approach

Class	Gene Identifier	Accession	Annotation	Abbr.	TargetP			Prediction
					C*	M*	Abs cTP – mTP	
I	At5g08680	Q9C5A9	ATP synthase subunit beta-3	ATPS	0.808	0.827	0.019	M/C
	At2g35370	P25855	Glycine cleavage system H protein 1	GCS	0.619	0.639	0.020	M/C
	At3g16480	O04308	Probable mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-2	α-MPP2	0.575	0.643	0.068	M/C
	At4g02930	Q9ZT91	Elongation factor Tu	EF-Tu	0.556	0.470	0.086	M/C
II	At2g46110	O82357	3-methyl-2-oxobutanoate hydroxy-methyl-transferase	OhmT	0.568	0.435	0.133	M/C
	At5g55200	Q9FLP3	GrpE protein homolog	GrpE	0.601	0.743	0.142	M/C
	At5g05730	P32068	Anthranilate synthase component I-1	AntS	0.657	0.470	0.187	M/C
	At5g14660	Q9FUZ2	Peptide deformylase 1B	PDF	0.739	0.547	0.192	M/C
III	At3g29430	Q9LIA0	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase 11	GgpS	0.462	0.665	0.203	M/C
	At5g23300	P32746	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)	DhoDH	0.474	0.681	0.207	M/C
	At1g42970	P25857	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B	GAPDH	0.674	0.438	0.236	M/C
	At3g15660	Q8LBK6	Monothiol glutaredoxin-S15	Gtred	0.346	0.635	0.289	M/C
IV	At2g47510	P93033	Fumarate hydratase 1	FumH	0.071	0.904	0.833	M
	At1g79010	Q42599	NADH dehydrogenase [ubiquinone] iron-sulfur protein 8-A	NADH	0.040	0.949	0.909	M
	At3g55800	P46283	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	SHBP	0.937	0.054	0.883	C
	At4g15560	Q38854	Probable 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase	DXPS	0.956	0.020	0.936	C

Class I-IV, [(cTP + mTP) ≥ 0.8]

Class I, Abs |cTP – mTP| ≤ 0.1; Class II, Abs |cTP – mTP| > 0.1 ≤ 0.2; Class III, Abs |cTP – mTP| > 0.2 ≤ 0.3; Class IV, Abs |cTP – mTP| > 0.8;

M, mitochondrion; C, chloroplast; *, likelihood of organellar import; Abs |cTP – mTP|, absolute difference

REFERENCES

- Akashi, K., Grandjean, O., and Small, I. (1998). Potential dual targeting of an Arabidopsis archaeobacterial-like histidyl-tRNA synthetase to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Letters* **431**,39-44.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* **215**,403-410.
- Altschul, S.F., et al. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**,3389-3402.
- Andersson, S.G., et al. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**,133-140.
- Annweiler, A., Hipskind, R.A., and Wirth, T. (1991). A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res* **19**,3750.
- Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol* **24**,1-15.
- Barnett, M.J., et al. (2001). Nucleotide sequence and predicted functions of the entire *Sinorhizobium meliloti* pSymA megaplasmid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,9883-9888.
- Baudisch, B., and Klösgen, R.B. (2011). Dual Targeting of a Processing Peptidase into Both Endosymbiotic Organelles Mediated by a Transport Signal of Unusual Architecture. *Mol Plant*. doi: 10.1093/mp/ssr092
- Berglund, A.-K., et al. (2009). Dual Targeting to Mitochondria and Chloroplasts: Characterization of Thre-tRNA Synthetase Targeting Peptide. *Mol Plant* **2**,1298-1309.
- Bock, R., and Timmis, J.N. (2008). Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays* **30**,556-566.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**,248-254.
- Capela, D., et al. (2001). Analysis of the chromosome sequence of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti* strain 1021. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,9877-9882.
- Carrie, C., et al. (2009a). Approaches to defining dual-targeted proteins in Arabidopsis. *Plant J* **57**,1128-1139.
- Carrie, C., Giraud, E., and Whelan, J. (2009b). Protein transport in organelles: Dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS Journal* **276**,1187-1195.
- Carrie, C., et al. (2008). Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett* **582**,3073-3079.
- Chew, O., and Whelan, J. (2003). Dual targeting ability of targeting signals is dependent on the nature of the mature protein. *Functional Plant Biol.* **30**,805-812.
- Chow, K.S., Singh, D.P., Roper, J.M., and Smith, A.G. (1997). A single precursor protein for ferrochelatase-I from Arabidopsis is imported in vitro into both chloroplasts and mitochondria. *J Biol Chem* **272**,27565-27571.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P. (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* **8**,167-175.
- Dinkins, R.D., Conn, H.M., Dirk, L.M.A., Williams, M.A., and Houtz, R.L. (2003). The Arabidopsis thaliana peptide deformylase 1 protein is localized to both mitochondria and chloroplasts. *Plant Science* **165**,751-758.
- Dinur-Mills, M., Tal, M., and Pines, O. (2008). Dual Targeted Mitochondrial Proteins Are Characterized by Lower MTS Parameters and Total Net Charge. *PLoS ONE* **3**,e2161.
- Douglas, S.E. (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* **8**,655-661.
- Duchêne, A.-M., et al. (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**,16484-16489.

- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G. (2000). Predicting Subcellular Localization of Proteins Based on their N-terminal Amino Acid Sequence. *Journal of Molecular Biology* **300**,1005-1016.
- Finan, T.M., et al. (2001). The complete sequence of the 1,683-kb pSymB megaplasmid from the N₂-fixing endosymbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**,9889-9894.
- Galibert, F., et al. (2001). The composite genome of the legume symbiont *Sinorhizobium meliloti*. *Science* **293**,668-672.
- Giglione, C., Serero, A., Pierre, M., Boisson, B., and Meinnel, T. (2000). Identification of eukaryotic peptide deformylases reveals universality of N-terminal protein processing mechanisms. *EMBO J* **19**,5916-5929.
- Giovannoni, S.J., Turner, S., Olsen, G.J., Barns, S., Lane, D.J., and Pace, N.R. (1988). Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J Bacteriol* **170**,3584-3592.
- Gray, M.W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Curr Opin Genet Dev* **9**,678-687.
- Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J., Verboom, R.E., and Millar, A.H. (2005). Combining experimental and predicted datasets for determination of the subcellular location of proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**,598-609.
- Heazlewood, J.L., Verboom, R.E., Tonti-Filippini, J., Small, I., and Millar, A.H. (2007). SUBA: the *Arabidopsis* Subcellular Database. *Nucleic Acids Res* **35**,D213-D218.
- Hedtke, B., Börner, T., and Weihe, A. (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* **1**,435-440.
- Herman, P.L., Ramberg, H.k., Baack, R.D., Markwell, J., and Osterman, J.C. (2002). Formate dehydrogenase in *Arabidopsis thaliana*: overexpression and subcellular localization in leaves. *Plant Science* **163**,1137-1145.
- Kaneko, T., et al. (2003). Structural analysis of four large plasmids harboring in a unicellular cyanobacterium, *Synechocystis* sp. PCC 6803. *DNA Res* **10**,221-228.
- Kaneko, T., et al. (2001). Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *DNA Res* **8**,205.
- Kaneko, T., et al. (1996). Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res* **3**,109-136.
- Karniely, S., and Pines, O. (2005). Single translation? dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO reports* **6**,420-425.
- Kavanagh, T.A., Jefferson, R.A., and Bevan, M.W. (1988). Targeting a foreign protein to chloroplasts using fusions to the transit peptide of a chlorophyll a/b protein. *Mol Gen Genet* **215**,38-45.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**,680-685.
- Martin, and Herrmann (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**,9-17.
- Martin, W. (2010). Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**,847-855.
- Mireau, H., Lancelin, D., and Small, I.D. (1996). The same *Arabidopsis* gene encodes both cytosolic and mitochondrial alanyl-tRNA synthetases. *Plant Cell* **8**,1027-1039.
- Morgante, C.V., Rodrigues, R.A.O., Marbach, P.A.S., Borgonovi, C.M., Moura, D.S., and Silva-Filho, M.C. (2009). Conservation of dual-targeted proteins in *Arabidopsis* and rice points to a similar pattern of gene-family evolution. *Mol Genet Genomics* **281**,525-538.
- Nakai, K., and Horton, P. (1999). PSORT: a program for detecting sorting signals in proteins and predicting their subcellular localization. *Trends Biochem Sci* **24**,34-36.
- Nakamura, Y., et al. (2002). Complete genome structure of the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1. *DNA Res* **9**,123-130.
- Nierman, W.C., et al. (2001). Complete genome sequence of *Caulobacter crescentus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**,4136-4141.

- Peeters, N., and Small, I. (2001). Dual Targeting to Mitochondria and Chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* **1541**,54-63.
- Pujol, C., Bailly, M., Kern, D., Maréchal-Drouard, L., Becker, H., and Duchêne, A.-M. (2008). Dual-targeted tRNA-dependent amidotransferase ensures both mitochondrial and chloroplastic Gln-tRNA^{Gln} synthesis in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**,6481-6485.
- Rödiger, A., Baudisch, B., and Bernd Klösigen, R. (2010). Simultaneous isolation of intact mitochondria and chloroplasts from a single pulping of plant tissue. *Journal of Plant Physiology* **167**,620-624.
- Rödiger, A., Baudisch, B., Langner, U., and Klösigen, R.B. (2011). Dual Targeting of a Mitochondrial Protein: The Case Study of Cytochrome c1. *Mol Plant*.
- Sambrook, J., and Russell, D. (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Silva-Filho, M.C. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Current Opinion in Plant Biology* **6**,589-595.
- Small, I., Peeters, N., Legeai, F., and Lurin, C. (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* **4**,1581-1590.
- Staiger, C., Hinneburg, A., and Klosgen, R.B. (2009). Diversity in Degrees of Freedom of Mitochondrial Transit Peptides. *Mol Biol Evol* **26**,1773-1780.
- Ueberlacker, B., and Werr, W. (1996). Vectors with rare-cutter restriction enzyme sites for expression of open reading frames in transgenic plants. *Molecular Breeding* **2**,293-295.
- Wall, M.K., Mitchenall, L.A., and Maxwell, A. (2004). *Arabidopsis thaliana* DNA gyrase is targeted to chloroplasts and mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**,7821-7826.
- Xu, X.M., and Möller, S.G. (2006). AtSufE is an essential activator of plastidic and mitochondrial desulfurases in *Arabidopsis*. *EMBO J* **25**,900-909.
- Yang, X., and McFadden, B.A. (1994). The complete DNA sequence and replication analysis of the plasmid pCB2.4 from the cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803. *Plasmid* **31**,131-137.

SUPPLEMENTARY DATA

Table S1: siehe beigelegte Daten-CD

DISKUSSION

1 Mitochondrien und Chloroplasten können simultan in hoher Reinheit präpariert werden

Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Transportverhalten mitochondrieller sowie plastidärer Proteine unterschiedlicher Pflanzenarten untersucht. Für die dazu notwendigen *in organello* Transportversuche war eine Präparationsmethode essentiell, die eine Isolierung sowohl der Mitochondrien als auch der Chloroplasten in hoher Reinheit ermöglicht. Während die Präparation von Chloroplasten eine Standardmethode für physiologische und biochemische Fragestellungen ist (z. B. Brock et al., 1993), existieren nur wenige Protokolle zur Isolierung der Mitochondrien. Zudem wurde dafür in den meisten Fällen nicht-grünes Pflanzengewebe als Ausgangsmaterial verwendet (Braun et al., 1992^b; Klein et al., 1998), um Kontaminationen mit Chloroplasten zu vermeiden. Darüber hinaus wurden in vielen Analysen dualer Proteine bisher Organellen aus verschiedenen Geweben bzw. Pflanzen mit unterschiedlichen physiologischen Adaptionszuständen verwendet (z. B. Menand et al., 1998; Chew et al., 2003; Duchêne et al., 2005), die die Importeigenschaften von Proteinen beeinflussen und zu Fehlinterpretationen führen können (Dahlin and Cline, 1991; Murcha et al., 1999). Eine simultane Präparation von importkompetenten Mitochondrien und Chloroplasten aus grünem Gewebe verschiedener Pflanzen mit der in unserer Arbeitsgruppe etablierten Methode vermeidet diese Einschränkung und ermöglicht den Vergleich der Transporteigenschaften beider Organellen, was besonders wichtig für die Analyse dualer Proteine ist.

Die Überprüfung der Reinheit von simultan isolierten Mitochondrien und Chloroplasten aus grünem Pflanzengewebe mittels mikroskopischer und immunologischer Analysen zeigen zwar eine marginale Kontamination der jeweiligen Organellfraktion mit Membranvesikeln des anderen Organelltyps aber belegen zweifelsfrei, dass keine intakten Chloroplasten in der Mitochondrienfraktion und umgekehrt präsent sind (siehe Kapitel 1, Abschnitt 1.2). Des Weiteren sind die simultan präparierten Organellen sowohl aus Erbse als auch aus Spinat importkompetent und transportieren spezifisch die jeweiligen Substrate mtRieske und OEC33. Ein Unterschied in der Effizienz oder Spezifität dieser Importreaktionen im Vergleich zu einzeln präparierten Organellen konnte nicht festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Damit übereinstimmend konnten auch Whelan et al. (1990) am Beispiel des OEC33 aus Weizen zeigen, dass isolierte Spinat-Chloroplasten ihr Substrat spezifisch importieren wohingegen die Mitochondrien keinen Transport zeigen. Im Gegensatz dazu konnten Cleary et al. (2002) beobachten, dass Mitochondrien aus Erbse unspezifisch plastidäre Proteine, wie bspw. OEC33 aus Weizen, importieren können. Ein derartiges Verhalten von Erbsen-Mitochondrien konnte in unseren Analysen nicht beobachtet werden. Der Grund für diese Diskrepanz ist unklar, da Cleary et al. (2002) Verunreinigungen der Mitochondrien-Fraktion mit Chloroplasten ausschließen konnten. Demzufolge sind z. B. unterschiedliche Inkubationsbedingungen oder die Präparation beider Organellen aus Pflanzen mit verschiedenem Alter als Ursachen denkbar.

2 Die mitochondrialen Proteine Cytochrom c_1 und α -MPP2 werden auch in die Chloroplasten transportiert

Mit Hilfe von *in organello* Transportexperimenten konnten sowohl das Cytochrom c_1 aus Kartoffel als auch die α -MPP2 aus *A. thaliana* in den Mitochondrien und zusätzlich in den Chloroplasten nachgewiesen werden (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.2 sowie Kapitel 3, Abschnitt 3.2). Analysen zur subzellulären Lokalisierung verschiedener chimärer Reporterkonstruktionen bestätigten die duale Lokalisierung dieser Substrate. Beide Proteine sind somit zum *dual targeting* befähigt.

Das Cyt c_1 wurde darüber hinaus auch immunologisch in beiden Organellen aus Erbsen, Spinat und Kartoffelpflanzen detektiert (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.2), was mit dem Nachweis von Cyt c_1 Homologen aus *A. thaliana* mittels Proteomanalyse von Chloroplasten aus *Albino*-Mutanten einhergeht. Demzufolge besitzt das Transitpeptid des Cyt c_1 nicht nur die Kompetenz das Protein in beide Organellen zu dirigieren sondern das prozessierte Protein ist auch in der authentischen Pflanzensituation in den Chloroplasten vorhanden. Das Cyt c_1 ist nach dem Import in den Chloroplasten über mehrere Stunden nachweisbar, wird also nicht degradiert, was zeigt, dass Cyt c_1 nicht als falsches Protein innerhalb des Organells erkannt wird. Dennoch scheint eine Funktion von Cyt c_1 in den Chloroplasten unwahrscheinlich, da das Cyt c_1 ausschließlich im Stroma akkumuliert und demnach vermutlich nicht in den photosynthetischen Elektronentransport involviert ist wie analog zu seiner Funktion in den Mitochondrien. Demzufolge unterscheidet sich Cyt c_1 erheblich von den bisherigen dualen Proteinen, die in der Literatur beschrieben wurden (zusammengefasst in Carrie et al., 2009^b). Typische Beispiele sind die Glutathionreduktase (Creissen et al., 1995), RNA-Polymerase RpoT2 (Hedtke et al., 2000) und die Mehrzahl der Vertreter der Familie der Aminoacyl-tRNA Synthetasen (Small et al., 1999; Duchêne et al., 2005). Bei diesen dualen Proteinen ist eine Funktion in beiden Organellen plausibel und wurde in einigen Fällen bereits nachgewiesen. Damit ist auch die Notwendigkeit für den energetischen und logistischen Aufwand der Zelle diese Proteine an beiden Orten zu positionieren, erklärbar. Aber warum ist Cyt c_1 ohne offensichtliche Funktion im Chloroplasten dennoch dort lokalisiert? Möglicherweise ist die Suche nach einer Funktion in beiden Organellen für dieses Protein irreführend. Vielmehr könnte die duale Lokalisierung des Cyt c_1 auf eine Unspezifität bei der Verteilung des Proteins zwischen Mitochondrien und Chloroplasten zurückzuführen sein, die von der Zelle toleriert wurde weil es keinen physiologischen Nachteil verursachte und somit kein Selektionsdruck vorlag. Die Bedeutung dieser Annahme für den dualen Proteintransport wird im Abschnitt 6 ausführlich diskutiert.

Eine Funktion der α -MPP2 im Chloroplasten ist, ähnlich wie beim Cyt c_1 , auf den ersten Blick unwahrscheinlich, da die enzymatische Aktivität der MPP strikt von der Gegenwart der beiden Untereinheiten, der α - und der β -MPP, abhängt (Geli, 1993; Saavedra-Alanis et al., 1994). Tatsächlich lieferten jedoch Proteomanalysen aus *A. thaliana* erste Hinweise, dass sowohl die α -MPP1 als auch die β -MPP auch im Chloroplasten präsent sind (Kleffmann et al., 2004). *In organello* Transportexperimente mit beiden Proteinen bestätigen die Annahme, dass neben der α -MPP2 auch die beiden weiteren Untereinheiten der MPP aus *A. thaliana* im Chloroplasten lokalisiert sind (Abb. 11) und sich somit durchaus ein funktionelle

Prozessierungspeptidase in den Chloroplasten ausbilden könnte. Auch der Co-Faktor Zink, der für die katalytische Aktivität der MPP essentiell ist, ist im Chloroplasten vorhanden, da die SPP ebenfalls dieses Metall zur Prozessierung benötigt (siehe Einleitung, Abschnitt 4.3). Darüber hinaus wurde die duale Lokalisierung einer mitochondrialen Protease, der Zink-Metalloprotease aus *A. thaliana*, nachgewiesen (Bhushan et al., 2003), die ebenfalls ein Vertreter der M16 Metalloendoprotease-Familie ist. Für dieses Enzym wurde demonstriert, dass es sowohl mitochondrielle als auch plastidäre Transitpeptide proteolytisch degradieren kann (Bhushan et al., 2003) und demnach höchstwahrscheinlich in beiden Organellen eine funktionelle Rolle spielt. Um auch eine katalytische Aktivität bzw. Assemblierung der MPP im Chloroplasten nachzuweisen, sind allerdings weiterführende Analysen notwendig. Dazu zählt unter anderem die Untersuchung des Assemblierungsverhaltens der MPP-Untereinheiten mittels nativer Gelelektrophoresetechnik. Ungeachtet dessen ist, wie schon zuvor beim Cytc1, eine Funktion in beiden Organellen nicht die Voraussetzung für eine duale Lokalisierung.

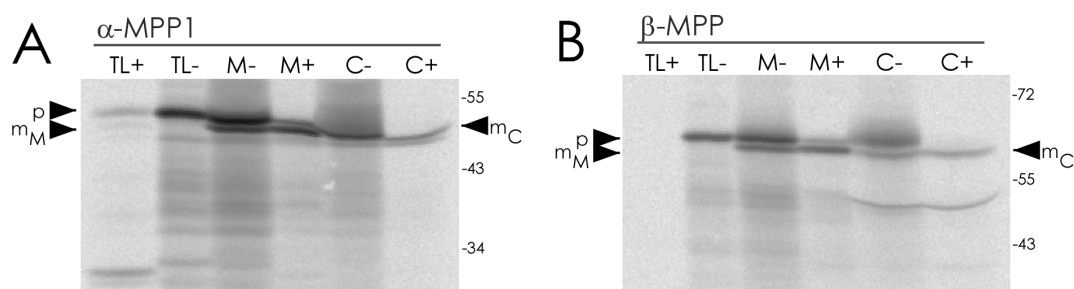


Abbildung 11: Die Untereinheiten der MPP sind in den Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiert.

In organello Transportexperimente der α -MPP1 (At1g51980) (A) und der β -MPP (At3g02090) (B) aus *A. thaliana*. Beide Vollängen cDNA-Klone, die für das jeweilige Protein codieren wurden vom *Arabidopsis Biological Resource Center* (USA) bezogen. Weitere Details sind in den Legenden zu Abb. 6 und Abb. 8 aufgeführt.

3 Der Transport dualer Proteine in die Organellen erfolgt über den generellen Importweg

Wie der Transport der dualen Proteine in die Organellen erfolgt ist derzeit durch zwei Modelle vorstellbar (Peeters and Small, 2001). Zum einen könnten duale Proteine ein besonderes Signal tragen, das von speziellen Rezeptoren eines Importweges erkannt wird den sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten besitzen. Die andere Möglichkeit ist, dass duale Proteine über den identischen Weg über die Hüllmembranen transportiert werden wie die monospezifischen Proteine. Damit duale Transitpeptide von den Rezeptoren der zwei unterschiedlichen Organellen erkannt werden können, müssten diese Transportsignale Eigenschaften von sowohl mitochondrialen als auch plastidären Transitpeptiden aufweisen. Da duale Proteine tatsächlich Merkmale der Transitpeptide beider Organelltypen tragen (Peeters and Small, 2001; Pujol et al., 2007), scheint das zweite Modell plausibler. Damit übereinstimmend zeigen die Konkurrenzexperimente dieser Arbeit, dass in Gegenwart von ansteigenden Konzentrationen an plastidären Photosyntheseproteinen FNR oder OEC33 der Import in die Chloroplasten der vier analysierten dualen Proteine Cytc1, α -MPP2, GrpE sowie EF-Tu

signifikant und spezifisch reduziert wird (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.2 sowie Kapitel 3, Abschnitt 3.2 und 3.3.1). Demzufolge werden sowohl die plastidären als auch die dualen Proteine über Untereinheiten der TOC/TIC-Komplexe transportiert. Ein ähnliches Ergebnis zeigen die Experimente, bei denen überexprimiertes Cytc1 zur Konkurrenz des Transports eingesetzt wurde (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.3.1). Das duale Cytc1 kann ebenfalls den plastidären Import von monospezifischen als auch dualen Substraten konkurrieren. Darüber hinaus wurde Cytc1 auch zur Konkurrenz des Mitochondrienimports verwendet. Cytc1 ist zwar kein monospezifisches Mitochondrienprotein aber die Experimente mit Cytc1 in Gegenwart von Transportinhibitoren demonstrieren, dass Cytc1 wie die meisten mitochondrialen Vorläuferproteine abhängig vom elektrochemischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran transportiert wird und sich somit wie ein typisches kerncodiertes Mitochondrienprotein hinsichtlich des Transportmechanismus verhält (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.2). Des Weiteren ist überexprimiertes Cytc1 in der Lage den Import des monospezifischen mtRieske signifikant zu reduzieren (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.3.1), was belegt, dass beide Proteine über Teile der TOM/TIM-Komplexe importiert werden. Da der Import der dualen Substrate ebenfalls in Gegenwart von Cytc1 erheblich reduziert ist, erfolgt der Transport dieser dualen Substrate in die Mitochondrien höchstwahrscheinlich über den Importweg der monospezifischen Proteine. Folglich gelangen duale Proteine offensichtlich über den generellen Transportweg in beide Organellen und werden nicht über einen alternativen Überbrückungsweg in die Mitochondrien (Pfaller et al., 1989) oder Plastiden (Jarvis, 2008) transportiert.

Damit übereinstimmend zeigten *in organello* Konkurrenzexperimente mit einem überexprimierten dualen Transitpeptid der Threonin-tRNA Synthetase ebenfalls einen reduzierten Import sowohl eines monospezifischen Mitochondrien- als auch eines Chloroplastenproteins (Berglund et al., 2009^a). Allerdings ist der Import der dualen Glutathionreduktase in die Mitochondrien unbeeinflusst in *A. thaliana*-Pflanzen mit drei ausgeschalteten *tom20*-Genen im Vergleich zu Wildtyp Pflanzen (siehe Einleitung, Abschnitt 4.1), wohingegen der Import der monospezifischen Mitochondrienproteine drastisch reduziert ist (Lister et al., 2007). Folglich kann die Glutathionreduktase vermutlich andere Rezeptortypen nutzen als die dort verwendeten monospezifischen Mitochondrienproteine. Weitere Analysen zur Identifizierung der Organellrezeptoren zur Erkennung dualer Proteine stehen nach wie vor aus. Da die bisher identifizierten dualen Proteine in verschiedenen Plastidentypen benötigt werden, könnte das ein Hinweis sein, dass unterschiedliche Rezeptoren für den Import der dualen Proteine genutzt werden (Carrie et al., 2009^b). Zum Beispiel weist die TOC159-Familie in *A. thaliana* insgesamt vier Vertreter auf: TOC159, TOC132, TOC120 und TOC90 (Jarvis, 2008). Es ist vorstellbar, dass einer dieser Rezeptoren auf die Erkennung dualer Proteine spezialisiert ist (Carrie et al., 2009^b). Um diese Hypothese experimentell zu belegen können duale Substrate mit Organellen inkubiert werden, bei denen einzelne Rezeptoren selektiv durch die Zugabe von Antikörpern blockiert sind. Eine andere Möglichkeit wäre, Organellen aus Pflanzen zu verwenden, bei denen die codierende Sequenz für einen speziellen Rezeptor ausgeschaltet ist, wie z. B. die Mutante *ppi2*, bei der der plastidäre Hauptrezeptor TOC159 fehlt (Bischof et al., 2011).

4 *Dual targeting* ist ein hoch abundantes Phänomen

Obwohl in den letzten Jahren mehr und mehr duale Proteine identifiziert wurden, ist es weiterhin unklar wie verbreitet dieses Phänomen tatsächlich ist. Die Schwierigkeit einer Abschätzung zum Auftreten des *dual targeting* besteht darin, dass duale Proteine nicht durch versierte computerbasierte Programme ermittelt werden können. Um diese Frage dennoch zu beantworten wurde ein *in silico* Ansatz entwickelt, in dem mit Hilfe von TargetP (Emanuelsson et al., 2000) kerncodierte Proteine mit vorhergesagtem mitochondriellen und plastidären Transitpeptid in *A. thaliana* identifiziert werden konnten (siehe Kapitel 4, Abschnitt 4.2). Die Auswahl der Kandidatenproteine beruht auf der Annahme, dass duale Transitpeptide Eigenschaften von beiden Typen an Transportsignalen tragen, die durch den experimentellen Nachweis, dass duale Proteine über den generellen Transportweg in die Organellen importiert werden, unterstützt wird (siehe Diskussion, Abschnitt 3).

Die experimentelle Analyse identifizierte zehn neue duale Proteine der Mitochondrien und Plastiden, wobei sogar bei den als monospezifisch vorhergesagten Kandidaten *dual targeting* nachgewiesen werden konnte (siehe Kapitel 4). Eine Hochrechnung bezogen auf die Kandidatenliste von ca. 700 Proteinen resultiert in vermutlich mehreren Hundert Proteinen, die zum *dual targeting* befähigt sind. Allerdings sind Hochrechnungen zum *dual targeting* bezogen auf die Gesamtheit der kerncodierten Organellproteine kaum möglich, da etwa die Hälfte der kerncodierten Organellproteine nicht die stringenten Parameter des *in silico* Ansatzes passierten. Aber auch in dieser Gruppe sind eine Vielzahl an Proteinen mit einer dualen Lokalisierung zu vermuten, da die verwendeten Parameter des *in silico* Ansatzes nicht alle duale Proteine erfassen können. So erfüllen z. B. von den ca. 80 bereits publizierten dualen Mitochondrien- und Chloroplastenproteinen (zusammengefasst in Carrie et al., 2009^b; Morgante et al., 2009) nur etwa ein Drittel die von uns angewendeten Parameter zur Identifizierung dualer Proteine. Ebenso wurde lediglich die Hälfte von insgesamt 100 Proteinen, die in Proteomstudien für beide Organellen nachgewiesen wurden (Carrie et al., 2009^a) mit unserem Ansatz erfasst. Hinzu kommen Proteine, die zwar *dual targeting* aufweisen aber aufgrund der Limitierung in der Sensitivität einiger Methoden als Kontamination klassifiziert und somit aus der Liste der dualen Proteine eliminiert werden. Insgesamt sind also mehrere Hundert Proteine zu erwarten, die die Kompetenz besitzen in Mitochondrien und Plastiden transportiert zu werden. Folglich ist *dual targeting* ein hoch abundantes Phänomen, was das Konzept der Proteinsortierung und -funktion neu beleuchtet.

Ein ähnliches Ergebnis zeigten auch die Analysen von Dinur-Mills et al. (2008), die ebenfalls mit einem computergestütztem Ansatz mitochondrielle Proteine, die zusätzlich in einem zweiten Kompartiment (bspw. Peroxisomen) lokalisiert sind, in Hefe identifizierten. Mit Hilfe dieses Ansatzes wurde ermittelt, dass in Hefe für ca. ein Viertel des mitochondriellen Proteoms (siehe Einleitung, Abschnitt 1.1), eine duale Lokalisierung erwartet wird. Diese Annahme konnte verifiziert werden indem von diesen ermittelten Kandidaten ungefähr 78 % der getesteten Proteine nachweislich dual sind. Ein anderer *in silico* Ansatz in *A. thaliana* zur Ermittlung von dualen Proteinen der Mitochondrien, Chloroplasten und der Peroxisomen bzw. des Zellkerns brachte ca. 900 Kandidatenproteine hervor (Carrie et al., 2009^a). Allerdings konnte nur für eine kleine Gruppe der getesteten Kandidatenproteine *dual targeting* nachgewiesen werden, was vermutlich auf die Parameterauswahl

zurückzuführen ist. Dennoch wurden auch mit diesem Ansatz zwölf neue duale Proteine identifiziert, wovon drei in die Mitochondrien und Plastiden lokalisiert sind. Zudem konnte mit einem Vorhersageprogramm, das mit einigen dual lokalisierten Proteinsequenzen trainiert wurde, mehr als 400 Kandidatenproteine für *dual targeting* ermittelt werden (Mitschke et al., 2009).

5 Welche Faktoren beeinflussen die intrazelluläre Sortierung?

Bisher gibt es keinen direkten experimentellen Beweis, der eine aktive Sortierung von dualen Proteinen oder deren Regulation belegt. Dennoch gibt es einige Beobachtungen, die darauf hinweisen, dass es kein passiver Prozess ist. Zum Beispiel konnte eine Gewebespezifität bei dualen Proteinen nachgewiesen werden (z. B. Carrie et al., 2009^a). Darüber hinaus kann auch durch Modifizierungen im Bereich des Transitpeptids die Verteilung von dualen Proteinen zwischen den Zielkompartimenten reguliert werden (zusammengefasst von Yogev and Pines, 2011). Ebenso kann auch der Passagier die Organellespezifität eines Proteins verändern (Chew and Whelan, 2003). Verschiedene Aspekte zu einer möglichen Regulation des *dual targeting* sollen im Folgenden näher diskutiert werden.

5.1 Sequenzmerkmale und Architektur des dualen Transitpeptids

Der einflussreichste Faktor zu welchem Ort ein Protein transportiert wird, ist meist N-terminal am Protein, im Transitpeptid lokalisiert (siehe Einleitung, Abschnitt 2). So kann z. B. ein Transitpeptid einen artifiziellen Passagier wie EYFP zu einem oder mehreren Kompartimenten dirigieren (siehe Kapitel 2-4). Nicht nur die Merkmale mitochondrieller und plastidärer Transitpeptide überlappen sondern ebenso die Eigenschaften monospezifischer und dualer Transitpeptide von Proteinen der Mitochondrien und Plastiden (siehe Einleitung, Abschnitt 2 und 5.2). Damit übereinstimmend konnte ein multiples Sequenz-*Alignment* des N-terminalen Bereichs der elf in dieser Arbeit identifizierten dualen Proteine mittels des Computerprogramms WebLogo (Crooks et al., 2004) kaum konservierte Abschnitte aufzeigen (Abb. 12). Zwar ist die Anzahl der analysierten Sequenzen relativ gering dennoch zeigt diese Darstellung ein relativ häufiges Auftreten von Alanin an Position zwei. Für andere duale Proteine konnte ebenfalls nachgewiesen werden, dass die Aminosäure an Position zwei zu 60 % Alanin ist, die zudem essentiell für die Bindung an den Organellrezeptor sowie den darauf folgenden Import ist (Pujol et al., 2007; Berglund et al., 2009^a). Des Weiteren ist ein vermehrtes Auftreten von Serin nachweisbar (vor allem an den Positionen 22 und 29 in Abb. 12 zu erkennen), das wiederum besonders charakteristisch für plastidäre Transitpeptide ist (von Heijne, 1989). Das für Mitochondrien typische vermehrte Auftreten von Arginin (von Heijne, 1986) ist dagegen nur bedingt in den analysierten Transitpeptiden zu detektieren (Abb. 12), was bereits für duale Proteine beschrieben wurde (Pujol et al., 2007).

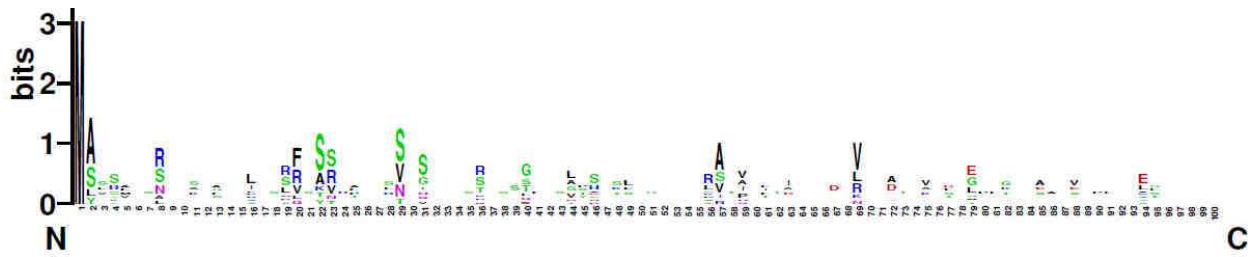


Abbildung 12: Duale Transitpeptide haben keine streng konservierten Aminosäuresequenzen.

Graphische Abbildung der Verteilung der N-terminalen 100 Aminosäuren aller in dieser Arbeit identifizierten dualen Proteine, insgesamt elf, in einem multiplen Sequenz-*Alignment*, erzeugt mittels des Computerprogramms WebLogo (Crooks et al., 2004). Jeder Stapel an Buchstaben repräsentiert eine Position in der Aminosäuresequenz (*x-Achse*). Die Gesamthöhe eines Stapels ist ein Maß für die Konservierung an dieser Position (gemessen in *bits*) (*y-Achse*). Die Höhe der einzelnen Buchstaben reflektiert die relative Frequenz der entsprechenden Aminosäure an dieser Position. Die Aminosäuren sind entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften eingefärbt, z.B. sind polare Aminosäuren in *grün*, basische Aminosäuren in *blau*, saure Aminosäuren in *rot* und hydrophobe Aminosäuren in *schwarz* dargestellt.

Zusätzlich zu derartigen Sequenz-*Alignments* wurde die Funktionalität verschiedener Bereiche innerhalb dualer Transitpeptide mit Hilfe von Deletionskonstruktionen analysiert (Hedtke et al., 2000; Rudhe et al., 2002^a; Bhushan et al., 2003). Es zeigte sich, dass diese Transitpeptide ihren Passagier nur noch zu einem Organell führen können und somit die Fähigkeit zum *dual targeting* verlieren, sobald ein N-terminaler Abschnitt des Transitpeptids deletiert wurde. Folglich wurde diesem Bereich eine distinkte Funktion für entweder den mitochondriellen oder den plastidären Transport zugesprochen. Für das duale Transitpeptid wurde so eine tandemartige Organisation von zwei aufeinanderfolgenden monospezifischen Transitpeptid-Domänen postuliert. Allerdings wurde in keiner dieser Analysen auch der reziproke Ansatz, also die Deletion des C-terminalen Bereichs des dualen Transitpeptids durchgeführt, wodurch die Validierung der Zuordnung von Transporteigenschaften zu einzelnen Transitpeptid-Domänen noch aussteht. Das nicht alle duale Transitpeptide über eine derartige Tandem-Organisation verfügen demonstrierten die Untersuchungen von sieben Vertretern der dualen aminoacyl-tRNA Synthetasen (Berglund et al., 2009^b). Damit übereinstimmend zeigen die Analysen des dualen Transitpeptids der α -MPP2 ebenfalls keine Tandemstruktur (Kapitel 3, Abschnitt 3.2). Zwar ist der N-terminale Bereich des Transitpeptids der α -MPP2 ausschließlich zum monospezifischen Transport in die Mitochondrien befähigt, allerdings führt im reziproken Ansatz die Deletion dieses Bereichs zu einem vollständigen Verlust der Transporteigenschaften. Dabei ist der N-terminale Bereich in zwei Domänen separiert, wobei die vordere Domäne den Transport zu und die zweite Domäne den Import in die Mitochondrien gewährleisten. Zusätzlich zu diesem N-terminalen mitochondriellen Bereich ist für den Transport in den Chloroplasten eine weitere Domäne notwendig, die die Transporteigenschaften des Proteins so verändert, dass auch Chloroplasten als Ziel erkannt werden können. Diese Domäne ist allerdings nicht autark sondern benötigt den gesamten N-terminalen Abschnitt, der für den mitochondriellen Transport essentiell ist. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurde für das duale Transitpeptid der α -MPP2 eine sehr komplexe, bisher noch nicht beschriebene drei Domänen-Architektur postuliert, wobei Domäne I den Transfer zu den Mitochondrien sicherstellt, Domäne II für den Import in das Organell verantwortlich ist und Domäne III die

Transportspezifität der α -MPP2 so verändert und erweitert, dass Chloroplasten als weiteres Ziel erkannt werden.

Ein paarweises *Alignment* der N-terminalen 100 Aminosäuren der α -MPP2 aus *A. thaliana* mit der α -MPP aus Kartoffel zeigt, dass beide Transitpeptide vergleichbare Längen aufweisen und zudem dieser Bereich relativ konserviert vorliegt (Abb. 13A). Somit ist denkbar, dass auch andere pflanzliche Transitpeptide der α -MPP über eine vergleichbare komplexe Organisation verfügen könnten. Folglich wäre die Eigenschaft zum dualen Transport nicht nur in *A. thaliana* gegeben sondern eventuell ein generelles Merkmal höherer Pflanzen. Im Gegensatz dazu übereinstimmend demonstriert das paarweise *Alignment* der α -MPP2 mit der α -MPP von Hefe vergleichsweise wenig konservierte Bereiche innerhalb der N-terminalen 100 Aminosäuren (Abb. 13B). Für das Transitpeptid aus Hefe wurde eine Länge von 13 Aminosäuren nachgewiesen (Yang et al., 1991), was signifikant kürzer ist als das der analysierten α -MPP aus Pflanzen. Auch im Vergleich mit anderen nicht-pflanzlichen Organismen, wie z. B. *Neurospora crassa*, ist das pflanzliche Transitpeptid wesentlich länger (Daten nicht gezeigt). Demzufolge könnte im Laufe der Evolution das Transitpeptid der α -MPP2 erweitert worden sein, sodass zusätzlich zu dem Transport in die Mitochondrien auch einen Transport in die Plastiden ermöglicht wird. Ein derartiger Mechanismus, der zu einer Entstehung bzw. Umgestaltung des Transitpeptids auf DNA-Ebene führen kann wurde z. B. für das Transitpeptid von Cytochrom c_1 beschrieben. In diesem Fall konnte nachgewiesen werden, dass durch *exon shuffling* der kerncodierten cytosolischen Glyceraldehyd-3-phosphat Dehydrogenase das Transitpeptid im kerncodierten Cytochrom c_1 entstanden ist (Long et al., 1996).

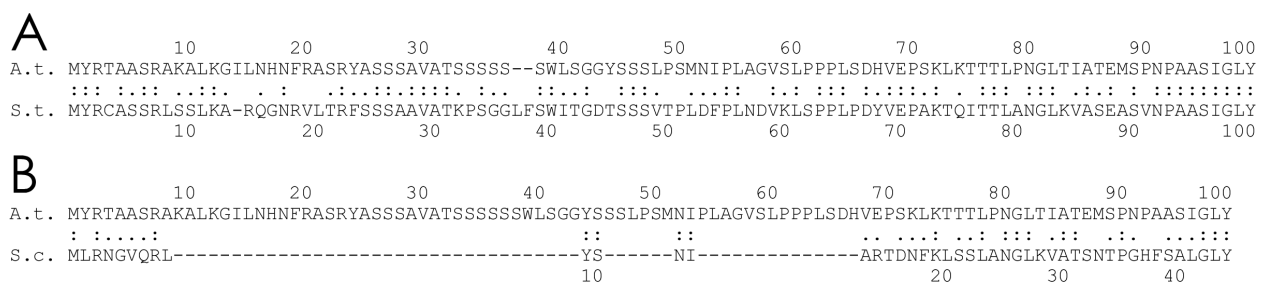


Abbildung 13: Das Transitpeptid der α -MPP aus Pflanzen ist signifikant länger als das der α -MPP aus Hefe.

Paarweises *Alignment* der α -MPP2 aus *A. thaliana* (*A.t.*) mit der α -MPP aus Kartoffel (*Solanum tuberosum*, *S.t.*) (**A**) sowie der α -MPP2 aus *A. thaliana* (*A.t.*) mit der α -MPP aus der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*, *S.c.*) (**B**). Gezeigt sind die Sequenzen der N-terminalen 100 Aminosäuren des jeweiligen Proteins. Ein Doppelpunkt markiert identische Aminosäuren wohingegen ein Punkt eine Aminosäuresubstitution aber konservierte physikochemische Eigenschaften darstellt.

5.2 Regulation des Proteintransports durch Modifizierung des Transitpeptids

Eine Modifizierung des Transitpeptids verändert die Affinität zum Zielrezeptor (Yogev and Pines, 2011). Folglich kann die Proteinverteilung zu mehreren intrazellulären Zielen flexibel und dynamisch reguliert werden, um z. B. auf veränderte exogene Parameter den Stoffwechsel anzupassen bzw. auszubalancieren. In Pflanzen wird eine Regulation des Proteintransports in die Chloroplasten durch die Phosphorylierung des Transitpeptids

diskutiert (siehe Einleitung, Abschnitt 3). Viele duale Proteine enthalten tatsächlich im Transitpeptid ein vorhergesagtes Sequenzmotiv für die Phosphorylierung (Carrie et al., 2009^b) durch eine cytosolische Kinase um den *guidance*-Komplex auszubilden. Eine mögliche Regulation der Aktivität dieses Komplexes könnte die Verteilung der dualen Proteine zwischen Mitochondrien und Chloroplasten beeinflussen (Waegemann and Soll, 1996; Martin et al., 2006). Allerdings haben Mutationen in der Phosphorylierungsstelle der dualen Glutathionreduktase (Chew et al., 2003) sowie eines monospezifischen Chloroplastenproteins (Nakrieko et al., 2004) keinen Einfluss auf die Importrate oder auf die Organellspezifität. Damit übereinstimmend führen die *in organello* Transportexperimente, die mit WGE statt RL synthetisierten Vorläuferproteinen durchgeführt wurden (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.3.2), zu keiner Veränderung der Organellspezifität, unabhängig ob den Organellen monospezifische oder duale Proteine als Substrate angeboten wurden, obwohl die Proteinsynthese in WGE eine Phosphorylierung ermöglicht. Darüber hinaus konnte außerdem nachgewiesen werden, dass bei der Translation einiger Proteine in Gegenwart von WGE importinkompetente Vorläuferproteine entstanden sind und folglich kein Import in eines der Organellen erfolgt. Als Ursache ist die Interaktion des Vorläuferproteins mit inhibitorischen Komponenten des WGE denkbar. Ein Indiz dafür liefert der Nachweis, dass der RL-Translationsansatz, dem WGE zugegeben wurde, durch eine extern zugesetzte Protease signifikant weniger degradiert werden kann verglichen mit dem Translationsansatz, der kein WGE enthielt. Demzufolge könnten WGE-Komponenten mit dem Vorläuferprotein interagieren und somit die Zugänglichkeit für die Protease reduzieren. Eine Interaktion des Vorläuferproteins mit WGE-Komponenten konnte bereits für mitochondrielle und plastidäre Proteine nachgewiesen werden, wodurch der Organellimport inhibiert wird (Schleiff et al., 2002^b; Dessi et al., 2003). Auch für die duale Glutathionreduktase ist nach der Synthese mit WGE nur noch ein Transport in die Chloroplasten nachweisbar (Dessi et al., 2003). Durch eine Interaktion von WGE-Komponenten mit dem Vorläuferprotein können für den Transport relevante Informationen im Substrat maskiert und somit der Import blockiert werden.

Eine Aggregation der Proteine als Ursache für die Importinkompetenz wie diese für die mitochondrielle Aspartat-Aminotransferase beschrieben wurde (Lain et al., 1994) ist dagegen unwahrscheinlich. Derartige Aggregationen sind in Gegenwart von RL nicht stabil, wodurch kein verändertes Transportverhalten der Substrate im Experiment der Abbildung 9 nachweisbar sein sollte. Darüber hinaus ist in diesen Experimenten nach Zugabe von WGE in der Translationsspur zusätzlich zu dem Vorläuferprotein ein weiteres Produkt detektierbar, das eine höhere Mobilität als das Vorläuferprotein aufweist und mit dem Prozessierungsprodukt in den Mitochondrien co-migriert. Höchstwahrscheinlich ist die Kontamination des WGE mit mitochondriellen Komponenten wie bspw. der MPP (Peiffer et al., 1990) die Ursache hierfür. Eine Prozessierung von mitochondriellen Vorläuferproteinen zum reifen Produkt in Gegenwart des WGEs konnte bereits demonstriert werden (Dessi et al., 2003). Aufgrund der Kontamination des WGE mit der MPP sowie die Interaktionen mit WGE-spezifischen Komponenten, die den Organellimport inhibieren ist die Proteinsynthese mittels WGE nur bedingt geeignet für *in organello* Transportstudien. Einige Proteine, für die mit WGE importkompetente Vorläuferproteine synthetisiert werden konnten, zeigen keinen Unterschied in der Organellspezifität im

Vergleich zu RL-Translationsansätzen. Demzufolge ist bei diesen Proteinen auch keine Regulation des Transports durch Phosphorylierung zu erwarten.

5.3 Cytosolische Faktoren sowie der reife Proteinanteil können die Verteilung der Proteine regulieren

Das Transportverhalten der dualen Proteine wurde mit einer Kombination aus *in organello* Experimenten und *in vivo* Analysen untersucht. Für die meisten Proteine zeigen beide experimentelle Ansätze konsistente Ergebnisse (Kapitel 2-4), was belegt, dass für einen Großteil der Proteine beide Methoden zur Analyse der Transporteigenschaften geeignet sind. Dennoch treten bei vier Proteinen diskrepante Ergebnisse auf (Kapitel 4, Abschnitt 4.2), die bspw. auch schon bei den vier Vertretern der Ferritin-Familie aus *A. thaliana* (Sondermann, 2009) und TPT (T_{riosephosphat} 3-P_{hospho}-glyceratphosphat T_{ranslokator}) aus Spinat (Silva-Filho et al., 1997) nachweisbar waren. Ein wesentlicher Unterschied zwischen beiden Methoden ist die Gegenwart von cytosolischen Faktoren, die den Prozess der Proteinsortierung regulieren können (siehe Einleitung, Abschnitt 3) und die somit als Ursache für diese Diskrepanz denkbar sind. Für drei dieser Proteine ist im *in organello* Ansatz ein Transport in beide Organellen zu beobachten, unabhängig ob diese als chimäre Reporterkonstruktion oder als auch als authentisches Protein den isolierten Organellen angeboten werden. Im Gegensatz dazu ist *in vivo* nur eine Lokalisierung in den Plastiden zu detektieren (Kapitel 4, Abschnitt 4.2), was nahe legt, dass in Gegenwart des Cytosols tatsächlich ein Transport in die Mitochondrien verhindert werden kann. Ebenso existiert im Gegensatz zu den *in organello* Experimenten in der authentischen *in vivo* Situation eine Kompetition der Proteine um die Transportapparate, die ebenfalls eine stringente und spezifische Proteinsortierung erheblich beeinflusst (Silva-Filho et al., 1997). Durch die Zugabe von isoliertem Cytosol könnte der *in organello* Ansatz der *in vivo* Situation angepasst werden, wodurch die Fehlsortierung in die Mitochondrien eventuell vermieden wird. Weiterhin könnte für diese Kandidaten der sogenannte gemischte Ansatz (Rudhe et al., 2002^b) durchgeführt werden um auszuschließen, dass der Mitochondrienimport durch die Abwesenheit des authentischen Zielorganells verursacht wird. Eine generelle unspezifische Proteinaufnahme der Mitochondrien, wie bei Cleary et al. (2002) gezeigt wurde, kann ausgeschlossen werden, da Plastidenproteine wie bspw. FNR und OEC33 aus Spinat oder GgpS aus *A. thaliana* unter identischen experimentellen Bedingungen spezifisch nur in isolierte Chloroplasten importiert werden wohingegen ein Transport in die Mitochondrien ausbleibt (siehe Kapitel 2, Abschnitt 2.2 und Kapitel 4, Abschnitt 4.2). Folglich scheint diese Diskrepanz, die vermutlich durch die Abwesenheit regulatorischer Komponenten des Cytosols bzw. fehlender Kompetition verursacht wird nur für einige Proteine in einer Fehlsortierung zu resultieren. Ungeachtet dessen ist die Kompetenz der mitochondriellen Transportmaschine, plastidäre Vorläuferproteine aufzunehmen und zu prozessieren bemerkenswert, da die Transportapparate beider endosymbiontischer Organellen im Vergleich kaum Sequenzähnlichkeiten aufweisen, ausgenommen OM64 und TOC64 (siehe Einleitung, Abschnitt 4.1).

Ein weiterer Unterschied beider experimenteller Ansätze ist der Einsatz von chimären Reporterkonstruktionen im *in vivo* Ansatz anstelle der authentischen Proteine, die für die *in organello* Studien genutzt werden. Durch ein Reporterprotein können die Transporteigenschaften des authentischen Proteins verändert werden indem bspw. für den Transport relevante Informationen maskiert werden. Das konnte z. B. bei der dualen alternativen NAD(P)H Dehydrogenase, die N-terminal ein mitochondrielles und C-terminal ein peroxisomales Transportsignal trägt, nachgewiesen werden (Carrie et al., 2008). In vielen Fällen wird außerdem meist nur das Transitpeptid oder ein N-terminaler Bereich für die chimäre Reporterkonstruktion verwendet, da einige Vollängenkonstruktionen bei Überexpression *in vivo* häufig aggregieren (Daten nicht gezeigt) und sogenannte Aggresomen entstehen (García-Mata et al., 1999; Vogel et al., 2007). Bei einer Reporterkonstruktion, die nur das Transportsignal enthält, fehlt der regulatorische Einfluss des reifen Proteinanteils, der für die Sortierung einiger Proteine essentiell ist (z. B. Schmidt von Braun et al., 2007; Carrie et al., 2008). Auch das Transportsignal der dualen Glutathionereduktase kann einen mitochondriellen reifen Proteinanteil nur in die Mitochondrien bzw. einen plastidären reifen Proteinanteil ausschließlich in die Chloroplasten dirigieren (Chew and Whelan, 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte auch bei der NADH eine mitochondrielle Lokalisierung des authentischen Proteins aber *dual targeting* bei der chimären Reporterkonstruktion unabhängig vom Analysesystem detektiert werden (siehe Kapitel 4, Abschnitt 4.2). Folglich wird durch den reifen Proteinanteil ein Transport in die Chloroplasten verhindert, was nahe legt, dass auch bei diesem Protein der reife Anteil an der Proteinsortierung beteiligt ist. Sowohl *in organello* als auch *in vivo* Analysen mit der Vollängenkonstruktion der NADH könnten diese Annahme bestätigen.

Ein weiterer Nachteil des *in vivo* Systems ist die Schwierigkeit zwischen einer Bindung des Proteins an die Organelloberfläche und einem Import in das Organell zu unterscheiden. So wurde für die kurze chimäre Reporterkonstruktion der α -MPP2 *in vivo* eine Markierung der Mitochondrien zweifelsfrei demonstriert (siehe Kapitel 3, Abschnitt 3.2). Für diese Reporterkonstruktion konnte allerdings erst durch die *in organello* Methode nachgewiesen werden, dass dieses Protein nicht vom Organell aufgenommen und prozessiert wurde, da offensichtlich die für den Import relevante Domäne deletiert war. Somit erlaubt jede der Methoden eine Untersuchung des Proteintransports, allerdings unter verschiedenen Aspekten. Folglich ist eine Kombination beider Methoden bedeutend um Fehlinterpretationen bei der Analyse des Transportverhaltens zu vermeiden.

6 Die Rolle des *dual targeting* in der Evolution des Proteintransports

Durch die Einwanderung der Chloroplasten-Vorfahren in eine Zelle, in der sich bereits Mitochondrien etabliert hatten (siehe Einleitung, Abschnitt 1.3) war eine koordinierte Evolution der mitochondriellen aber auch der Proto-Plastid Importapparate und Transitpeptide essentiell um zum einen Fehltransport von schädlichen Proteinen in das Fremdorganell zu verhindern und zum anderen *dual targeting* von Proteinen, die für beide Organellen essentiell sind, zu unterstützen. Folglich weist der mitochondrielle Proteintransport in Pflanzen Besonderheiten im Vergleich zu Zellen mit nur einem endosymbiontischen Zielorganell auf. So unterscheiden

sich pflanzliche TOM-Rezeptoren zur Erkennung der mitochondrialen Vorläuferproteine erheblich von den Gegenstücken in nicht-pflanzlichen Organismen (siehe Einleitung, Abschnitt 4.1), vermutlich zur Diskriminierung zwischen Mitochondrien- und Plastidenproteinen. Darüber hinaus sind mitochondrielle Vorläuferproteine der Pflanzen länger (Sjöling and Glaser, 1998) und besitzen zudem geringere Freiheitsgrade in ihrer Aminosäurezusammensetzung (Staiger et al., 2009), höchstwahrscheinlich in Anpassung an das zweite endosymbiontische Zielorganell. Interessanterweise kann das plastidäre Transitpeptid der kleinen Untereinheit der RuBisCO verschiedene Passagiere zu nicht-pflanzlichen Mitochondrien transportieren (Hurt et al., 1986), was nahe legt, dass plastidäre Transitpeptide sich von denen der Mitochondrien entwickelt haben. Ein Indiz, dass der Proteintransport in Pflanzen nicht immer spezifisch abläuft liefert der Nachweis der kleinen Untereinheit der RuBisCO in den Mitochondrien der Alge *Ochromonas* (Lacoste-Royal and Gibbs, 1985). Ebenso zeigten *in organello* Transportexperimente, dass das Transitpeptid dieses Proteins befähigt ist, seinen Passagier zu dem Mitochondrien von höheren Pflanzen zu dirigieren (Rudhe et al., 2002^b). Darüber hinaus kann sogar das mitochondrielle Transitpeptid einer Cytochrom Oxidase-Untereinheit aus Hefe ein artifizielles Protein in die Mitochondrien aus Tabakpflanzen aber auch simultan in die Chloroplasten leiten (Huang et al., 1990). Offensichtlich ist also der Mechanismus des mitochondrialen Proteintransports konserviert, was bereits 1989 von Schmitz und Lonsdale demonstriert wurde. Vor allem wird auch an diesem Beispiel deutlich, dass die Proteinsortierung in Pflanzen zwischen Mitochondrien und Plastiden durchaus unspezifisch ablaufen kann. Könnte ein unspezifischer Proteintransport das abundante Auftreten von dualen Proteinen erklären? Durch einen dualen Proteintransport ist die Zelle befähigt mit einer konstanten Zahl an Genkopien und so mit identischen Varianten an Proteinen die Stoffwechselfunktionen dennoch zu erhöhen (Yogev and Pines, 2011). Proteine, die ein "unspezifisches" Transitpeptid tragen könnten so in ein neues Organell dirigiert werden und dort vermutlich neue Funktionen erlangt haben. Über einen gewissen Zeitraum könnten sich so neue Stoffwechselwege entwickelt haben und "fehlende" Elemente wie bspw. ein Enzym im mitochondrialen Zitronensäurezyklus mit nicht-proteobakteriellen Ursprungs (Schnarrenberger and Martin, 2002) in vorhandene biochemische Abläufe eingebracht werden (Dyall, 2004; Martin, 2010).

Ein latenter Fehltransport der Proteine birgt in einigen Fällen auch das Risiko, dass die Organellen geschädigt werden können. Diese Proteine verloren vermutlich im Laufe der Evolution ihre Fähigkeit zum *dual targeting* und stattdessen entwickelte sich ein monospezifisches Transitpeptid. Zur Bestätigung dieser Hypothese wurden in einem *in organello* Transportexperiment Vorläuferproteine aus nicht-pflanzlichen Organismen, wie Hefe und Maus, die zu monospezifischen Mitochondrienproteinen aus Pflanzen homolog sind, den Mitochondrien und Chloroplasten als Substrate angeboten (Abb. 14). Erwartungsgemäß sollten die "unspezifischen" Transitpeptide der Proteine aus Hefe und Maus von den Pflanzenorganellen erkannt und transportiert werden. Die homologen Proteine aus Hefe wurden jedoch von keinem der beiden Organellen importiert (Abb. 14A, B), obwohl der mitochondrielle Transportmechanismus konserviert sein sollte (siehe oben). Im Gegensatz dazu wird das homologe Protein zum mitochondrialen Rieske aus Maus zweifelsfrei in die Mitochondrien und darüber hinaus auch in die Chloroplasten transportiert (Abb. 14A). Ebenso wird ATPS aus Maus von den Chloroplasten importiert (Abb. 14B). Folglich besitzen die Transitpeptide mit nicht-pflanzlichem Hintergrund durchaus die

Kompetenz Proteine in beide Organellen bzw. in ein anderes Organell zu führen, die bei den entsprechenden homologen mitochondrialen Pflanzenproteinen nicht besteht. Die Pflanzenproteine haben diese Transporteigenschaft offensichtlich verloren, vielleicht weil es in diesen Fällen zu Schädigungen des Fremdorganells kam und somit die "unspezifische" Proteinsortierung nachteilig für die Zelle war. Weitere Experimente in lebenden Pflanzenzellen müssten folgen um nachzuweisen, dass auch in Gegenwart des Cytosols die Fähigkeit dieser Homologe zum *dual targeting* besteht. Außerdem könnte eine induzierte Expression in transgenen Pflanzen zeigen, ob der Fehltransport dieser Proteine tatsächlich schädlich für die Organellen ist.

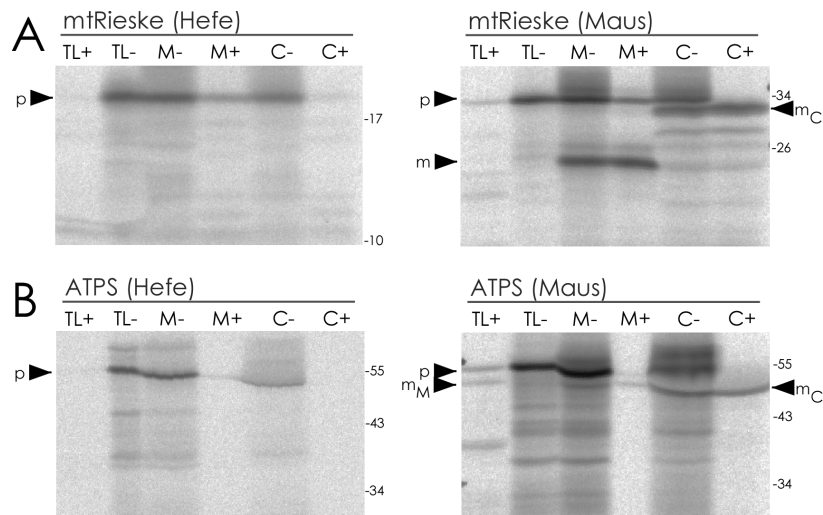


Abbildung 14: Mitochondrielle Proteine aus Maus können in Chloroplasten importiert werden.

In organello Transportexperiment von homologen Proteinen zum mtRieske aus Kartoffel, dem *mtRieske* aus *Hefe* (56 % Identität) bzw. *Maus* (52 % Identität) (A) und von homologen Proteinen zur ATPS aus *A. thaliana*, der ATPS aus *Hefe* (71 % Identität) bzw. *Maus* (73 % Identität) (B). Die cDNA-Klone aus Maus (IRAVp968B0139D und IRAVp968H0191D) wurden von *ImaGenes* (Teil der *Source BioScience*-Gruppe, *United Kingdom*) bezogen und mit der SP6-Polymerase das jeweilige Transkript erzeugt. Die codierenden Sequenzen für mtRieske und ATPS aus *Hefe* wurden mit entsprechenden Primern durch Polymerasekettenreaktion amplifiziert, wobei die genomische DNA von *Saccharomyces cerevisiae* als Matrize diente. Diese Sequenzen wurden anschließend durch klassische Restriktion in den Zielvektor pBAT (Annweiler et al., 1991) umgesetzt und für die Transkription mittels T3-Polymerase verwendet. Die berechneten Molekulargewichte des mtRieske aus *Hefe* mit ca. 23 kDa sowie aus *Maus* mit ca. 30 kDa, sowie der ATPS aus *Hefe* mit ca. 55 kDa und aus *Maus* von ca. 56 kDa entsprechen ungefähr dem apparenten Laufverhalten der jeweiligen Vorläuferproteine der Translationsreaktion. Weitere Details sind in den Legenden zu Abb. 6 und Abb. 8 aufgeführt.

Das Vorhandensein einer Funktion muss somit nicht in jedem Fall eine Voraussetzung für den Import eines Proteins in das jeweilige Organell sein sondern kann in einigen Fällen auch z. B. auf ein unspezifisches Transitpeptid zurückzuführen sein. Unter diesem Aspekt ist es auch nicht verwunderlich, dass Cytochrom *c₁* in beide Organellen transportiert wird. Ebenso werden vermutlich eine Reihe weiterer Proteine die Fähigkeit zum *dual targeting* aufweisen, die aber nicht an eine Funktionalität in beiden Organellen gebunden ist, wodurch das abundante Vorkommen dualer Protein erklärbar ist. Somit repräsentiert *dual targeting* vermutlich einen evolutionären "Überrest" als Folge der zwei konsekutiven endosymbiontischen Ereignisse, durch den sich viele neue biochemische Prozesse im Laufe der Evolution entwickeln konnten und vielleicht noch entwickeln werden.

REFERENZEN

- Abdallah, F., Salamini, F., and Leister, D. (2000). A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 5, 141-142.
- Abe, Y., et al. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100, 551-560.
- Annweiler, A., Hipskind, R.A., and Wirth, T. (1991). A strategy for efficient in vitro translation of cDNAs using the rabbit beta-globin leader sequence. *Nucleic Acids Res* 19, 3750.
- Aronsson, H., Boij, P., Patel, R., Wardle, A., Topel, M., and Jarvis, P. (2007). Toc64/OEP64 is not essential for the efficient import of proteins into chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 52, 53-68.
- Baginsky, S., and Gruissem, W. (2004). Chloroplast proteomics: potentials and challenges. *J Exp Bot* 55, 1213-1220.
- Balsera, M., Soll, J., and Bölder, B. (2009). Protein import machineries in endosymbiotic organelles. *Cell Mol Life Sci* 66, 1903-1923.
- Bedard, J., and Jarvis, P. (2005). Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *J Exp Bot* 56, 2287-2320.
- Berglund, A.K., et al. (2009^a). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts: characterization of Thr-tRNA synthetase targeting peptide. *Mol Plant* 2, 1298-1309.
- Berglund, A.K., Pujol, C., Duchene, A.M., and Glaser, E. (2009^b). Defining the determinants for dual targeting of amino acyl-tRNA synthetases to mitochondria and chloroplasts. *J Mol Biol* 393, 803-814.
- Bhushan, S., et al. (2003). Dual targeting and function of a protease in mitochondria and chloroplasts. *EMBO Rep* 4, 1073-1078.
- Bischof, S., et al. (2011). Plastid Proteome Assembly without Toc159: Photosynthetic Protein Import and Accumulation of N-Acetylated Plastid Precursor Proteins. *Plant Cell* 23, 3911-3928.
- Bock, R., and Timmis, J.N. (2008). Reconstructing evolution: gene transfer from plastids to the nucleus. *Bioessays* 30, 556-566.
- Böhni, P.C., Daum, G., and Schatz, G. (1983). Import of proteins into mitochondria. Partial purification of a matrix-located protease involved in cleavage of mitochondrial precursor polypeptides. *J Biol Chem* 258, 4937-4943.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V., and Schmitz, U.K. (1992^a). The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J* 11, 3219-3227.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V., and Schmitz, U.K. (1992^b). Cytochrome c1 from potato: a protein with a presequence for targeting to the mitochondrial intermembrane space. *Mol Gen Genet* 231, 217-225.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V., Bodicker, M., and Schmitz, U.K. (1995). The general mitochondrial processing peptidase from wheat is integrated into the cytochrome bc1-complex of the respiratory chain. *Planta* 195, 396-402.
- Brink, S., Fischer, K., Klösgen, R.B., and Flugge, U.I. (1995). Sorting of nuclear-encoded chloroplast membrane proteins to the envelope and the thylakoid membrane. *J Biol Chem* 270, 20808-20815.
- Brock, I.W., et al. (1993). Precursors of one integral and five luminal thylakoid proteins are imported by isolated pea and barley thylakoids: optimisation of in vitro assays. *Plant Mol Biol* 23, 717-725.
- Bruce, B.D. (2001). The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta* 1541, 2-21.
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lubeck, J., Soll, J., and Heins, L. (1997). The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J* 16, 7342-7350.
- Carrie, C., et al. (2008). Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 582, 3073-3079.
- Carrie, C., et al. (2009^a). Approaches to defining dual-targeted proteins in *Arabidopsis*. *Plant J* 57, 1128-1139.
- Carrie, C., Giraud, E., and Whelan, J. (2009^b). Protein transport in organelles: Dual targeting of proteins to mitochondria and chloroplasts. *FEBS J* 276, 1187-1195.

- Chaddock, A.M., et al. (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. *EMBO J* 14, 2715-2722.
- Chatton, B., Walter, P., Ebel, J.P., Lacroute, F., and Fasiolo, F. (1988). The yeast VAS1 gene encodes both mitochondrial and cytoplasmic valyl-tRNA synthetases. *J Biol Chem* 263, 52-57.
- Chen, X., Smith, M.D., Fitzpatrick, L., and Schnell, D.J. (2002). In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts. *Plant Cell* 14, 641-654.
- Chew, O., and Whelan, J. (2003). Dual targeting ability of targeting signals is dependent on the nature of the mature protein. *Functional Plant Biology* 30, 805-812.
- Chew, O., Rudhe, C., Glaser, E., and Whelan, J. (2003). Characterization of the targeting signal of dual-targeted pea glutathione reductase. *Plant Mol Biol* 53, 341-356.
- Chew, O., et al. (2004). A plant outer mitochondrial membrane protein with high amino acid sequence identity to a chloroplast protein import receptor. *FEBS Lett* 557, 109-114.
- Christensen, A.C., et al. (2005). Dual-domain, dual-targeting organellar protein presequences in Arabidopsis can use non-AUG start codons. *Plant Cell* 17, 2805-2816.
- Clausmeyer, S., Sturzebecher, R., and Peters, J. (1999). An alternative transcript of the rat renin gene can result in a truncated prorenin that is transported into adrenal mitochondria. *Circ Res* 84, 337-344.
- Cleary, S.P., et al. (2002). Isolated plant mitochondria import chloroplast precursor proteins in vitro with the same efficiency as chloroplasts. *J Biol Chem* 277, 5562-5569.
- Colombo, S., et al. (2005). N-myristoylation determines dual targeting of mammalian NADH-cytochrome b5 reductase to ER and mitochondrial outer membranes by a mechanism of kinetic partitioning. *J Cell Biol* 168, 735-745.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P. (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* 8, 167-175.
- Crooks, G.E., Hon, G., Chandonia, J.M., and Brenner, S.E. (2004). WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14, 1188-1190.
- Dahlin, C., and Cline, K. (1991). Developmental Regulation of the Plastid Protein Import Apparatus. *Plant Cell* 3, 1131-1140.
- Delille, H.K., and Schrader, M. (2008). Targeting of hFis1 to peroxisomes is mediated by Pex19p. *J Biol Chem* 283, 31107-31115.
- Dessi, P., et al. (2003). Investigations on the in vitro import ability of mitochondrial precursor proteins synthesized in wheat germ transcription-translation extract. *Plant Mol Biol* 52, 259-271.
- Dinur-Mills, M., Tal, M., and Pines, O. (2008). Dual targeted mitochondrial proteins are characterized by lower MTS parameters and total net charge. *PLoS One* 3, e2161.
- Douglas, S.E. (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Opin Genet Dev* 8, 655-661.
- Duchene, A.M., et al. (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16484-16489.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., and Johnson, P.J. (2004). Ancient invasions: from endosymbionts to organelles. *Science* 304, 253-257.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., and von Heijne, G. (2000). Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300, 1005-1016.
- Emmermann, M., Braun, H.P., and Schmitz, U.K. (1994). The mitochondrial processing peptidase from potato: a self-processing enzyme encoded by two differentially expressed genes. *Mol Gen Genet* 245, 237-245.
- Eriksson, A.C., Sjöling, S. and Glaser, E. (1994). The ubiquinol cytochrome c oxidoreductase complex of spinach leaf mitochondria is involved in both respiration and protein processing. *Biochim. Biophys. Acta* 1186, 221-231.
- Figuroa-Martinez, F., Funes, S., Franzen, L.G., and Gonzalez-Halphen, D. (2008). Reconstructing the mitochondrial protein import machinery of Chlamydomonas reinhardtii. *Genetics* 179, 149-155.
- Firlej-Kwoka, E., Strittmatter, P., Soll, J., and Bolter, B. (2008). Import of preproteins into the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Mol Biol* 68, 505-519.

- Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 25, 319-324.
- Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E.J., and Sztul, E.S. (1999). Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera. *J Cell Biol* 146, 1239-1254.
- Geli, V. (1993). Functional reconstitution in *Escherichia coli* of the yeast mitochondrial matrix peptidase from its two inactive subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 6247-6251.
- Girzalsky, W., Saffian, D., and Erdmann, R. (2010). Peroxisomal protein translocation. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1803, 724-731.
- Glaser, E., Sjöling, S., Szgyarto, C., and Eriksson, A.C. (1996). Plant mitochondrial protein import: precursor processing is catalysed by the integrated mitochondrial processing peptidase (MPP) /bc₁ complex and degradation by the ATP-dependent proteinase. *Biochim. Biophys. Acta* 1275,33-37.
- Glaser, E., and Dessi, P. (1999). Integration of the mitochondrial-processing peptidase into the cytochrome bc₁ complex in plants. *J Bioenerg Biomembr* 31, 259-274.
- Glaser, E., and Soll, J. (2004). Targeting signals and import machinery of plastids and plant mitochondria. In *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles: Chloroplasts and Mitochondria*, Daniell H., and Chase C. eds (Kluwer Academic Publishers: Springer, Dordrecht), 385-418.
- Gray, M.W., Burger, G., and Lang, B.F. (1999). Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.
- Grossman, A., Bartlett, S., and Chua, N.H. (1980a). Energy-Dependent Uptake of Cytoplasmically Synthesized Polypeptides by Chloroplasts. *Nature* 285, 625-628.
- Gutensohn, M., et al. (2006). Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* 163, 333-347.
- Hachiya, N., et al. (1994). MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J* 13, 5146-5154.
- Hachiya, N., Mihara, K., Suda, K., Horst, M., Schatz, G., and Lithgow, T. (1995). Reconstitution of the initial steps of mitochondrial protein import. *Nature* 376, 705-709.
- Halperin, T., and Adam, Z. (1996). Degradation of mistargeted OEE33 in the chloroplast stroma. *Plant Molecular Biology* 30, 925-933.
- Hawlttschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U., and Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53, 795-806.
- Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J.S., Gout, A.M., Day, D.A., Whelan, J., and Millar, A.H. (2004). Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell* 16, 241-256.
- Hedtke, B., Borner, T., and Weihe, A. (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* 1, 435-440.
- Heins, L., and Schmitz, U.K. (1996). A receptor for protein import into potato mitochondria. *Plant J* 9,829-839.
- Heins, L., et al. (2002). The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J* 21, 2616-2625.
- Herlan, M., Bornhovd, C., Hell, K., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol* 165, 167-173.
- Hiltbrunner, A., et al. (2001). Targeting of an abundant cytosolic form of the protein import receptor at Toc159 to the outer chloroplast membrane. *J Cell Biol* 154, 309-316.
- Hormann, F., Kuchler, M., Sveshnikov, D., Oppermann, U., Li, Y., and Soll, J. (2004). Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J Biol Chem* 279, 34756-34762.
- Huang, J., Hack, E., Thornburg, R.W., and Myers, A.M. (1990). A yeast mitochondrial leader peptide functions in vivo as a dual targeting signal for both chloroplasts and mitochondria. *Plant Cell* 2, 1249-1260.
- Huang, S., Taylor, N.L., Whelan, J., and Millar, A.H. (2009). Refining the definition of plant mitochondrial presequences through analysis of sorting signals, N-terminal modifications, and cleavage motifs. *Plant Physiol* 150, 1272-1285.

- Hurt, E.C., Goldschmidtclermont, M., Pesoldhurt, B., Rochaix, J.D., and Schatz, G. (1986). A Mitochondrial Presequence Can Transport a Chloroplast-Encoded Protein into Yeast Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 261, 1440-1443.
- Ito, J., Heazlewood, J.L., and Millar, A.H. (2006). Analysis of the soluble ATP-binding proteome of plant mitochondria identifies new proteins and nucleotide triphosphate interactions within the matrix. *J Proteome Res* 5, 3459-3469.
- Jackson-Constan, D., Akita, M., and Keegstra, K. (2001). Molecular chaperones involved in chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* 1541, 102-113.
- Jackson-Constan, D., and Keegstra, K. (2001). Arabidopsis genes encoding components of the chloroplastic protein import apparatus. *Plant Physiol* 125, 1567-1576.
- Jarvis, P. (2008). Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants. *New Phytol* 179, 257-285.
- Kalousek, F., Isaya, G., and Rosenberg, L.E. (1992). Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *EMBO J* 11, 2803-2809.
- Kang, P.J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E.A., and Pfanner, N. (1990). Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature* 348, 137-143.
- Karniely, S., and Pines, O. (2005). Single translation--dual destination: mechanisms of dual protein targeting in eukaryotes. *EMBO Rep* 6, 420-425.
- Keenan, R.J., Freymann, D.M., Stroud, R.M., and Walter, P. (2001). The signal recognition particle. *Annu Rev Biochem* 70, 755-775.
- Kessler, F., and Schnell, D.J. (2006). The function and diversity of plastid protein import pathways: a multilane GTPase highway into plastids. *Traffic* 7, 248-257.
- Kirwin, P.M., Elderfield, P.D., and Robinson, C. (1987). Transport of proteins into chloroplasts. Partial purification of a thylakoidal processing peptidase involved in plastocyanin biogenesis. *J Biol Chem* 262, 16386-16390.
- Kitada, S., Shimokata, K., Niidome, T., Ogishima, T., and Ito, A. (1995). A putative metal-binding site in the beta subunit of rat mitochondrial processing peptidase is essential for its catalytic activity. *J Biochem* 117, 1148-1150.
- Kleffmann, T., et al. (2004). The Arabidopsis thaliana chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions. *Current Biology* 14, 354-362.
- Klein, M., Binder, S., and Brennicke, A. (1998). Purification of mitochondria from Arabidopsis. *Methods Mol Biol* 82, 49-53.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., and Schnell, D.J. (1998). Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol* 143, 991-1002.
- Kouranov, A., and Schnell, D.J. (1997). Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J Cell Biol* 139, 1677-1685.
- Krause, K., and Krupinska, K. (2009). Nuclear regulators with a second home in organelles. *Trends Plant Sci* 14, 194-199.
- Kruft, V., Eubel, H., Jansch, L., Werhahn, W., and Braun, H.P. (2001). Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in Arabidopsis. *Plant Physiol* 127, 1694-1710.
- Küchler, M., Decker, S., Hormann, F., Soll, J., and Heins, L. (2002). Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J* 21, 6136-6145.
- Kuhlman, P., and Palmer, J.D. (1995). Isolation, expression, and evolution of the gene encoding mitochondrial elongation factor Tu in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol* 29, 1057-1070.
- Lacoste-Royal, G., and Gibbs, S.P. (1985). Ochromonas mitochondria contain a specific chloroplast protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 1456-1459.
- Lain, B., Iriarte, A., and Martinez-Carrion, M. (1994). Dependence of the folding and import of the precursor to mitochondrial aspartate aminotransferase on the nature of the cell-free translation system. *J Biol Chem* 269, 15588-15596.
- Lister, R., Hulett, J.M., Lithgow, T., and Whelan, J. (2005). Protein import into mitochondria: origins and functions today (review). *Mol Membr Biol* 22, 87-100.

- Lister, R., et al. (2007). Functional definition of outer membrane proteins involved in preprotein import into mitochondria. *Plant Cell* 19, 3739-3759.
- Lithgow, T., Glick, B.S., and Schatz, G. (1995). The protein import receptor of mitochondria. *Trends Biochem Sci* 20, 98-101.
- Logan, D.C. (2006). Plant mitochondrial dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1763, 430-441.
- Long, M., de Souza, S.J., Rosenberg, C., and Gilbert, W. (1996). Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome c1 precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 7727-7731.
- Lopez-Juez, E. (2007). Plastid biogenesis, between light and shadows. *J Exp Bot* 58, 11-26.
- Macasev, D., Newbigin, E., Whelan, J., and Lithgow, T. (2000). How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from Arabidopsis differ from their fungal counterparts. *Plant Physiol* 123, 811-816.
- Macasev, D., Whelan, J., Newbigin, E., Silva-Filho, M.C., Mulhern, T.D., and Lithgow, T. (2004). Tom22', an 8-kDa trans-site receptor in plants and protozoans, is a conserved feature of the TOM complex that appeared early in the evolution of eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21, 1557-1564.
- Margulis, L. (1971). The origin of plant and animal cells. *Am Sci* 59, 230-235.
- Martelli, A., et al. (2007). Folding and turnover of human iron regulatory protein 1 depend on its subcellular localization. *FEBS J* 274, 1083-1092.
- Martin, W., and Herrmann, R.G. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* 118, 9-17.
- Martin, T., Sharma, R., Sippel, C., Waegemann, K., Soll, J., and Vothknecht, U.C. (2006). A protein kinase family in Arabidopsis phosphorylates chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* 281, 40216-40223.
- Martin, W. (2010). Evolutionary origins of metabolic compartmentalization in eukaryotes. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 365, 847-855.
- Matthews, G.D., Gould, R.M., and Vardimon, L. (2005). A single glutamine synthetase gene produces tissue-specific subcellular localization by alternative splicing. *FEBS Lett* 579, 5527-5534.
- Matthews, G.D., Gur, N., Koopman, W.J., Pines, O., and Vardimon, L. (2010). Weak mitochondrial targeting sequence determines tissue-specific subcellular localization of glutamine synthetase in liver and brain cells. *J Cell Sci* 123, 351-359.
- May, T., and Soll, J. (2000). 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12, 53-64.
- Mayer, M.P., and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci* 62, 670-684.
- McFadden, G.I. (1999). Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* 2, 513-519.
- Meineke, B., Engl, G., Kemper, C., Vasiljev-Neumeyer, A., Paulitschke, H., and Rapaport, D. (2008). The outer membrane form of the mitochondrial protein Mcr1 follows a TOM-independent membrane insertion pathway. *FEBS Lett* 582, 855-860.
- Menand, B., Marechal-Drouard, L., Sakamoto, W., Dietrich, A., and Wintz, H. (1998). A single gene of chloroplast origin codes for mitochondrial and chloroplastic methionyl-tRNA synthetase in Arabidopsis thaliana. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 11014-11019.
- Merrick, W.C. (1992). Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. *Microbiol Rev* 56, 291-315.
- Millar, A.H., Heazlewood, J.L., Kristensen, B.K., Braun, H.P., and Moller, I.M. (2005). The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci* 10, 36-43.
- Millar, A.H., Liddell, A., and Leaver, C.J. (2007). Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. *Methods Cell Biol* 80, 65-90.
- Mitschke, J., et al. (2009). Prediction of dual protein targeting to plant organelles. *New Phytol* 183, 224-235.
- Morgante, C.V., Rodrigues, R.A., Marbach, P.A., Borgonovi, C.M., Moura, D.S., and Silva-Filho, M.C. (2009). Conservation of dual-targeted proteins in Arabidopsis and rice points to a similar pattern of gene-family evolution. *Mol Genet Genomics* 281, 525-538.
- Murcha, M.W., et al. (2007). Characterization of the preprotein and amino acid transporter gene family in Arabidopsis. *Plant Physiol* 143, 199-212.

- Murcha, M.W., Huang, T., and Whelan, J. (1999). Import of precursor proteins into mitochondria from soybean tissues during development. *FEBS Lett* 464, 53-59.
- Murcha, M.W., Lister, R., Ho, A.Y., and Whelan, J. (2003). Identification, expression, and import of components 17 and 23 of the inner mitochondrial membrane translocase from *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 131, 1737-1747.
- Nakrieko, K.A., Mould, R.M., and Smith, A.G. (2004). Fidelity of targeting to chloroplasts is not affected by removal of the phosphorylation site from the transit peptide. *Eur J Biochem* 271, 509-516.
- Natsoulis, G., Hilger, F., and Fink, G.R. (1986). The HTS1 gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial histidine tRNA synthetases of *S. cerevisiae*. *Cell* 46, 235-243.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 723-749.
- Obara, K., Sumi, K., and Fukuda, H. (2002). The use of multiple transcription starts causes the dual targeting of *Arabidopsis* putative monodehydroascorbate reductase to both mitochondria and chloroplasts. *Plant and Cell Physiology* 43, 697-705.
- Ou, W.J., Ito, A., Okazaki, H., and Omura, T. (1989). Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. *EMBO J* 8, 2605-2612.
- Peeters, N., and Small, I. (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* 1541, 54-63.
- Peiffer, W.E., Ingle, R.T., and Fergusonmiller, S. (1990). Structurally Unique Plant Cytochrome-C-Oxidase Isolated from Wheat-Germ, a Rich Source of Plant Mitochondrial-Enzymes. *Biochemistry* 29, 8696-8701.
- Pfaller, R., Pfanner, N., and Neupert, W. (1989). Mitochondrial protein import. Bypass of proteinaceous surface receptors can occur with low specificity and efficiency. *J Biol Chem* 264, 34-39.
- Pujol, C., Marechal-Drouard, L., and Duchene, A.M. (2007). How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J Mol Biol* 369, 356-367.
- Qbadou, S., Becker, T., Mirus, O., Tews, I., Soll, J., and Schleiff, E. (2006). The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *EMBO J* 25, 1836-1847.
- Qbadou, S., et al. (2007). Toc64--a preprotein-receptor at the outer membrane with bipartite function. *J Mol Biol* 367, 1330-1346.
- Rawlings, N.D., and Barrett, A.J. (1993). Evolutionary families of peptidases. *Biochem J* 290 (Pt 1), 205-218.
- Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., and Truscott, K.N. (2001). The mitochondrial import machinery for preproteins. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 36, 291-336.
- Richter, S., and Lamppa, G.K. (1998). A chloroplast processing enzyme functions as the general stromal processing peptidase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 7463-7468.
- Richter, S., Zhong, R., and Lamppa, G. (2005). Function of the stromal processing peptidase in the chloroplast import pathway. *Physiologia Plantarum* 123, 362-368.
- Rosenbaum Hofmann, N., and Theg, S.M. (2005). Toc64 is not required for import of proteins into chloroplasts in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant J* 43, 675-687.
- Rudhe, C., Clifton, R., Whelan, J., and Glaser, E. (2002^a). N-terminal domain of the dual-targeted pea glutathione reductase signal peptide controls organellar targeting efficiency. *J Mol Biol* 324, 577-585.
- Rudhe, C., Chew, O., Whelan, J., and Glaser, E. (2002^b). A novel in vitro system for simultaneous import of precursor proteins into mitochondria and chloroplasts. *Plant J* 30, 213-220.
- Saavedra-Alanis, V.M., Rysavy, P., Rosenberg, L.E., and Kalousek, F. (1994). Rat liver mitochondrial processing peptidase. Both alpha- and beta-subunits are required for activity. *J Biol Chem* 269,9284-9288.
- Sakamoto, W., Spiewoy, N., Bonnard, G., Murata, M., and Wintz, H. (2000). Mitochondrial localization of AtOXA1, an arabidopsis homologue of yeast Oxa1p involved in the insertion and assembly of protein complexes in mitochondrial inner membrane. *Plant Cell Physiol* 41, 1157-1163.
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283,1488-1493.
- Sass, E., Karniely, S., and Pines, O. (2003). Folding of fumarase during mitochondrial import determines its dual targeting in yeast. *J Biol Chem* 278, 45109-45116.

- Schatz, G., and Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.
- Schatz, G. (1997). Just follow the acid chain. *Nature* 388,121-122.
- Schleiff, E., et al. (2002^a). Structural and guanosine triphosphate/diphosphate requirements for transit peptide recognition by the cytosolic domain of the chloroplast outer envelope receptor, Toc34. *Biochemistry* 41, 1934-1946.
- Schleiff, E., Motzkus, M., and Soll, J. (2002^b). Chloroplast protein import inhibition by a soluble factor from wheat germ lysate. *Plant Mol Biol* 50, 177-185.
- Schleiff, E., and Becker, T. (2011). Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 48-59.
- Schleyer, M., Schmidt, B., and Neupert, W. (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur J Biochem* 125, 109-116.
- Schmidt von Braun, S., Sabetti, A., Hanic-Joyce, P.J., Go, J., Schleiff, E., and Joyce, P.B.M. (2007). Dual targeting of the tRNA nucleotidyltransferase in plants: not just the signal. *Journal of Experimental Botany* 58, 4083-4093.
- Schmitz, U.K., and Lonsdale, D.M. (1989). A yeast mitochondrial presequence functions as a signal for targeting to plant mitochondria in vivo. *Plant Cell* 1, 783-791.
- Schnarrenberger, C., and Martin, W. (2002). Evolution of the enzymes of the citric acid cycle and the glyoxylate cycle of higher plants. A case study of endosymbiotic gene transfer. *Eur J Biochem* 269, 868-883.
- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G., and Schatz, G. (1991). Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *EMBO J* 10, 247-254.
- Schulte, U., et al. (1989). A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetICS and biogenesis. *Nature* 339, 147-149.
- Sickmann, A., et al. (2003). The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100, 13207-13212.
- Silva-Filho, M.D., Wieers, M.C., Flugge, U.I., Chaumont, F., and Boutry, M. (1997). Different in vitro and in vivo targeting properties of the transit peptide of a chloroplast envelope inner membrane protein. *J Biol Chem* 272, 15264-15269.
- Silva-Filho, M.C. (2003). One ticket for multiple destinations: dual targeting of proteins to distinct subcellular locations. *Curr Opin Plant Biol* 6, 589-595.
- Sjöling, S., and Glaser, E. (1998). Mitochondrial targeting peptides in plants. *Trends in Plant Science* 3, 136-140.
- Slusher, L.B., Gillman, E.C., Martin, N.C., and Hopper, A.K. (1991). mRNA leader length and initiation codon context determine alternative AUG selection for the yeast gene MOD5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 9789-9793.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., and Mireau, H. (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* 38, 265-277.
- Small, I. et al. (1999). The strange evolutionary history of plant mitochondrial tRNAs and their aminoacyl-tRNA synthetases. *J. Hered.* 90, 333-337.
- Smith, M.D. (2006). Protein import into chloroplasts: an ever-evolving story. *Canadian Journal of Botany- Revue Canadienne De Botanique* 84, 531-542.
- Sohrt, K., and Soll, J. (2000). Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J Cell Biol* 148, 1213-1221.
- Soll, J., and Schleiff, E. (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 198-208.
- Sondermann, M.(2009). Charakterisierung des Transport- und Assemblierungsverhaltens der Ferritine aus *Arabidopsis thaliana*. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Stahl, T., Glockmann, C., Soll, J., and Heins, L. (1999). Tic40, a new "old" subunit of the chloroplast protein import translocon. *J Biol Chem* 274, 37467-37472.
- Staiger, C., Hinneburg, A., and Klösgen, R.B. (2009). Diversity in degrees of freedom of mitochondrial transit peptides. *Mol Biol Evol* 26, 1773-1780.

- Teng, Y.S., Su, Y.S., Chen, L.J., Lee, Y.J., Hwang, I., and Li, H.M. (2006). Tic21 is an essential translocon component for protein translocation across the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Cell* 18, 2247-2257.
- Tripp, J., Inoue, K., Keegstra, K., and Froehlich, J.E. (2007). A novel serine/proline-rich domain in combination with a transmembrane domain is required for the insertion of AtTic40 into the inner envelope membrane of chloroplasts. *Plant J* 52, 824-838.
- Truscott, K.N., et al. (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol* 8, 1074-1082.
- van Wijk, K.J., and Baginsky, S. (2011). Plastid proteomics in higher plants: current state and future goals. *Plant Physiol* 155, 1578-1588.
- Vogel, F., Hofius, D., and Sonnewald, U. (2007). Intracellular trafficking of Potato leafroll virus movement protein in transgenic Arabidopsis. *Traffic* 8, 1205-1214.
- Vojta, L., Soll, J., and Bolter, B. (2007). Requirements for a conservative protein translocation pathway in chloroplasts. *FEBS Lett* 581, 2621-2624.
- von Heijne, G. (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J* 5, 1335-1342.
- von Heijne, G., Stepphuhn, J., and Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180, 535-545.
- von Heijne, G., and Nishikawa, K. (1991). Chloroplast transit peptides. The perfect random coil? *FEBS Lett* 278, 1-3.
- von Heijne, G., Stepphuhn, J., and Herrmann, R.G. (1989). Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur. J. Biochem.* 180, 535-545.
- Waegemann, K., and Soll, J. (1996). Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* 271, 6545-6554.
- Wamboldt, Y., Mohammed, S., Elowsky, C., Wittgren, C., de Paula, W.B., and Mackenzie, S.A. (2009). Participation of leaky ribosome scanning in protein dual targeting by alternative translation initiation in higher plants. *Plant Cell* 21, 157-167.
- Weijland, A., Harmark, K., Cool, R.H., Anborgh, P.H., and Parmeggiani, A. (1992). Elongation factor Tu: a molecular switch in protein biosynthesis. *Mol Microbiol* 6, 683-688.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., and Braun, H. (2001). Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from Arabidopsis. Identification of multiple forms of TOM20. *Plant Physiol* 125, 943-954.
- Whelan, J., Knorpp, C., and Glaser, E. (1990). Sorting of precursor proteins between isolated spinach leaf mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol Biol* 14, 977-982.
- Wickner, W., and Schekman, R. (2005). Protein translocation across biological membranes. *Science* 310, 1452-1456.
- Yang, M., Jensen, R.E., Yaffe, M.P., Oppliger, W., and Schatz, G. (1988). Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes. *EMBO J* 7, 3857-3862.
- Yang, M.J., Geli, V., Oppliger, W., Suda, K., James, P., and Schatz, G. (1991). The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria. Interaction of the purified enzyme with signal peptides and a purified precursor protein. *J Biol Chem* 266, 6416-6423.
- Yogev, O., and Pines, O. (2011). Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function. *Biochim Biophys Acta* 1808, 1012-1020.
- Young, J.C., Agashe, V.R., Siegers, K., and Hartl, F.U. (2004). Pathways of chaperone-mediated protein folding in the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 781-791.
- Young, J.C., Hoogenraad, N.J., and Hartl, F.U. (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* 112, 41-50.
- Zhang, X.P., Elofsson, A., Andreu, D., and Glaser, E. (1999). Interaction of mitochondrial presequences with DnaK and mitochondrial hsp70. *J Mol Biol* 288, 177-190.
- Zhang, X.P., and Glaser, E. (2002). Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci* 7, 14-21.

ANHANG

GLOSSAR

<i>Alignment</i>	Ausrichten von homologen Aminosäuresequenzen gemäß ihrer Identität
Organelle	von Membranen umgrenzte Reaktionsräume mit spezieller Stoffwechselfunktion
Western	Immunologische Detektion von Proteinen nach deren Transfer aus einer Gelmatrix auf eine Filtermembran

ABKÜRZUNGEN

°C	Grad Celsius
aa	Aminosäure(n) (engl. <i>amino acid(s)</i>)
Abb.	Abbildung
α -MPP1	alpha-Untereinheit 1 der mitochondrialen Prozessierungspeptidase
α -MPP2	alpha-Untereinheit 2 der mitochondrialen Prozessierungspeptidase
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPS	ATP Synthase, beta3-Untereinheit
β -MPP	beta-Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungspeptidase
C-/+	Chloroplasten-Fraktion ohne/ mit Thermolysin
CaMV	Blumenkohl-Mosaikvirus (engl. <i>cauliflower mosaic virus</i>)
cDNA	komplementäre (engl. <i>copy</i>) DNA
CLSM	Konfokales Laserscanningmikroskop (engl. <i>confocal laser scanning microscope</i>)
C-Terminus	Carboxyterminus
cTP	(chloro-) plastidäres Transitpeptid
Cyt c1	Cytochrom <i>c</i> ₁
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxyribonucleic acid</i>)
dTP	duales bzw. gemischtes Transitpeptid
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EF-Tu	Elongationsfaktor Tu
engl.	Englisch
EYFP	gelb fluoreszierendes Protein (engl. <i>enhanced yellow fluorescent protein</i>)
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Oxidoreduktase
GrpE	GrpE Proteinhomolog
Hsp	Hitzeschock-Protein (engl. <i>heat-shock protein</i>)
IM	innere Membran
IMS	Intermembranraum (engl. <i>inter membrane space</i>)

kDa	Kilodalton
m	reifes Protein (engl. <i>mature protein</i>)
m _C	Prozessierungsprodukt der Chloroplasten
m _M	Prozessierungsprodukt der Mitochondrien
M-/+	Mitochondrien-Fraktion ohne/ mit Thermolysin
min	Minute(n)
µm	Micrometer
µM	Micromolar
mM	Millimolar
MIA	engl. <i>mitochondrial intermembrane space assembly machinery</i>
MPP	mitochondrielle Prozessierungspeptidase
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure (engl. <i>messenger ribonucleic acid</i>)
MSF	engl. <i>mitochondrial import stimulation factor</i>
mTP	<u>m</u> itochondrielles <u>T</u> ransitpeptid (alternativ Präsequenz)
mtRieske	mitochondrielles Eisen-Schwefel Protein
NAD(P)H	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid(-Phosphat)
N-Terminus	Aminoterminus
OEC23/33	23 kDa/33 kDa-Untereinheit des Wasserspaltungsapparats (engl. <i>oxygen evolving complex</i>) am Photosystem II
OM	äußere Membran (engl. <i>outer membrane</i>)
p	Vorläuferprotein (engl. <i>precursor protein</i>)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
RL	<u>R</u> etikulocyten <u>l</u> ysat
RuBisCO	<u>R</u> ibulose-1,5- <u>b</u> isphosphat- <u>C</u> arboxylase/ <u>O</u> xygenase
SAM	engl. <i>sorting and assembly machinery</i>
SDS	Natriumdodecylsulfonat
SPP	stromale Prozessierungspeptidase
TIC	engl. <i>translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts</i>
TIM	engl. <i>translocase of the inner mitochondrial membrane</i>
TL-/+	Translationreaktionsansatz ohne/ mit Thermolysin
TOC	engl. <i>translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts</i>
TOM	engl. <i>translocase of the outer mitochondrial membrane</i>
TPR	Tetratricopeptid-Motiv (engl. <i>tetratricopeptide repeat</i>)
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure (engl. <i>transfer ribonucleic acid</i>)
WGE	Weizenkeimextrakt (engl. <i>wheat germ extract</i>)

DANKSAGUNG

Bei meinem Betreuer Rabe Klösgen möchte ich mich bedanken für die Möglichkeit dieses bemerkenswerte Phänomen im Rahmen einer Promotion in seiner Arbeitsgruppe zu untersuchen. Außerdem danke ich ihm sehr für das in mich gesetzte Vertrauen, seinen stetigen Einsatz, die Impulse und Diskussionen zum Projekt, seine Ermutigungen sämtlichen Herausforderungen zu begegnen und dafür, dass er mir über die Wissenschaft hinaus wertvolle Erkenntnisse mit auf den Weg gegeben hat.

Ebenso möchte ich mich beim SFB 648 sowie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg für die finanzielle Unterstützung während der Bearbeitung meines Themas bedanken.

Ich danke allen ehemaligen und aktuellen Mitarbeitern der AG Rabe, ohne deren Hilfe und Unterstützung es mir nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit anzufertigen. Besonders möchte ich mich bei dem "dualen" Team bedanken, das das großartige Potential dieses Projektes erkannt und stets weiterentwickelt hat, sämtliche Hürden und Rückschläge meisterte und auch die größten Kritiker zumindest teilweise überzeugen konnte. Ich habe sehr viel gelernt in dieser besonderen Arbeitsgruppe über mich und das Wissenschaftler-Dasein und bin dankbar, dass ich so unterschiedliche und interessante Persönlichkeiten kennenlernen durfte und mit den Meisten großartige Abenteuer in den Laborräumen oder bei sämtlichen freizeithlichen Aktivitäten erleben konnte.

Den Insassen des Büros 242 danke ich ebenfalls für die durchweg auf hohem Niveau und mit viel Witz und Ironie stattgefundenen Gespräche über die Wissenschaft, das Leben oder auch die Politik, die mir stets Motivation, Frustrtoleranz, Energie und eine gewisse Leichtigkeit in den Büro- und Laboralltag gezaubert haben.

Meinen unermüdlichen Korrekturlesern danke vielmals ich für die viele Zeit, Geduld und Sorgfalt, die sie geopfert haben um meine Arbeit lesbarer zu machen.

Meinen Eltern und meinen beiden Geschwistern möchte ich besonders danken - nicht nur für die vielen aufbauenden und motivierenden Worte und uneingeschränkte Unterstützung zu jeder (Tages-)Zeit, sondern auch dafür, dass sie meinen Blick und meine Sinne immer wieder für das Wesentliche schärften, mir so viel beigebracht und immer an mich geglaubt haben.

Auch meinen Freunden, die mich nun schon viele Jahre begleiten, danke ich sehr für den Rückhalt in allen Lebenslagen und für viele wundervolle gemeinsame Erfahrungen.

Ein ganz besonderer Dank gilt Uwe, für seine unendliche Kraft und sein unerschöpfliches Verständnis, seinen Glauben an mich, seine Liebe und seinen Halt und vor allem für all die zauberhaften Dinge, die Worte nicht mehr beschreiben können...

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 benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle (Saale),

Bianca Baudisch

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name Bianca Baudisch
Geburtsdatum 31.08.1981
Anschrift Humboldtstr. 2
06114 Halle

Ausbildung und Beruf

2006 - 2011 **Wissenschaftliche Mitarbeiterin (Doktorandin)**
Arbeitsgruppe Prof. Dr. Klösgen
Institut für Biologie - Pflanzenphysiologie
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2006 **Abschluss Diplom**

2000 - 2006 **Studium Biologie**
Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Schwerpunkte: Pflanzenphysiologie, Genetik, Immunologie, Biotechnologie
Titel der Diplomarbeit: "*Subzelluläre Lokalisierung chimärer EGFP-Derivate nach transienter Transformation verschiedener Pflanzenspezies*"

2000 **Abschluss Allgemeine Hochschulreife**

1992 - 2000 Frieden-Gymnasium

1988 - 1992 Grundschule

Bianca Baudisch