

Zur Rolle der Rezeptorkomponenten der Toc159-Familie in den Proteintransportkomplexen der äußeren Hüllmembran von 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

Frau Bianca Hust
geboren am 27.02.1977
in Oldenburg

Gutachter /in:

1. Prof. Dr. R. B. Klösgen
2. Prof. Dr. K. Humbeck
3. Prof. Dr. E. Schleiff

Eingereicht am: 12 Juli 2007 in Halle (Saale)

Verteidigt am: 9. November 2007 in Halle (Saale)

urn:nbn:de:gbv:3-000012623

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000012623>]

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	V
Tabellenverzeichnis	VII
Abkürzungsverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Funktion und Evolution der Plastiden	1
1.2 Import von kernkodierten Proteinen in die Plastiden	2
1.2.1 Zusammensetzung der Toc- und Tic-Komplexe	3
1.2.2 Homologe Proteine des Toc-Kernkomplexes in <i>Arabidopsis thaliana</i>	6
1.3 Zielsetzung	9
2 Material und Methoden	10
2.1 Chemikalien	10
2.2 Enzyme	10
2.3 Molekularbiologische Kits	10
2.4 Membranen	11
2.5 Antibiotika	11
2.6 Antikörper	11
2.7 Bakterienstämme	13
2.8 Vektoren	13
2.9 Größenstandards	13
2.10 Oligonukleotide	14
2.11 Pflanzenmaterial	15
2.12 Anzucht und Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i>	16
2.12.1 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> auf Erde	16
2.12.2 Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> als hydroponische Kultur . . .	16
2.12.3 Sterilisation von Samen	16

2.12.4	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> in Sterilkultur	17
2.12.5	Pflanzentransformation durch Vakuuminfiltration	17
2.12.6	Selektion transgener Pflanzen	17
2.13	Anzucht und Transformation von <i>Escherichia coli</i> und <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	18
2.13.1	Anzucht von <i>E.coli</i>	18
2.13.2	Anlegen von Stammkulturen	19
2.13.3	Herstellung kompetenter Zellen	19
2.13.4	Transformation von <i>E.coli</i> mittels Hitzeschock	19
2.13.5	Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.13.6	Herstellung kompetenter Agrobakterien-Zellen	20
2.13.7	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	20
2.14	Proteinbiochemische Methoden	21
2.14.1	Heterologe Expression von Proteinen in Bakterien	21
2.14.2	Reinigung heterologer His ₆ -Proteine durch Ni ²⁺ -NTA-Affinitätschromatographie	21
2.14.3	Isolierung von Gesamtprotein aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
2.14.4	Isolierung von löslichen Proteinen und Gesamtmembranen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	22
2.14.5	Proteinbestimmung	23
2.14.6	Proteinfällung	23
2.14.7	SDS-PAGE nach Laemmli	24
2.14.8	Isoelektrische Fokussierung (IEF) löslicher Proteine	25
2.14.9	Native Auftrennung von Proteinkomplexen: <i>Blue native</i> -PAGE	26
2.14.10	2D-Gelelektrophorese	27
2.14.11	Färbung von Acrylamidgelen	29
2.14.12	Massenspektrometrie	31
2.14.13	Trocknen von Acrylamidgelen	32
2.14.14	Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen	32
2.14.15	Western Blot	32
2.14.16	Immundetektion mittels Enhanced Chemilumineszenz (ECL)	33
2.14.17	Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung	34
2.14.18	Reinigung von Antikörpern aus Seren mittels Affinitätschromatographie	34
2.14.19	Coimmunpräzipitation	35

2.15	Molekularbiologische Methoden	36
2.15.1	Molekularbiologische Standardmethoden	36
2.15.2	PCR	37
2.15.3	Reinigung von DNA Fragmenten	37
2.15.4	Extraktion genomischer DNA aus Pflanzenmaterial	38
2.15.5	Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial	39
2.15.6	Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial für die Reverse Transkription	39
2.15.7	Quantifizierung von DNA- und RNA-Lösungen	40
2.15.8	Agarose-Gelelektrophorese	40
2.15.9	RNA-Gele	40
2.15.10	Genomischer Southern Blot	41
2.15.11	Northern Blot	41
2.15.12	Radioaktive Markierung von DNA-Sonden	42
2.15.13	Hybridisierung von Southern Blots	43
2.15.14	Hybridisierung von Northern Blots	43
2.15.15	Reverse Transkription	44
2.15.16	<i>real-time</i> PCR	44
2.16	Klonierungen	46
2.16.1	Klonierung von <i>atToc159A-His₆</i> , <i>atToc159G-His₆</i> , <i>atToc132A-His₆</i> und <i>atToc120A-His₆</i>	46
2.16.2	Klonierung des <i>Toc132-RNAi</i> -Konstrukts	47
3	Ergebnisse	48
3.1	Antikörperherstellung	48
3.1.1	Überexpression und Reinigung der Antigene	49
3.1.2	Erkennung der Antigene durch die erhaltenen polyklonalen Antikörper	52
3.2	Charakterisierung der Toc-Rezeptor-Mutanten <i>atToc159</i> , <i>atToc132</i> und <i>atToc120</i>	58
3.2.1	Nachweis der T-DNA Insertionen	58
3.2.2	Transkriptgehalte der Toc-Gene in den Toc-Rezeptor-Mutanten	63
3.2.3	Phänotyp der Toc-Rezeptor-Mutanten	66
3.2.4	Herstellung und Analyse von RNAi-Pflanzen für <i>atToc132</i>	69

3.2.5	Akkumulation plastidärer Proteine in den <i>atToc159</i> - und <i>atToc132</i> - Mutanten	71
3.2.6	2D-Gelanalyse der <i>atToc159</i> -Mutante	74
3.2.7	DNA-Array der <i>atToc159</i> -Mutante	78
3.3	Analyse der Toc-Komplexe	83
3.3.1	Vergleich der Toc-Proteingehalte in den Toc-Rezeptor-Mutanten .	83
3.3.2	Auftrennung von Toc-Komplexen mittels BN-PAGE	85
3.3.3	2D: BN/SDS-PAGE mit Membranproteinen aus Rosettenblättern	89
3.3.4	2D: BN/SDS-PAGE mit Membranproteinen aus Wurzeln	92
3.3.5	Bestimmung der Größe und Zusammensetzung der Toc-Komplexe mittels BN/SDS-PAGE	93
3.3.6	Coimmunpräzipitation der Toc-Komplexe	95
4	Diskussion	99
4.1	Größe und Zusammensetzung der Toc-Komplexe in <i>Arabidopsis thaliana</i>	99
4.1.1	Gibt es einen großen Komplex, der <i>atToc159</i> , <i>atToc132</i> und <i>at</i> - <i>Toc120</i> gemeinsam enthält?	99
4.1.2	Größe der einzelnen Toc-Komplexe	101
4.1.3	Zusammensetzung der einzelnen Toc-Komplexe	102
4.2	Funktion der <i>Toc159</i> -Rezeptorfamilie	105
4.2.1	Hinweise auf unterschiedliche Funktionen für <i>atToc159</i> , <i>atToc132</i> und <i>atToc120</i>	105
4.2.2	Potentielle Substrate von <i>atToc159</i>	107
4.2.3	Potentielle Substrate von <i>atToc132</i>	109
4.3	Schlussfolgerungen und Arbeitsmodell	111
5	Zusammenfassung	114
	Literaturverzeichnis	116
	Publikationsliste	129

Abbildungsverzeichnis

1.1	Proteinimport in Chloroplasten	3
1.2	Schematische Darstellung der Toc159-Rezeptorfamilie	7
2.1	Klonierungsschema für das Toc132RNAi-Konstrukt	47
3.1	Aufbau der Antigenkonstrukte	49
3.2	Überexpression und Reinigung der Antigene	50
3.3	AtToc159A-His ₆ in pET-28(+)	52
3.4	Gereinigter Toc132A-Antikörper	53
3.5	Sensitivität von α Toc159G	53
3.6	Spezifität und Sensitivität der Toc-Antikörper	54
3.7	Antikörpertest auf <i>Arabidopsis thaliana</i>	56
3.8	T-DNA Insertionen	59
3.9	Nachweis der Homozygotie	60
3.10	Southernanalyse von <i>atToc132</i>	61
3.11	Southernanalyse von <i>atToc120</i>	62
3.12	Northernanalyse von <i>atToc159</i>	63
3.13	Northernanalyse von <i>atToc132</i>	64
3.14	RT-PCR auf <i>atToc120</i>	64
3.15	Phänotyp von <i>atToc159</i> auf Erde	66
3.16	Phänotyp von <i>atToc159</i> in verschiedenen Entwicklungsstadien	66
3.17	TEM-Aufnahmen von <i>atToc159</i>	67
3.18	Phänotyp von <i>atToc132</i> und <i>atToc120</i>	68
3.19	Analyse der <i>atToc132</i> -RNAi-Pflanzen	69
3.20	Photosynthetische Proteine in <i>atToc159</i>	71
3.21	Nicht-photosynthetische Proteine in <i>atToc159</i>	72
3.22	Photosynthetische und nicht-photosynthetische Proteine in <i>atToc132</i>	73
3.23	2D-Gele vom WT und <i>atToc159</i>	75

3.24	Graphische Darstellung des DNA-Arrays von <i>atToc159</i>	78
3.25	Kontroll-Northern zum DNA-Array von <i>atToc159</i>	80
3.26	Toc-Proteine in den Toc-Rezeptor-Mutanten	84
3.27	Auftrennung von Toc-Komplexen mittels BN-PAGE	86
3.28	Westernanalyse der BN-Gele	88
3.29	Zweidimensionale BN/SDS-PAGE vom WT/Ws und <i>atToc159</i>	90
3.30	Zweidimensionale BN/SDS-PAGE vom WT/Col-0, <i>atToc132</i> , <i>atToc120</i> , <i>atToc33</i> und <i>atToc34</i>	91
3.31	Vergleich der Toc-Proteine in Blättern und Wurzeln	92
3.32	Zweidimensionale BN/SDS-PAGE von WT/Col-0 Wurzelmembranprote- inen	93
3.33	Zweidimensionale BN/SDS-PAGE vom WT/Col-0	94
3.34	Kontroll-Coimmunpräzipitation mit TatB- bzw. ohne Antikörper	95
3.35	Coimmunpräzipitation von Toc-Komplexen aus <i>A. thaliana</i> mit den Toc- Antikörpern	97
4.1	Arbeitsmodell zur Komplexzusammensetzung und Substratspezifität der Toc159-Homologen in <i>Arabidopsis thaliana</i>	112

Tabellenverzeichnis

2.3	Klonierung von <i>atToc159A-His₆</i> , <i>atToc132A-His₆</i> , <i>atToc120A-His₆</i> und <i>atToc159G-His₆</i>	46
3.1	Homologievergleich der Toc-Rezeptorproteine	48
3.2	Relativer Transkriptgehalt der Toc-Gene in den Toc-Rezeptormutanten .	65
3.3	Durch 2D-Gele und Massenspektrometrie identifizierte Spots in der <i>atToc159</i> -Mutante	76
3.4	DNA-Array der <i>atToc159</i> -Mutante	81

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
A_x	Absorption bei einer Wellenlänge von x nm
APS	Ammoniumperoxodisulfat
<i>A. th.</i> und <i>at</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Cm ^R	Chloramphenicolresistenz
<i>bar</i>	Phosphinothricin-Resistenz-Gen
Bistris	Bis-(2-hydroxyethyl)-imino-tris-(hydroxymethyl)-methan
bp	Basenpaare
BN	<i>Blue native</i>
CaMV	Blumenkohl Mosaik Virus (<i>Cauliflower Mosaic Virus</i>)
cDNA	komplementäre (<i>copy-</i>) DNA
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethylamino]-1-propan-sulfonat
Col-0	Columbia-0, Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromide
C-Terminus	Carboxylterminus
dCTP	Desoxycytidin-5'-triphosphat
DMF	Dimethylformamide
DMSO	Dimethylsulfoxide
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dsDNA	doppelsträngige DNA
DTT	Dithiothreitol
ECL	verstärkte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FG	Frischgewicht
FNR	Ferredoxin-NADP ⁺ -Reduktase

GDP	Guanosindiphosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Gly	Glycin
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-Ethansulfonsäure
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
k. A.	keine Angabe
kb	Kilobasen
KOH	Kaliumhydroxid
λ	Wellenlänge
l	Liter
<i>lacI</i>	Lac-Repressor-Gen
lac O	Lactose-Operon
LHC	Lichtsammelkomplex (<i>light harvesting complex</i>)
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ M	Micromolar
M	Molar
MCS	Bereich mit vielen Schnittstellen (<i>multi cloning site</i>)
min	Minute
mg	Milligramm
MLP	Major Latex Protein
mM	Millimolar
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA (<i>messenger RNA</i>)
nm	Nanometer
NaOH	Natriumhydroxid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
N-Terminus	Aminoterminus
Ni ²⁺ -NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure (<i>nickel-nitrilotriacetic acid</i>)
OEC	Wasserspaltungsapparat (<i>oxygen-evolving complex</i>)
OD _x	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von x nm
³² P	Phosphor-Isotop mit der Atommassenzahl 32
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
pET	<i>plasmid for Expression by T7 RNA Polymerase</i>
pFd	Vorstufenprotein von Ferredoxin
pSSU	Vorstufenprotein von SSU
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase
U/min	Umdrehungen pro Minute
RBS	Ribosomenbindestelle
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SSU	Kleine Untereinheit der RubisCO
Tic	Translokon an der inneren chloroplastidären Hüllmembran
<i>tag</i>	Markierung
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transfer DNA
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
T_m	Schmelztemperatur
Toc	Translokon an der äußeren chloroplastidären Hüllmembran
Urea	Harnstoff
V	Volt
(v/v)	Volumen/Volumen
(w/v)	Gewicht/Volumen
Ws	Wassilewskija, Ökotyp von <i>Arabidopsis thaliana</i>
WT	Wildtyp
x g	x-fache der Erdbeschleunigung
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- <i>beta</i> -D-galactopyranosid

Anmerkung:

Alle englischsprachigen Ausdrücke, die auch im deutschen gebräuchlich sind wurden kursiv geschrieben. Gennamen wurden gemäß der allgemeinen Konvention kursiv und Proteinnamen in normaler Schrift geschrieben. Ebenfalls kursiv hervorgehoben wurden die Namen von Mutanten, die in dieser Arbeit nach den betroffenen Genen benannt sind.

1 Einleitung

1.1 Funktion und Evolution der Plastiden

Pflanzen zeichnen sich durch den Besitz von Plastiden aus. Zu ihnen gehören die Proplastiden, Chromoplasten, Leukoplasten und als wichtigste Vertreter die Chloroplasten. In ihnen findet die für die photoautotrophen Pflanzen lebenswichtige Photosynthese statt. Dabei wird die Lichtenergie unter Freisetzung von Sauerstoff in chemische Energie umgewandelt, welche für den Aufbau von organischen Verbindungen genutzt wird. Neben der Photosynthese erfolgt in den Plastiden die Ammoniumassimilation, sowie die Synthese von Lipiden, Aminosäuren und je nach Pflanzenart unterschiedlichen Sekundärstoffen.

Die Entstehung der Chloroplasten wird auf ein endosymbiotisches Ereignis zurückgeführt, bei dem ein photosynthetisch aktiver Prokaryot von einer eukaryotischen Zelle, die einen Vorläufer der heutigen Mitochondrien enthielt, phagozytiert wurde (Gray, 1989; Schimper, 1883). Basierend auf Sequenzanalysen ist davon auszugehen, dass es sich bei dem photosynthetischen Prokaryot um einen Vorfahren der heutigen Cyanobakterien (McFadden, 1999) und bei den Mitochondrien, die ebenfalls endosymbiotisch entstanden sind, um Proteobakterien als Vorfahren (Gray et al., 1999) handelt.

Begründet durch ihre endosymbiotische Herkunft, besitzen die Chloroplasten eine doppelte Hüllmembran, die das Stroma und die darin liegenden Thylakoide mit den Photosynthesekomplexen umschließen. Des Weiteren verfügen sie über ein eigenes Genom und sind in der Lage Proteine selbst zu synthetisieren. Allerdings erfolgte im Laufe der Evolution ein massiver Gentransfer vom Genom des Endosymbionten in den Kern der Wirtszelle (Martin und Herrmann, 1998; Martin et al., 2002), welcher die genetische Kontrolle übernahm. Das Genom des nun semiautonomen Organells der höheren Pflanzen kodiert nur noch für ~ 100 Gene (Sugiura, 1995). Alle anderen ~ 2100 kernkodierten Proteine (Richly und Leister, 2004), die für die Aufrechterhaltung der plastidären Funktionen benötigt werden, müssen nach ihrer im Cytosol stattfindenden Synthese in die Plastiden transportiert werden.

1.2 Import von kernkodierten Proteinen in die Plastiden

Damit die kernkodierten Plastidenproteine zu ihrem Bestimmungsort gelangen, werden die meisten Proteine mit einer N-terminalen Extension, dem Transitpeptid, synthetisiert (Bruce, 2000, 2001). Analysen der primären Aminosäuresequenz ergaben, dass die Transitpeptide dieser Vorstufenproteine ganz unterschiedliche Längen von ca. 10 – 100 Aminosäuren aufweisen und viele hydrophobe, hydroxylierte sowie positiv geladene, aber kaum saure Aminosäurereste besitzen, so dass sie insgesamt positiv geladen sind (Zhang und Glaser, 2002). Diese Transitpeptide sind sowohl notwendig, als auch ausreichend für den Transport in die Plastiden (Keegstra et al., 1989).

Wie in Abb. 1.1 dargestellt, vollzieht sich der Import der Vorstufenproteine in die Chloroplasten über zwei Multiproteinkomplexe, wobei die Translokation über die äußere Membran über den Toc- (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts*) und die über die innere Hüllmembran über den Tic-Komplex (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*) erfolgt. In einem energieunabhängigen Schritt binden zunächst die Vorstufenproteine an Rezeptorproteine, die sich auf der Oberfläche der Chloroplasten befinden (Perry und Keegstra, 1994). Es folgt eine partielle Translokation über die äußere Hüllmembran in Gegenwart von geringen Mengen GTP und ATP ($\leq 100 \mu\text{M}$) (Olsen und Keegstra, 1992; Young et al., 1999). Größere ATP-Mengen sind für die komplette Translokation des Vorstufenproteins über beide Hüllmembranen ins Stroma notwendig (Theg et al., 1989). Benötigt wird die Energie sehr wahrscheinlich von stromalen Chaperonen, die am Transport der Proteine beteiligt sind (Pain und Blobel, 1987). Im Stroma wird das Transitpeptid von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten (Richter und Lamppa, 2002).

Für einige Transitpeptide wurde von Waegemann und Soll (1996) beobachtet, dass sie *in vitro* phosphoryliert werden können und dann von einem sogenannten *Guidance*-Komplex, bestehend aus 14-3-3 Proteinen und Hsp70, gebunden werden (May und Soll, 2000). Für die kleine Untereinheit der RubisCO wurde nachgewiesen, dass sie, durch Interaktion mit dem *Guidance*-Komplex, mit 3 – 4 mal höherer Effizienz im Vergleich zum freien Vorstufenprotein in isolierte Chloroplasten transportiert wird (May und Soll, 2000). Ob die Phosphorylierung der Transitpeptide auch *in vivo* eine Rolle spielt bleibt fraglich, da eine Mutation der Phosphorylierungsstelle im Transitpeptid der kleinen Untereinheit der RubisCO in *Arabidopsis thaliana* zu keinem veränderten Import führt (Nakrieko et al., 2004).

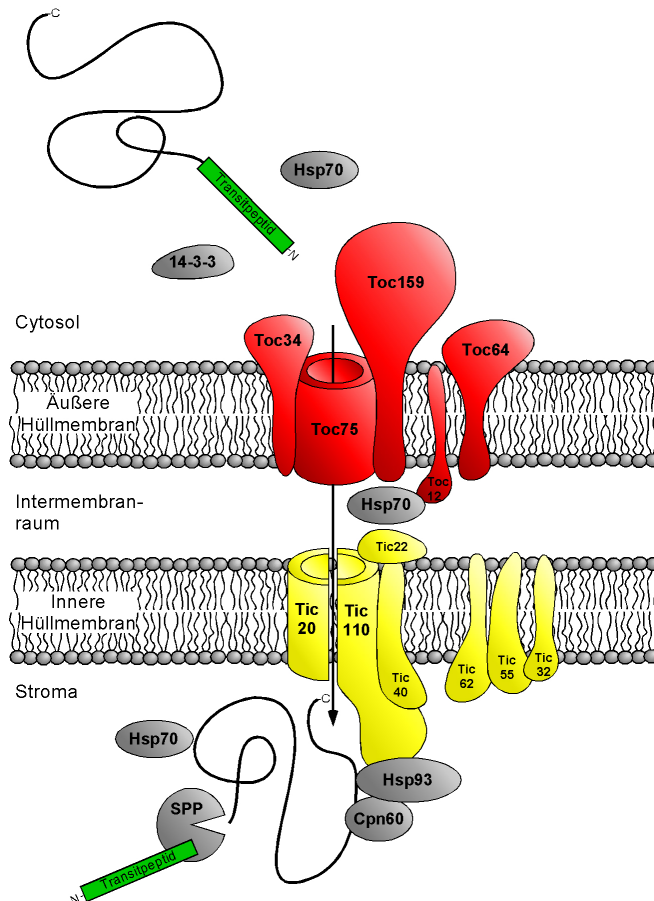


Abb. 1.1: Proteinimport in Chloroplasten. Kernkodierte Chloroplastenproteine (Vorstufenproteine) gelangen aus dem Cytosol über die äußere und innere Hüllmembran ins Stroma. Dort angelangt wird das Transitpeptid von der stromalen Prozessierungspeptidase (SPP) abgespalten. Die Translokation über die äußere bzw. innere Hüllmembran erfolgt über den Toc- (*translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts*) bzw. Tic-Komplex (*translocon at the inner envelope membrane of chloroplasts*). Der Toc-Komplex ist in rot, der Tic-Komplex in gelb und weitere am Transport beteiligte Proteine sind in grau dargestellt.

1.2.1 Zusammensetzung der Toc- und Tic-Komplexe

Die Komponenten des Toc- und Tic-Komplexes wurden erstmals aus Erbse isoliert (Wae-gemann und Soll, 1991; Perry und Keegstra, 1994; Hirsch et al., 1994; Kessler et al., 1994; Schnell et al., 1994; Wu et al., 1994; Seedorf et al., 1995; Tranel et al., 1995).

Durch den Einsatz von Quervernetzungs-Techniken, sowie den verlangsamten *in vitro* Import von Vorstufenproteinen in isolierte Chloroplasten, wurde ein Toc-Kernkomplex identifiziert, der sich aus den Proteinen Toc159, Toc75 und Toc34 zusammensetzt (Kessler et al., 1994; Hirsch et al., 1994; Seedorf et al., 1995; Perry und Keegstra, 1994). Die Zahlen im Namen geben nach einer Konvention aus dem Jahre 1997 das berechnete Mo-

lekulargewicht an, welches von der cDNA-Sequenz abgeleitet wird (Schnell et al., 1997). Für den Toc-Kernkomplex wurde ein apparentes Molekulargewicht von ~ 500 kDa und ein stöchiometrisches Verhältnis von 1:4:4-5 zwischen Toc159, Toc75 und Toc34 ermittelt (Schleiff et al., 2003b).

Toc159 und Toc34 sind C-terminal in die Membran integriert und besitzen einen weitaus größeren ins Cytosol ragenden N-terminalen Bereich (Hirsch et al., 1994; Kessler et al., 1994; Seedorf et al., 1995). Dieser Bereich besteht bei Toc159 aus einer N-terminalen sauren Domäne (A-Domäne) und einer zentralen GTP-Bindedomäne (G-Domäne), der sich auf der C-terminalen Seite der Membrananker (M-Domäne) anschließt (Bölter et al., 1998; Chen et al., 2000) (siehe Abb. 1.2, analog zu atToc159 aus *Arabidopsis*). Toc159 wurde zunächst als kleineres Toc86 (Hirsch et al., 1994; Schnell et al., 1994) identifiziert, was darauf hinweist, dass die A-Domäne leicht proteolytisch abbaubar ist (Bölter et al., 1998; Chen et al., 2000). Chloroplasten mit intaktem Toc159 weisen eine höhere Importrate auf, als solche mit Toc86 (Bölter et al., 1998). Laut Hiltbrunner et al. (2001b) gibt es auch eine cytosolische Form von Toc159 von der angenommen wird, dass sie abwechselnd im Cytosol und in der Hüllmembran vorkommt. Sie soll Vorstufenproteine im Cytosol binden und zum Chloroplasten dirigieren. Das Vorhandensein der cytosolischen Form wird jedoch von Becker et al. (2004b) in Frage gestellt.

Der cytosolische Bereich von Toc34 besitzt ebenfalls wie Toc159 eine GTP-Bindedomäne (Kessler et al., 1994) und weist auch über die konservierten G-Motive (Bourne et al., 1991) hinaus signifikante Homologie zu Toc159 auf. Beide Proteine dienen als Rezeptorproteine für Vorstufenproteine (Perry und Keegstra, 1994; Ma et al., 1996; Sveshnikova et al., 2000b; Schleiff et al., 2002). Die G-Domäne spielt offenbar eine entscheidende Rolle, da Toc159 und Toc34 in der GTP gebundenen Form die größte Affinität zu den Vorstufenproteinen aufweisen (Schleiff et al., 2002; Becker et al., 2004b). Weiterhin können die G-Domänen der beiden Proteine in der GDP-gebundenen Form sowohl Homo- als auch Heterodimere miteinander bilden (Weibel et al., 2003; Sun et al., 2002). Es gibt zwei Theorien, welcher Toc-Rezeptor als initialer Rezeptor der Transitpeptide dient. Nach der „*targeting*“-Hypothese (Keegstra und Froehlich, 1999; Kessler und Schnell, 2004, 2006) ist Toc159 und nach der „Motor“-Hypothese (Schleiff et al., 2003a; Becker et al., 2004b) Toc34 der erste Bindungspartner der Vorstufenproteine (Kessler und Schnell, 2004).

Bei der „*targeting*“-Hypothese binden die Transitpeptide der Vorstufenproteine an membrangebundenes oder cytosolisches Toc159 in der GTP gebundenen Form (Toc159_{GTP}). Zusammen mit der G-Domäne von Toc34_{GTP} bildet es ein GTP-reguliertes Tor zur

Translokase. Eine durch die Vorstufenproteine ausgelöste Hydrolyse von GTP zu GDP soll eine Konformationsänderung der GTPasen hervorrufen, die die Insertion der Vorstufenproteine in den Translokationskanal fördert. Die Translokation an sich wird durch ein im Intermembranraum lokalisiertes Hsp70, in einem ATP-abhängigen Zyklus, angetrieben.

Bei der „Motor“-Hypothese bindet ein phosphoryliertes Transitpeptid mit seinem C-terminalen Bereich an Toc34_{GTP} und anschließend mit dem N-terminalen Bereich des Transitpeptids an Toc159_{GTP}. Eine durch das Vorstufenprotein ausgelöste GTP-Hydrolyse von Toc34 führt zur Heterodimerisierung mit Toc159 und zur Dissoziation des Vorstufenproteins von Toc34. Nach der Dephosphorylierung des Transitpeptids bindet der C-terminale Bereich des Transitpeptids ebenfalls an Toc159_{GTP} und bewirkt die GTP-Hydrolyse von Toc159, welches dann unter Konformationsänderung das Vorstufenprotein durch den Translokationskanal schiebt.

Als Translokationskanal in der äußeren Hüllmembran dient Toc75, welches *in vitro* einen Kanal bildet (Hinnah et al., 1997, 2002), 16 β -Faltblätter besitzt (Sveshnikova et al., 2000a) und eine geringe Affinität zu Vorstufenproteinen aufweist (Chen et al., 2000; Hinnah et al., 2002).

Neben den Komponenten des Toc-Kernkomplexes wurde auch für Toc64 und Toc12 eine lockere Assoziation mit dem Toc-Komplex nachgewiesen (Sohrt und Soll, 2000; Becker et al., 2004a). Toc64 besitzt eine große cytosolische und ebenfalls eine in den Intermembranraum gerichtete Domäne (Qbadou et al., 2007), für welche zusammen mit Hsp70, Toc12 und Tic22 eine Beteiligung am Transport der Vorstufenproteine durch den Intermembranraum angenommen wird (Becker et al., 2004a). Toc12 ist N-terminal in der äußeren Hüllmembran inseriert und besitzt eine katalytische, C-terminale Domäne, die in den Intermembranraum hineinreicht. Sie ist möglicherweise für die Aktivierung der ATPase Aktivität von Hsp70 zuständig (Becker et al., 2004a).

An der Translokation von Vorstufenproteinen über die innere Hüllmembran sind Tic110, Tic40, Tic55, Tic62, Tic32, Tic22 und Tic20 beteiligt, wobei Tic110 als erstes identifiziert wurde (Lübeck et al., 1996; Akita et al., 1997). Es enthält zwei kurze α -helikale Membrananker am C-Terminus und eine große N-terminale, stromale Domäne (Inaba et al., 2003). In Quervernetzungs-Experimenten konnte eine Interaktion mit Vorstufenproteinen beobachtet werden, wobei die Transitpeptid-Bindestelle offenbar im stromalen Bereich liegt (Inaba et al., 2003). Es gibt Hinweise, dass Tic110 einen Teil des Translokationskanals bildet (Heins et al., 2002) und stromale Chaperone rekrutiert, da es meist mit Hsp93 (auch Hsp100 bzw. ClpC genannt) und Cpn60 im Komplex isoliert wurde

(Kessler et al., 1994; Akita et al., 1997; Nielsen et al., 1997). Ebenfalls im Komplex mit Tic110 und Hsp93 kommt Tic40 vor (Chou et al., 2003). Tic40 ist ein integrales Membranprotein mit einer großen stromalen Domäne (Chou et al., 2003). Es ist wahrscheinlich als Co-Chaperon am Import von Vorstufenproteinen beteiligt (Kovacheva et al., 2005). Tic22 ist als lösliches Protein im Intermembranraum nur peripher mit der inneren Hüllmembran assoziiert und interagiert mit Vorstufenproteinen (Kouranov und Schnell, 1997; Kouranov et al., 1998). Für Tic20 wurden vier transmembrane α -Helices vorausgesagt, weshalb es möglich ist, dass es einen Teil des Translokationskanals bildet (Kouranov et al., 1998; Chen et al., 2002). Bei Tic55, Tic62 und Tic32 handelt es sich um Redoxproteine (Caliebe et al., 1997; Küchler et al., 2002; Hörmann et al., 2004), die möglicherweise den Proteinimport regulieren (Kessler und Schnell, 2006).

1.2.2 Homologe Proteine des Toc-Kernkomplexes in *Arabidopsis thaliana*

Zu den drei aus Erbse isolierten Proteinen des Toc-Kernkomplexes (Toc159, Toc75, Toc34) wurden in *Arabidopsis thaliana* mehrere homologe Gene identifiziert (Jackson-Constan und Keegstra, 2001; Bauer et al., 2000; Hiltbrunner et al., 2001a).

Die Analysen des Genoms ergaben, dass drei kodierende Bereiche eine große Ähnlichkeit zum *Toc75*-Gen aus Erbse aufweisen. Diese sind *atToc75-I*, *atToc75-III* und *atToc75-IV* (Jackson-Constan und Keegstra, 2001), die nach ihrer chromosomalen Lokalisation benannt sind. Bei *atToc75-I* handelt es sich um ein nicht exprimiertes Pseudogen. *atToc75-IV* und *atToc75-III* werden beide exprimiert, wobei nur *atToc75-III* für ein vollständiges Toc75 kodiert. Das Genprodukt von *atToc75-IV* ist am N-Terminus verkürzt. *Arabidopsis*-Nullmutanten für diese zwei Gene zeigen, dass die *atToc75-IV*-Mutante keinen veränderten Phänotyp aufweist, aber die *atToc75-III*-Mutante schon im Zweizellstadium der Embryoentwicklung verbleibt (Baldwin et al., 2005; Hust und Gutensohn, 2006). Dieses deutet darauf hin, dass nur ein zu Toc75 homologes Protein (*atToc75-III*) in *Arabidopsis* existiert.

Für die Rezeptorproteine Toc34 und Toc159 kodieren in *Arabidopsis thaliana* kleine Genfamilien mit zwei Genen für Toc34 (*atToc33* und *atToc34*) und vier Genen für Toc159 (*atToc159*, *atToc132*, *atToc120* und *atToc90*).

atToc33 und *atToc34* werden beide entwicklungsabhängig reguliert und weisen den höchsten Transkriptgehalt in jungen Pflanzen auf, wobei *atToc33* stärker in Blättern und *atToc34* stärker in Wurzeln exprimiert wird (Jarvis et al., 1998; Gutensohn et al., 2000;

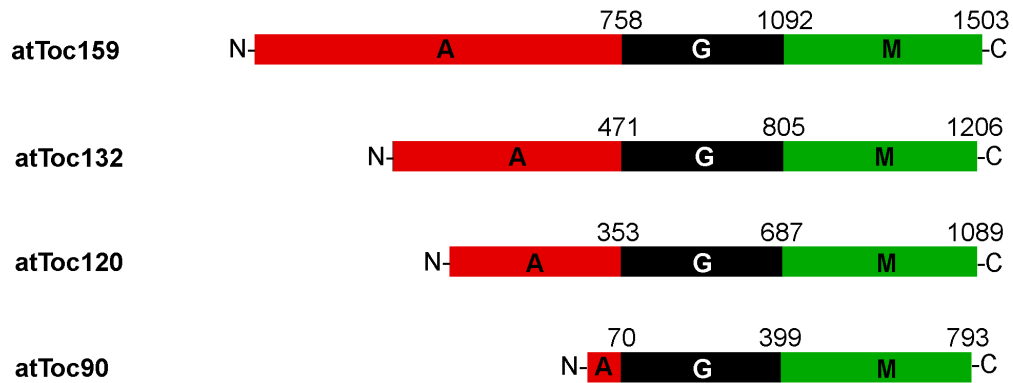


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der Toc159-Rezeptorfamilie aus *Arabidopsis thaliana*. Angegeben sind die Längen ausgehend vom N-Terminus in Aminosäuren. A=Saure Domäne, G=GTP-Bindedomäne, M=Membrananker

Vojta et al., 2004). *Arabidopsis*-Nullmutanten und Antisensepflanzen für *atToc33* zeigen einen hell gelblichen und für *atToc34* keinen veränderten Phänotyp (Jarvis et al., 1998; Gutensohn et al., 2000, 2004; Constan et al., 2004). In biochemischen Untersuchungen konnten unterschiedliche Affinitäten von atToc33 und atToc34 zu Vorstufenproteinen festgestellt werden (Gutensohn et al., 2000; Jelic et al., 2003).

In *Arabidopsis* Keimlingen wurde mRNA von *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* nachgewiesen, wobei der Gehalt der *atToc159*-mRNA fünfmal so hoch ist wie der von *atToc132* bzw. *atToc120* (Bauer et al., 2000). Für atToc90 wurde ebenfalls eine exprimierte cDNA nachgewiesen, so dass anzunehmen ist, dass es sich um ein aktives Gen handelt (Hiltbrunner et al., 2001a). Für alle vier Gene sind die abgeleiteten Proteine in Abb. 1.2 dargestellt.

Die größte Homologie mit dem Toc159-Protein aus Erbse weist atToc159 mit einer Übereinstimmung von 48 % insgesamt und 74 % in der G- und M-Domäne auf (Bauer et al., 2000). Innerhalb der Toc159-Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* (Abb. 1.2) sind die G- und M-Domänen am stärksten konserviert ($\sim 65\%$ Identität zwischen atToc159/atToc132/atToc120) (Bauer et al., 2000). Sehr unterschiedlich sind hingegen die A-Domänen, die sowohl in der Länge als auch Sequenz stark differieren ($\sim 20\%$ Identität zwischen atToc159/atToc132/atToc120) (Bauer et al., 2000). AtToc90 ist phylogenetisch am weitesten von allen anderen entfernt und besitzt nur eine stark verkürzte A-Domäne (Hiltbrunner et al., 2001a). Die G- und M-Domäne ist zu den anderen Homologen zu $\sim 38\%$ identisch.

Arabidopsis-Nullmutanten für atToc159 weisen einen albino Phänotyp auf und sind keimlingsletal (Bauer et al., 2000). Für zwei kernkodierte photosynthetische Proteine wurde

ein verringerter Proteingehalt in der Mutante nachgewiesen. Während ihre Transkripte in der Mutante ebenfalls reduziert vorlagen, war für ein cytosolisches Protein und ein nicht-photosynthetisches Plastidenprotein kein veränderter Transkriptgehalt nachweisbar. Für die ebenfalls nicht-photosynthetischen Proteine atToc75 und atTic110 war der Proteingehalt gegenüber dem WT unverändert. Diese Beobachtungen weisen darauf hin, dass atToc159 möglicherweise für den Import von photosynthetischen Proteinen verantwortlich ist (Bauer et al., 2000). Für den Import der geringen Mengen an photosynthetischen Proteinen und derer, die in der Mutante nicht betroffen sind, könnten atToc132, atToc120 oder atToc90 verantwortlich sein, die möglicherweise weitere Importkomplexe mit bestimmten Substratspezifitäten bilden (Bauer et al., 2000; Hiltbrunner et al., 2001a). In *in vitro* Versuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl atToc159 als auch atToc132 und atToc120 in Erbsenhüllmembranen inserieren und zusammen mit dem Toc34 Erbsenprotein coimmunpräzipitiert werden können (Bauer et al., 2000).

1.3 Zielsetzung

Im Rahmen dieser Arbeit galt es der Frage nach der Funktion der homologen Proteine atToc159, atToc132 und atToc120 nachzugehen. Anhand der Ergebnisse von Bauer et al. (2000), die gezeigt haben, dass alle drei Proteine in die Hüllmembranen von Erbsen inserieren und im Komplex mit Toc34 vorliegen, war davon auszugehen, dass sie alle, wie ihr Toc159-Homolog aus Erbse, ebenfalls als Rezeptoren für Vorstufenproteine dienen. Hier sollte geklärt werden, warum gleich drei Rezeptoren vorhanden sind, und welche Funktion sie besitzen. Darüber hinaus sollte die Größe und Zusammensetzung des Toc-Komplexes analysiert werden. Dabei galt es herauszufinden, ob jeweils nur ein Vertreter der Toc159-Familie mit atToc75 und atToc33/atToc34, oder aber alle zusammen einen Komplex bilden.

Zur Beantwortung dieser Fragen sollten:

1. *Arabidopsis*-Nullmutanten für die entsprechenden Gene *atToc159*, *atToc132* bzw. *atToc120* isoliert und analysiert werden. Ihr Phänotyp, sowie die veränderten Protein- und Transkriptgehalte, sollten Hinweise auf die Funktion der jeweiligen Proteine geben. In den Mutanten fehlende Plastidenproteine könnten Substrate eben dieser fehlenden Rezeptorproteine sein.
2. spezifische Antikörper gegen atToc159, atToc132 und atToc120 hergestellt werden, die für die Analyse der Mutanten, als auch der Toc-Komplexe benötigt werden. Dazu musste zunächst anhand von Sequenzvergleichen überprüft werden, welche Bereiche zwischen allen Toc159-Vertretern eine geringe Sequenzübereinstimmung aufweisen. Die ausgewählten Bereiche sollten dann heterolog in *E. coli* überexprimiert, und nach erfolgreicher Reinigung für die Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung eingesetzt werden.
3. die Toc-Komplexe aus den Hüllmembranen solubilisiert und mittels *Blue Native*-PAGE im Hinblick auf Größe und Zusammensetzung analysiert werden. Für diese Untersuchung sollten auch die Nullmutanten herangezogen werden. Da das Fehlen eines Rezeptorproteins zur Größenänderung des Toc-Komplexes führen könnte, kann auch die Analyse von Mutanten weiteren Aufschluss über den Aufbau der Komplexe geben. Die Zusammensetzung des Toc-Komplexes sollte ebenfalls durch Coimmunpräzipitationen untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien entsprachen dem analytischen Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders angegeben, von einer der folgenden Firmen bezogen: Biomol (Hamburg), Difco (Detroit, USA), Duchefa (Haarlem, Niederlande), Fluka über Sigma-Aldrich, Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen).

Radioaktives Nukleotid α [³²P]-dCTP wurde von Amersham Biosciences (Freiburg) bezogen.

2.2 Enzyme

Die verwendeten Enzyme wurden von New England Biolabs (Frankfurt am Main), Roche (Mannheim) und MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

2.3 Molekularbiologische Kits

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Isolation von Plasmid-DNA (Miniprep)	NucleoSpin [®] Plasmid	Macherey-Nagel
Isolation von Plasmid-DNA (Midiprep)	NucleoBond [®] PC 100	Macherey-Nagel
Reinigung von DNA-Fragmenten	NucleoSpin [®] Extract	Macherey-Nagel
Sequenzierung von DNA	ABI PRISM [®] dRhodamine	Applied Biosystems
Isolation von RNA	TRIZOL [®] Reagent	Invitrogen

2.4 Membranen

Anwendung	Bezeichnung	Herkunft
Proteintransfer	Immobilon™-P (PVDF-Membran)	Millipore
Nukleinsäuretransfer	Biodyne®B 0.45 μ m (Nylon-Membran)	Pall Corporation

2.5 Antibiotika

	Stammlösung	Arbeitskonz.	Herkunft
Ampicillin	50 mg/ml	100 μ g/ml	Serva
Kanamycin	50 mg/ml	50 μ g/ml	Serva
Chloramphenicol (in Ethanol)	34 mg/ml	34 μ g/ml	Sigma-Aldrich
Gentamycin	25 mg/ml	25 μ g/ml	Duchefa
Rifampicin (in DMSO)	100 mg/ml	100 μ g/ml	Fluka
Cefotaxim	250 mg/ml	500 μ g/ml	Duchefa
DL-Phosphinothricin	5 mg/ml	12 μ g/ml	Duchefa

2.6 Antikörper

Alle nachfolgenden Antikörper sind polyklonal und wurden in Kaninchen produziert. Nur α Penta-His ist ein monoklonaler Antikörper aus Maus-Hybridomzellen.

Bezeichnung (Gerichtet gegen)	Verdünnung	kDa	Herkunft	
α OEC16	(Spinat)	1:2 000	16	Berghöfer (1998)
α OEC23	(Spinat)	1:2 000	23	Berghöfer (1998)
α OEC33	(Spinat)	1:2 000	33	Berghöfer (1998)
α CP24	(Spinat)	1:2 000	24	Berghöfer (1998)
α LHCa1		1:1 000	21,6	Agrisera (Stockholm)
α LHCa2		1:1 000	23,4	Agrisera (Stockholm)
α PSI-3	(Spinat)	1:2 000	17	Berghöfer (1998)
α FNR	(Spinat)	1:2 000	34	Berghöfer (1998)
α Hcf136		1:5 000	37	P. Westhoff
α Rieske	(Spinat)	1:3 000	20	Berghöfer (1998)
α Cf ₀ -II	(Spinat)	1:2 000	17	Berghöfer (1998)
α SSU		1:2 000	14	Flügge
α LHcb1		1:2 000	24	Agrisera (Stockholm)

Bezeichnung (Gerichtet gegen)	Verdünnung	kDa	Herkunft
α LHcb2		1:1 000	25 Agrisera (Stockholm)
α Hsp70	(Hefe)	1:3 000	70 Th. Langer
α Hsp60	(Hefe)	1:3 000	60 Th. Langer
α ClpP	(Weizen)	1:2 000	22 U. Johanningmeier
α SRP54	(Ffh, <i>E. coli</i>)	1:2 000	54
α TatB	(<i>A. th.</i>)	1:1 000	31 M. Jacob
α Toc75	(Erbse)	1:2 000	75 John E. Froehlich
α Tic110	(Erbse)	1:3 000	110 John E. Froehlich
α Tic40	(<i>A. th.</i>)	1:3 000	40 John E. Froehlich
α Toc33	(<i>A. th.</i>)	1:500	33 Voigt et al. (2005)
α Toc34	(<i>A. th.</i>)	1:750	34 Voigt et al. (2005)
α Toc159A (Gly)	(<i>A. th.</i>)	1:1 000	230 diese Arbeit
α Toc159A (Urea)	(<i>A. th.</i>)	1:500	230 diese Arbeit
α Toc132A (Gly)	(<i>A. th.</i>)	1:750	200 diese Arbeit
α Toc132A (Urea)	(<i>A. th.</i>)	1:250	200 diese Arbeit
α Toc120A (Gly)	(<i>A. th.</i>)	1:750	170 diese Arbeit
α Toc120A (Urea)	(<i>A. th.</i>)	1:250	170 diese Arbeit
α Toc159G (Gly)	(<i>A. th.</i>)	1:750	230 diese Arbeit
α Penta-His		1:1 000	- Quiagen

Als sekundäre Antikörper wurden eingesetzt:

<i>Anti-Mouse IgG-Peroxidase antibody produced in rabbit</i>	1:30 000	Sigma-Aldrich
<i>Anti-Rabbit IgG-Peroxidase antibody produced in goat</i>	1:30 000	Sigma-Aldrich

2.7 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> -Stamm	Genotyp
TG1	<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB)</i> <i>F'</i> [<i>traD36 proAB⁺ lacI^q lacZΔM15</i>]
Rosetta(DE3)pLysS (Novagen)	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm lacY1 (DE3)</i> <i>pLysSRARE² (Cm^R)</i>
SG13009[pREP4] (Quiagen)	
M15[pREP4] (Quiagen)	
C43(DE3) (Miroux und Walker, 1996)	<i>F⁻ ompT hsdS_B(r_B⁻m_B⁻) gal dcm(DE3)</i>

2.8 Vektoren

Bezeichnung	Resistenz	Herkunft
pGEM-T Easy	Ampicillin	Promega
pET-26b(+)	Kanamycin	Novagen
pET-28a(+)	Kanamycin	Novagen
pQE-60	Ampicillin	Qiagen
pRT-Ω/Not/Asc	Ampicillin	Überlacker et al. (1996)
pJM007	Ampicillin	Schattat et al. (2004)
pGPTV-BAR	Kanamycin (Bakterien) Phosphinothricin (Pflanzen)	Becker et al. (1992)

2.9 Größenstandards

Bezeichnung	Anwendung	Herkunft
1 Kb DNA Ladder	DNA-Größenmarker	GIBCO BRL
HyperLadder I	DNA-Größenmarker	Bioline
DaltonMark [®] VII-L Standard	Protein-Größenmarker	Sigma-Aldrich
SDS-6H	Protein-Größenmarker	Sigma-Aldrich
HMW Native Marker	Protein-Größenmarker	Amersham Biosciences
PageRuler [™] Prestained	Protein-Größenmarker	Fermentas

2.10 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von den Firmen Metabion (Planegg-Martinsried) und MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen.

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _m
Sequenzierungen		
T7-Primer	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG	53,2
SP6-Primer	ATT TAG GTG ACA CTA TAG	46,8
T7-terminator-Primer	GCT AGT TAT TGC TCA GCG G	56,7
pQE for	GTA TCA CGA GGC CCT TTC GTC T	62,1
pQE rev	CAT TAC TGG ATC TAT CAA CAG GAG	59,3
Klonierungen		
Toc1ATG/NcoI (5'-atToc159)	CCA TGG ACT CAA AGT CGG TTA CTC CAG A	66,6
Toc1N3'/BglII	CGA GAT CTA GAG AAA AGC TTC GTG CC	64,8
Toc1N3'/XhoI	CTC GAG AGA GAA AAG CTT CGT GCC AT	64,8
Toc2_ATG_NdeI	TGC ATA TGG GAG ATG GGA CTG AGT TTG TG	66,7
Toc2_N3'_XhoI/2	CTC GAG TAC TAC CTC AGG TTC TGT TTC	65,0
Toc3_ATG_NdeI	TCG ATA TGG GAG ATG GGG CTG AGA TTG TA	66,7
Toc3_N3'-XhoI	CTC GAG TTG GCT TTC CTT AAT CTC TGG	64,9
Toc1GTP5'NcoI	CCA TGG ATC GAC CTG CTG GTT TGA GTT	66,5
Toc1GTP3'XhoI	CTC GAG ACC AAA TAC TTT ACG ATG GTC C	65,1
Toc2Antisens5'NotI	TGC GGC CGC TTC TGT AAT CTC TGG ATC TAC	69,5
Toc2Antisens3'BamHI	TGG ATC CGC CTA CAC AAG TAA TAT CGT T	63,7
Toc2Sens5'FseI	TGG CCG GCC GCC TAC ACA AGT AAT ATC GTT	69,5
Toc2Sens3'XbaI	TTC TAG ATT CTG TAA TCT CTG GAT CTA C	60,7
Gen/T-DNA Nachweis		
Toc1S1-rev (3'-atToc159)	GTT CCA TTG TCA GCT ACT GCA CTA GCT	65,0
Toc2GABIfor (5'-atToc132)	CTG AAT TCT GTT AAG GCT TTC AT	55,3
Toc2GTP3'XhoI (3'-atToc132)	CTC GAG TGC AAA TGG TCT CCC TGG AAT ATT	66,8
Toc3S1 (5'-atToc120)	AAT GGG AGA TGG GGC TGA GAT TGT AAC	64,9
Toc23A2 (3'-atToc120)	CTC CTC TTC CAC ATT TTC ACT ATA CCC	63,4
LB2	GAT GCA CTC GAA ATC AGC CAA TTT TAG AC	63,9
LB(08049)	ATA TTG ACC ATC ATA CTC ATT GC	55,3

Bezeichnung	Sequenz (5' → 3')	T _m
MOG-LB1	AAT CAG CTG TTG CCC GTC TCA CTG GTG AA	68,1
Actin2-RT-F	GCC ATC CAA GCT GTT CTC TC	59,4
Actin2-RT-R	CAG TAA GGT CAC GTC CAG CA	59,4
Toc159-RT-F	ATG CGA TCA CAG GGA GAT TC	57,3
Toc159-RT-R	CAC CAG GTC CTC CAG TGA AT	59,4
Toc132-RT-F	TTC AGA GAA TGA TGA GCA GGA GGA GG	64,8
Toc132-RT-R	CAT GGC TCT CTC CAA CAG CCG TAA AA	64,8
Toc120-RT-f2	ATC AAC TCT TGG ACT CTC TGT G	58,4
Toc120-RT-r2	TGT TTA CGC GGA TGC TTA CTT	58,4
Toc75-RT-F	TCT CAT GGG TTC AGT GAC CA	57,3
Toc75-RT-R	CAC CAG GTC CTC CAG TGA AT	59,4
Toc34-RT-F	CAA ACC CAA ACG AAA GAG GA	55,3
Toc34-RT-R	GCA TTT GCT CAG GGG AAT AA	57,3

2.11 Pflanzenmaterial

Es wurde *Arabidopsis thaliana* vom Ökotyp Columbia (Col-0) und Wassilewskija (Ws-O) eingesetzt.

Samen der T-DNA Mutanten für *atToc120* (N543456) und *atToc34* (N559206) wurden vom *Nottingham Arabidopsis Stock Centre* (NASC) bezogen. Die T-DNA Mutante für *atToc33* wurde aus einem Samenpool von 10 T-DNA-Linien (N19793) isoliert (Gutensohn et al., 2004), welche vom *Arabidopsis Biological Resource Center* (ABRC) der Ohio State Universität erhalten wurden. Im Rahmen des GABI-Kat Programms (Rosso et al., 2003) wurde die T-DNA Mutante für *atToc132* (394E01) generiert und von Bernd Weisshaar (MPI für Pflanzenzüchtung, Köln) zur Verfügung gestellt. Die Mutanten sind alle im Ökotyp Col-0. Die *atToc159* T-DNA-Mutante wurde aus einem 10er Samenpool isoliert, aus dem auch die von Bauer et al. (2000) beschriebene *atToc159*-Mutante stammt. Sie ist im Ws-0 Ökotyp und wurde vom ABRC bezogen.

2.12 Anzucht und Transformation von *Arabidopsis thaliana*

2.12.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* auf Erde

Arabidopsis thaliana Samen wurden auf feuchter Erde (1/3 Vermiculitgemisch) ausgesät und unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) bei 20°C tags und 16°C nachts im Klimaschrank (Modell AR-66L, Percival Scientific) kultiviert. Die Lichtintensität im Klimaschrank betrug 100 $\mu\text{Einstein}/\text{m}^2/\text{s}$. Zur Blüten- und Samenbildung wurden die Pflanzen unter Langtagbedingungen (16 h Licht/8 h Dunkelheit) im Anzuchttraum gehalten.

2.12.2 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* als hydroponische Kultur

Nährsalzlösung		Spuren	
KNO ₃	3 mM	H ₃ BO ₃	23 μM
Ca(NO ₃) ₂	2 mM	MnCl ₂ x 4H ₂ O	4,5 μM
MgSO ₄	1 mM	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	0,38 μM
KH ₂ PO ₄	1 mM	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,16 μM
Fe-EDTA	0,02 mM	Na ₂ MoO ₄	0,06 μM
Spuren			

Für die Untersuchung von Proteinen aus Wurzelmembranen, wurde *Arabidopsis thaliana* als hydroponische Kultur in Nährsalzlösung angezogen. Die Lösung wurde mittels Aquariumpumpen ständig belüftet. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in Lichtregalen bei 100 $\mu\text{Einstein}/\text{m}^2/\text{s}$ unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit).

2.12.3 Sterilisation von Samen

Die gesiebten Samen wurden in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 15 Sekunden mit 70%igem Ethanol inkubiert. Anschließend wurde der Ethanol abgenommen und 1 ml Hypochlorid-Lösung (1,5 % Na-Hypochlorid; 0,15 % Tween 20) zugegeben. Nach 10 – 15 Minuten wurde der Überstand abgenommen und 6 mal mit sterilem Leitungswasser gewaschen.

2.12.4 Anzucht von *Arabidopsis thaliana* in Sterilkultur

1/2 MS-Platten

Saccharose	10 g/l	
MS (Murashige & Skoog)	2,2 g/l	pH 5,6 (mit KOH einstellen)
Micro Agar	0,7 %	(w/v)

Die sterilen Samen (2.12.3) wurden auf 1/2 MS-Platten ausgelegt, mit sterilem Wasser angefeuchtet und mit einem abgeflammt Glasstab gleichmäßig verteilt. Die Kultivierung der Pflanzen erfolgte in Lichtregalen bei 100 μ Einstein/m²/s unter Kurztagbedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit).

2.12.5 Pflanzentransformation durch Vakuuminfiltration

Infiltrationsmedium (200 ml)

Saccharose	10 g	
6-Benzylaminopurine (10 mg/ml in 1 M NaOH)	200 μ l	
1/2 MS (Murashige & Skoog)	459,5 mg	pH 5,8 (mit KOH)
Sapogenat T-110	1 Tropfen	

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* erfolgte nach der von Bechtold und Pelletier (1998) beschriebenen Methode. Es wurden *Agrobakterien*, die einen binären Vektor trugen, bei 28°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1,0 angezogen (2.13.5). Nach 15 minütiger Zentrifugation bei 2500 x g (SLC-250T, Sorvall) wurde das Bakterienpellet vorsichtig mit Infiltrationsmedium, entsprechend 1/3 des ursprünglichen Volumens, aufgenommen. Diese Zellsuspension wurde in ein Gefäß am Boden eines Exsikkators gegeben. Zur Transformation wurden blühende *Arabidopsis* Pflanzen kopfüber in den Exsikkator gestellt, so dass die Infloreszenzen in die *Agrobakterien*lösung tauchten. Mit Hilfe einer Vakuumpumpe wurde für 20 bis 30 min ein Vakuum angelegt. Anschließend wurden die transformierten *Arabidopsis* Pflanzen bis zur Samenreife weiter kultiviert (2.12.1). In den ersten Tagen nach der Infiltration wurden die Pflanzen mit einer Pikierhaube zum Schutz vor Austrocknung abgedeckt.

2.12.6 Selektion transgener Pflanzen

Die Samen der infiltrierten *Arabidopsis thaliana* Pflanzen (2.12.5) wurden sterilisiert (2.12.3) und auf 1/2 MS-Platten (2.12.4) mit 500 μ g/ml Cefotaxim, welches das Wachstum von *Agrobakterien* inhibiert, und 12 μ g/ml Phosphinotricin, als Selektionsmarker

für die durch den pGPTV-BAR-Vektor eingebrachte T-DNA, ausgelegt. Nach 2 Wochen ließen sich die Transformanten von den Nicht-Transformanten (gelblich, ohne Wurzeln im Agar) unterscheiden. Die Transformanten wurden nun auf 1/2 MS-Platten pikiert und für weitere 2 Wochen in Sterilkultur gehalten bevor sie groß genug waren, um auf Erde umgesetzt zu werden.

2.13 Anzucht und Transformation von *Escherichia coli* und *Agrobacterium tumefaciens*

2.13.1 Anzucht von *E.coli*

LB-Medium/Platten

Pepton aus Casein	10 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	10 g	ad 1 l (autoklavieren)
Agar	15 g	ad 1 l (autoklavieren): für LB-Platten

Indikator-Platten

Pepton aus Casein	10 g	
Hefeextrakt	5 g	
NaCl	5 g	
Agar	15 g	ad 1 l pH 7,0 (autoklavieren)
Ampicillin (50 mg/ml)	2 ml	(100 µg/ml)
IPTG (0,1 M)	5 ml	(0,5 mM)
X-Gal (50 mg/ml in DMF)	1,6 ml	(80 µg/ml)

E. coli wurde für die Plasmidisolation im LB-Flüssigmedium nach Bertani (1951) mit entsprechendem Antibiotikum unter Schütteln bei 37° C über Nacht angezogen. Transformierte *E.coli* Zellen wurden zur Vereinzelnung auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Plasmide, die das *lac z*-Gen enthielten, wurden zur Blau-/Weißselektion auf Indikatorplatten ausplattiert.

2.13.2 Anlegen von Stammkulturen

Lagermedium		
Glycerin	65 %	(v/v)
MgSO ₄	0,1 M	
Tris/HCl	25 mM	pH 8,0

0,5 ml einer Übernachtskultur (2.13.1) wurden mit der gleichen Menge an Lagermedium in einem sterilen 1,5 ml Reaktionsgefäß vermischt. Die Lagerung erfolgte bei -20°C .

2.13.3 Herstellung kompetenter Zellen

Die Herstellung der kompetenten Zellen erfolgte nach Sambrook et al. (1989) mit leichten Modifikationen.

50 ml LB-Medium wurden mit 0,5 ml einer Übernachtskultur (2.13.1) von *E. coli* angeimpft und bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert, bis die Bakterien eine OD_{600} von 0,4 erreicht hatten. Die Kultur wurde auf zwei 50 ml Zentrifugationsröhrchen aufgeteilt und 10 Minuten auf Eis gestellt. Nach einer 10 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 4000 U/min (ST-H750, Sorvall) wurde das Pellet jeweils in 5 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden beide Pellets vorsichtig mit 1 ml eiskaltem 50 mM CaCl_2 resuspendiert. Es folgte eine einstündige Inkubationszeit auf Eis. Schließlich wurde die Suspension noch jeweils mit 1 ml 40% Glycerin in 50 mM CaCl_2 vermischt. 100 μl Aliquots wurden mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -80°C .

2.13.4 Transformation von *E.coli* mittels Hitzeschock

100 μl kompetente Zellen (2.13.3) wurden mit 1 μl Plasmid-DNA oder der Hälfte eines Ligationsansatzes versetzt und 30 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde durch einen 1,5 minütigen Hitzeschock (42°C), und sofortige Inkubation auf Eis, die Aufnahme der DNA in die Zellen vermittelt. Durch die Zugabe von 900 μl LB-Medium (2.13.1) und Inkubation für 60 Minuten bei 37°C kam es zur Regeneration der Zellen vor der Plattierung auf den LB-Platten (2.13.1).

2.13.5 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*

YEB-Medium

Rinderextrakt	5 g	
Baktopepton	5 g	
Saccharose	5 g	
Hefeextrakt	1 g	ad 1 l (autoklavieren)

Bacto-Agar 1,5 % (w/v) für YEB-Platten

Die *Agrobacterium tumefaciens* Stamm GV3101(pMP90) (Koncz und Schell, 1986) wurden in YEB-Medium mit 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rifampicin (Chromosomale Selektion) und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin (pMP90) unter Schütteln bei 28°C angezogen. Die Kulturen wurden entweder mit 5 - 10 μl einer Stammkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer YEB-Platte angeimpft. Bei der Anzucht von Zellen mit dem pGPTV-BAR Vektor wurde dem Medium 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin zugesetzt. Stammkulturen wurden wie unter 2.13.2 beschrieben angelegt und bei -80°C gelagert.

2.13.6 Herstellung kompetenter Agrobakterien-Zellen

Mit 4 ml einer Übernachtskultur (2.13.5) von *Agrobacterium tumefaciens* wurden 50 ml YEB-Medium (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Rifampicin, 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin) angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bis zu einer OD_{600} von 0,4 - 0,5 gezogen und bei 4000 U/min (ST-H50, Sorvall) abzentrifugiert. Das Pellet wurde vorsichtig in 1 ml YEB resuspendiert und 200 μl Aliquots mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei -80°C .

2.13.7 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Zu 200 μl kompetenten Agrobakterien-Zellen (2.13.6) wurden 3 μl rekombinante DNA gegeben. Nach einer Schockgefrierung mit flüssigem Stickstoff wurden die Zellen 5 Minuten bei 37°C aufgetaut. Nach Zugabe von 1 ml YEB-Medium erfolgte eine Inkubation bei 28°C für 1 1/2 Stunden. Anschließend wurden 100 μl der transformierten Zellen auf einer YEB-Platte (25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Gentamycin und 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kanamycin) ausgestrichen.

2.14 Proteinbiochemische Methoden

2.14.1 Heterologe Expression von Proteinen in Bakterien

Alle Proteine wurden mit einem N-terminalen Hexahistidin-*tag* heterolog in *E. coli* exprimiert. Die pET-Vektoren wurden im Bakterienstamm Rosetta und der pQE-60 Vektor in C43 Zellen exprimiert (Vektoren: 2.8; Bakterienstämme: 2.7). Dazu wurden 10 ml LBG-Medium (LB-Medium + 0,4 % (w/v) Glucose), mit entsprechendem Antibiotikum, mit einer Kolonie von einer LB-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert (2.13.1). Mit dieser Übernachtskultur wurde eine Hauptkultur von 500 ml (LBG + Antibiotikum) angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 - 1,0 angezogen. Anschließend wurde die Expression mit 2 mM IPTG induziert und für weitere 3 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen sedimentiert und bis zur Reinigung (2.14.2) bei -20°C gelagert.

2.14.2 Reinigung heterologer His₆-Proteine durch Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie

Phosphatpuffer	
NaH ₂ PO ₄	50 mM
NaCl	300 mM
Imidazol	10 - 250 mM pH 8,0

Bevor die Proteine mittels Affinitätschromatographie gereinigt werden konnten, mussten die *E. coli* Zellen aufgeschlossen werden. Dazu wurde das Bakterienpellet (2.14.1) mit 200 - 400 µl Phosphatpuffer versetzt. Der Aufschluß erfolgte durch einen 5-maligen Zyklus aus schockgefrieren mit N₂ und Auftauen bei 37°C. Zwischendurch wurde dieses Gemisch mit einem „Eppie-Potter“ (*Dstroy*[®]-*Sticks*, Biozym) zerkleinert. Es folgte eine einstündige Inkubation mit 5 µl DNase bei 25°C. Nach einem Zentrifugationsschritt (13 000 U/min; 15 Minuten; Biofuge fresco, Heraeus) wurde der Überstand mit 100 µl äquibrierter Ni-NTA Agarose (Quiagen) eine Stunde bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA Matrix auf eine Säule, die aus einer Pasteurpipette mit etwas Watte als „Verschluss“ besteht, überführt. Die Matrix wurde 4 - 6 mal mit 1 ml Puffer, der eine steigende Imidazolkonzentration von 10 - 30 mM Imidazol enthielt, gewaschen. Mit jeweils 100 µl Phosphatpuffer + 250 mM Imidazol wurde 5x eluiert.

2.14.3 Isolierung von Gesamtprotein aus *Arabidopsis thaliana*

Extraktionspuffer		
Triton X-100	5 %	(w/v)
NaCl	100 mM	
Tris/HCL pH 7,4	50 mM	
PMSF	2 mM	(frisch zugeben)
Protease Inhibitor Cocktail (P9599 von Sigma)	5 μ l/ml	(frisch zugeben)

Rosettenblätter von *Arabidopsis thaliana* wurden mit einem „Eppie-Potter“ (*Dstroy*[®]-*Sticks*, Biozym) im 1,5 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff zerkleinert. Nach Zugabe von 200 μ l Extraktionspuffer wurden die nicht löslichen Zellbestandteile bei 4°C und 13 000 U/min in der Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus) 10 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand enthielt die Gesamtproteine.

2.14.4 Isolierung von löslichen Proteinen und Gesamtmembranen aus *Arabidopsis thaliana*

Isolationsmedium		
HEPES	50 mM	pH 7,6 (KOH)
MgCl ₂	5 mM	
EDTA	5 mM	
PMSF	2 mM	(frisch zugeben)
Protease Inhibitor Cocktail (P9599 von Sigma)	5 μ l/ml	(frisch zugeben)

3 - 4 Wochen alte *Arabidopsis thaliana* Pflanzen wurden auf Eis mit Isolationsmedium gemörsert (1 ml Isolationsmedium auf 160 mg FG). Nach Filtration durch zwei Lagen Miracloth (Calbiochem) wurden die Gesamtmembranen durch eine einstündige Ultrazentrifugation bei 4°C (100 000 xg in MLA-80-Rotor, Beckmann) sedimentiert (1 ml Lösung pro Reaktionsgefäß). Die im Überstand befindlichen löslichen Proteine wurden abgenommen. Das Membranpellet wurde mit 0,8 ml Isolationspuffer gewaschen, d. h. es wurde mit einem Pinsel resuspendiert und erneut eine Stunde bei 100 000 xg zentrifugiert. Das Membranpellet und die löslichen Proteine wurden anschließend mit flüssigem N₂ schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.14.5 Proteinbestimmung

Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

200 μl 5x konzentrierte Färbelösung (*dye reagent*, BioRad) wurde mit der Proteinprobe vermischt und auf ein Endvolumen von 1 ml eingestellt. Nach 5 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Absorption bei 595 nm im Spektrophotometer (UV-1602, Shimadzu) gemessen. Die Proteinkonzentration konnte mit Hilfe eines BSA-Standards ermittelt werden.

BCA-Assay

Der BCA-Assay (*BCA Protein Assay Kit*, Pierce Biotechnology) wurde eingesetzt, wenn die Proteinproben Detergenzien enthielten und somit eine Proteinbestimmung nach Bradford nicht möglich war. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.14.6 Proteinfällung

TCA-Fällung

Die TCA (Trichloressigsäure)-Fällung diente als Probenvorbereitung für die isoelektrische Fokussierung (siehe 2.14.8). Dazu wurden die Proteinproben mit 80%iger TCA versetzt, so dass eine Endkonzentration von 15% TCA erreicht wurde. Anschließend wurden die Proteine 30 min auf Eis präzipitiert, bevor sie abzentrifugiert wurden. Das Pellet wurde mit Aceton gewaschen und an der Luft getrocknet.

Chloroform/Methanol-Fällung

Die Chloroform/Methanol-Fällung nach Wessel und Flügge (1984) wurde bei Proben mit geringer Proteinkonzentration durchgeführt. 100 μl einer Proteinprobe wurden mit 400 μl Methanol und 100 μl Chloroform versetzt und kurz geschüttelt. Nach Zugabe von 300 μl H_2O wurde erneut geschüttelt und drei Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde bis zur Interphase (enthält Protein) abgenommen und verworfen. Danach wurden 300 μl Methanol zugegeben, kurz geschüttelt und dann bei 13 000 U/min die ausgefällten Proteine sedimentiert. Anschließend wurde das Pellet getrocknet.

2.14.7 SDS-PAGE nach Laemmli

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

4x Probenpuffer

Tris/HCL pH 6,8	0,25 M
Glycerin	40 % (w/v)
SDS	8 % (w/v)
β -Mercaptoethanol	20 % (v/v)
Bromphenolblau	0,02 % (w/v)

10x Laemmli-Laufpuffer

Tris	0,25 M
Glycin	1,92 M
SDS	1 % (w/v)

30%ige Acrylamidlösung

Acrylamid	29,2 % (w/v)
Methylenbisacrylamid	0,8 % (w/v)
SERDOLIT	1 Eßlöffel/l

(über Nacht rühren, dann abfiltrieren)

Pipettierschema für 4 Mini-Gele (10 x 8 x 0,75 mm, Hoefer) unterschiedlicher Acrylamidkonzentration:

	7,5 %	12,5 %	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	13,7 ml	9,5 ml	7 ml
30 % Acrylamid	6,25 ml	10,4 ml	1,7 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	4,7 ml	4,7 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	1,25 ml
10 % SDS	0,25 ml	0,25 ml	100 μ l
10 % APS	160 μ l	160 μ l	60 μ l
TEMED	16 μ l	16 μ l	6 μ l
Endvolumen (ca.)	25 ml	25 ml	10 ml

Pipettierschema für 4 Mini-Gradienten-Gele (10 x 10,5 x 0,75 mm, Hoefer) mit einer Acrylamidkonzentration von 6-13 %:

	6 %	13 %	Sammelgel (5 %)
H ₂ O	8,6 ml	2,34 ml	7 ml
30 % Acrylamid	3,2 ml	6,93 ml	1,7 ml
2 M Tris/HCl pH 8,8	3 ml	3 ml	-
1 M Tris/HCl pH 6,8	-	-	1,25 ml
80 % Saccharose	0,93 ml	3,47 ml	-
10 % SDS	160 µl	160 µl	100 µl
10 % APS	96 µl	96 µl	60 µl
TEMED	9,6 µl	9,6 µl	6 µl
Endvolumen (ca.)	16 ml	16 ml	10 ml

2.14.8 Isoelektrische Fokussierung (IEF) löslicher Proteine

IEF-Puffer

Harnstoff	7 M	
Thioharnstoff	2 M	
CHAPS	4 % (w/v)	
Bromphenolblau	0,002 %	
DTT	60 mM	frisch zugeben
<i>IPG buffer ph 4-7</i> (Amersham)	0,5 %	frisch zugeben

Zur Trennung löslicher Proteine (2.14.4) nach ihrem isoelektrischen Punkt, auf immobilisierten pH-Gradienten, wurde das Ettan™IPGphor™IEF System von Amersham Biosciences eingesetzt. Es wurden 90 µg (für analytische Gele) bzw. 300 µg (für präparative Gele) lösliche Proteine TCA gefällt (2.14.6). Das getrocknete Pellet wurde anschließend mit 345 µl IEF-Puffer versetzt und zum Lösen 1 - 2 Stunden geschüttelt. Nicht gelöste Anteile wurden bei 13 000 U/min in der Tischzentrifuge (Biofuge, Heraeus) für 10 Minuten abzentrifugiert. Anschließend wurden 340 µl vom Überstand auf einem Gelstreifenhalter (Ettan™IPGphor™Strip Holder) aufgetragen. Ein 18 cm langer Gelstreifen (*Immobiline DryStrip pH 4-7*) wurde mit der Gelseite nach unten aufgelegt. Danach wurde dieser mit Mineralöl (*DryStrip Cover Fluid*) überschichtet, damit der Gelstreifen nicht austrocknet.

Nach Rehydrierung des Gelstreifens für 12 Stunden erfolgte die IEF in drei Schritten bei 20°C mit drei verschiedenen Spannungen: 1 Stunde bei 500 V, 1 Stunde bei 1000 V und

4,5 Stunden bei 8000 V. Desweiteren war für jeden Gelstreifen ein Stromfluß von 50 μ A eingestellt.

Nach der IEF erfolgte eine Auftrennung der Proteine in der 2. Dimension (2.14.10).

2.14.9 Native Auftrennung von Proteinkomplexen: *Blue native-PAGE*

Die Solubilisierung von Membranproteinen und Auftrennung von Proteinkomplexen in der *Blue native-PAGE* erfolgte in Anlehnung an Schägger und von Jagow (1991) und Schägger et al. (1994).

Solubilisierungslösung

6-Aminocaprinsäure	750 mM	
EDTA	0,5 mM	
Bistris	50 mM	pH 7,0
PMSF	2 mM	(frisch zugeben)
Protease Inhibitor Cocktail (P9599 von Sigma)	5 μ l/ml	(frisch zugeben)

Gesamtmembranen aus *Arabidopsis*-Blättern (2.14.4) entsprechend 160 mg FG wurden unter Zugabe von 40 μ l Solubilisierungslösung, die die doppelte PMSF- und Inhibitor-Konzentration enthielt, mit einem Pinsel resuspendiert. Dann wurden 40 μ l Solubilisierungslösung mit der doppelten Detergenzkonzentration zugegeben. Als Detergenzien wurden Digitonin, n-Dodecyl β -D-maltoside oder Triton X-100 (jeweils 10 %ig in H₂O) in einer Endkonzentration von 0,5 % bis 3 % eingesetzt. Die Solubilisierung erfolgte für 1 Stunde bei 4°C auf dem Rotator. Anschließend wurden nicht solubilierte Bestandteile bei 100 000 xg in der Ultrazentrifuge (MLA-80-Rotor, Beckmann) für 30 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde mit 5 % (w/v) Coomassie G-250 in 750 mM 6-Aminocaprinsäure versetzt (Detergenz:Coomassie; 8:1) und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer 3 minütigen Zentrifugation bei 20 000 U/min (ST-Micro, Sorvall) wurden die Proben in einer *Blue native-PAGE* aufgetrennt.

Pipettierschema für 4 Mini-*Blue-native*-Gradientengele (10 x 10,5 x 0,75 mm) mit einer Acrylamidkonzentration von 3-13,5%:

Stammlösung	3 %	13,5 %	Sammelgel
H ₂ O	7,77 ml	1,3 ml	5,23 ml
0,5 M Bistris pH 7,0	1,6 ml	1,6 ml	1,0 ml
30% Acrylamidlösung	1,6 ml	7,2 ml	1,17 ml
2 M ϵ -Aminocapronsäure	4,0 ml	4,0 ml	2,5 ml
87% (v/v) Glycerin	0,95 ml	1,7 ml	-
10% (w/v) APS	70 μ l	70 μ l	90 μ l
TEMED	7 μ l	7 μ l	9 μ l
Endvolumen:	16 ml	16 ml	10 ml

10x Anodenpuffer

Bistris	0,5 M	pH 7,0
---------	-------	--------

10x Kathodenpuffer

Bistris	150 mM
Tricin	0,5 M

Der Kathodenpuffer (1x) enthielt noch zusätzlich 0,01 % Coomassie G-250 (50 mg/500 ml). Die Elektrophorese erfolgte über Nacht bei 4°C und 45 V für einen normalen Lauf bzw. 80 V für einen langen Lauf.

2.14.10 2D-Gelelektrophorese

nach IEF:

Äquibrierungslösung

Harnstoff	6 M
Tris/HCl pH 8,8	50 mM
SDS	2 %
Glycerin	30 % (v/v)
Bromphenolblau	0,002 %

Nach der isoelektrischen Fokussierung (2.14.8) wurde der Gelstreifen (*Immobiline Dry-Strip pH 4-7*) zunächst zwei Äquibrierungsschritten unterzogen. Beim ersten Schritt wurde der Streifen für 15 Minuten in einer Lösung bestehend aus 10 ml Äquibrierungslösung und 100 mg DTT inkubiert. Dieser Schritt dient der Reduzierung der Disulfidbrücken.

Beim zweiten Schritt erfolgte eine Inkubation des Gelstreifens für 15 Minuten in einer Lösung aus 10 ml Äquibrierungslösung und 250 mg Jodacetamid. Bei diesem Schritt werden reduzierte SH-Gruppen kovalent modifiziert.

Die Proteine auf dem IEF-Streifen wurde dann wie im nächsten Abschnitt beschrieben in einer SDS-PAGE aufgetrennt.

nach BN-PAGE:

Die Auftrennung der Proteinkomplexe in der zweiten Dimension nach der Blue-native-PAGE (2.14.9) erfolgte mittels SDS-PAGE nach Laemmli (1970) (2.14.7).

Denaturierungspuffer	
10x Laemmli-Laufpuffer	1 x
SDS	1 %
β -Mercaptoethanol	0,1 %

Von der BN-PAGE wurde der entsprechende Gelstreifen ausgeschnitten und vor der SDS-PAGE zehn Minuten bei 40°C im Denaturierungspuffer inkubiert.

Anschließend wurde der Gel- bzw. IEF-Streifen horizontal auf ein Midi- (200 x 200 x 1,5 mm) bzw. Minigel (10 x 10,5 x 1 mm), welches über dem Trenngel eine dünne Schicht Sammelgel enthielt, gelegt und mit 0,5 %iger Agarose fixiert. Ein Proteinmarker wurde auf ein 5 x 5 mm großes *Whatman*-papier getropft und dann links neben dem Gel- bzw. IEF-Streifen in die Agarose geschoben. Im Anschluß an die Elektrophorese (2.14.7) wurde das Gel Silber gefärbt (2.14.11) oder auf eine PVDF-Membran transferiert (2.14.15).

2.14.11 Färbung von Acrylamidgelen

Coomassie-Färbung

Lösung I

Coomassie Brilliant Blue	5 g	
Methanol	800 ml	lösen
H ₂ O	200 ml	nach 30 min filtrieren

Lösung II

H ₂ O	400 ml
Essigsäure	100 ml

Entfärber

Methanol	1000 ml
H ₂ O	800 ml
Essigsäure	200 ml

Die Proteine wurden nach der SDS-PAGE (2.14.7) Coomassie gefärbt. Dazu wurden die Lösungen I + II zu gleichen Teilen vermischt, bevor das SDS-Gel für 2 Stunden auf einem Schüttler darin inkubiert wurde. Danach wurde das Gel mit Entfärber so lange entfärbt, bis die Proteinbanden klar sichtbar waren.

Silberfärbung

Fixierlösung

Methanol	50 %	(v/v)
Essigsäure	12 %	(v/v)
Formaldehyd (37%)	0,0185 %	(v/v)

Ethanol-Waschlösung

Ethanol	50 %	(v/v)
---------	------	-------

Thiosulfat-Lösung

Na ₂ S ₂ O ₃	0,02 %	(w/v)
---	--------	-------

Silbernitrat-Lösung

AgNO ₃	0,2 %	(w/v)
Formaldehyd (37 %)	0,02775 %	(v/v)

Entwickler-Lösung

Na ₂ CO ₃	6 %	(w/v)
Formaldehyd (37 %)	0,0185 %	(v/v)
Thiosulfat-Lösung	2,5 %	(v/v)

Stopper-Lösung

Methanol	50 %	(v/v)
Essigsäure	12 %	(v/v)

Trocknerlösung

Methanol	40 %	(v/v)
Essigsäure	10 %	(v/v)
Glycerin	3 %	(v/v)

Analytische SDS-Gele (2.14.7) wurden einer Silberfärbung unterzogen. Dazu wurden die Gele zuerst für mindestens eine Stunde in der Fixierlösung geschüttelt und dann drei mal mit der Ethanol-Waschlösung jeweils für 20 Minuten gewaschen. Es folgte eine 1-minütige Inkubation in der Thiosulfat-Lösung, der sich drei 20 sekundige Waschungen mit H₂O anschlossen. Gefolgt von einer 20 minütigen Inkubation in der Silbernitrat-Lösung. Anschließend wurde drei mal mit H₂O gewaschen. Die Inkubation mit der Entwicklerlösung erfolgte bis zum sichtbar werden der Proteine. Dann wurde für 30 Sekunden gewaschen, bevor mit der Stopper-Lösung die fortschreitende Färbung des Gels unterbunden wurde. Mit dieser wurde das Gel 10 Minuten inkubiert. Bis zur Trocknung (2.14.13) wurden die Gele für mindestens 20 Minuten in Trocknerlösung aufbewahrt.

Coomassie-Colloidal-Färbung

Lösung A

<i>ortho</i> -Phosphorsäure (85 %)	2 %
Ammoniumsulfat	10 %

Lösung B

Coomassie Brilliant Blue G-250	5 %
--------------------------------	-----

Fixierer

Methanol	40 %
Essigsäure	10 %

Färbelösung

Lösung A	98 %
Lösung B	2 %

(in großer Flasche über Nacht schütteln)

Die Coomassie-Colloidal-Färbung ist sensitiver als die Comassie-Färbung (2.14.11). Sie wurde für die Färbung von 2D-Gelen eingesetzt, wenn Spots für die Massenspektrometrie gestochen wurden, da Proteine aus silbergefärbten Gelen nicht analysiert werden konnten.

Das Gel wurde eine Stunde im Fixierer geschüttelt. Danach folgte eine Inkubation mit 80 % Färbelösung + 20 % Methanol für mindestens vier Stunden (besser über Nacht). Entfärbt wurde mit Wasser, welches mehrmals gewechselt wurde. Falls dann immer noch Hintergrund zu sehen war, wurde mit 20 % Methanol entfärbt.

2.14.12 Massenspektrometrie

Aus Coomassie-Colloidal gefärbten SDS-Gelen wurde mit Hilfe einer abgeschnittenen Pipettenspitze der zu analysierende Proteinspot ausgestochen und von Frau Dr. Schierhorn (Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, MLU Halle) massenspektrometrisch untersucht. Zur Identifizierung der Proteine wurden die erhaltenen Massen der Peptidfragmente mit denen in der Datenbank der Suchmaschine *Mascot* (www.matrixscience.com) verglichen.

2.14.13 Trocknen von Acrylamidgelen

Zur Aufbewahrung von Gelen wurden diese für mindestens 30 Minuten in 2% Glycerin geschüttelt. Anschließend in Cellophanfolie (Cellophan, Büropa GmbH), die zuvor mit H₂O angefeuchtet wurde, eingeschlagen und auf eine Glasscheibe bis zur völligen Trocknung aufgespannt. In Trockner-Lösung eingelegte Silber gefärbte Gele (2.14.11) wurden gleich aufgespannt.

2.14.14 Elektroelution von Proteinen aus Polyacrylamidgelen

Die Elektroelution wurde durchgeführt, um Proteine von weiteren Proteinen zu trennen. Nur ausgewählte Banden wurden ausgeschnitten und mit einer Rasierklinge in kleine Stücke geschnitten. Für die Elektroelution kam eine selbstgebaute Apperatur zum Einsatz. Das Prinzip beruht darauf, dass die Proteine in einem Gefäß („Brücke“), welches auf zwei Seiten über eine Dialysemembran (*SERVAPOR[®] Dialysis Tubing*: MWCO 12 000-14 000, Serva) mit dem Anoden- bzw. Kathodenpuffer in Verbindung steht, aufgrund einer angelegten Spannung aus dem Polyacrylamidgel (Kathodenseite) zur Dialysemembran (Anodenseite) wandern, wo sie dann entnommen werden können. Als Anoden- und Kathodenpuffer diente 1x Laemmli-Laufpuffer (2.14.7). Für die „Brücke“ wurde 1x Laemmli-Laufpuffer mit zusätzlich 2% SDS eingesetzt. Die Elektroelution erfolgte über Nacht bei 80 Volt.

2.14.15 Western Blot

Lösung I

SDS	0,1 %
Methanol	5 %
Na-Borat	50 mM pH 9,0

Lösung II

Methanol	20 %
Na-Borat	50 mM pH 9,0

Mit Hilfe einer *semidry*-Blotapparatur (*Panther[™] Semidry electroblotter*, Owl Separation Systems) erfolgte der Elektrotransfer der Proteine aus dem SDS-Gel (2.14.7) auf eine PVDF-Membran (2.4).

Dazu wurden drei Lagen *Whatman 3 MM*-Papier in Lösung I getränkt und auf die

Kathodenfläche der Apparatur gelegt. Ihnen folgten luftblasenfrei zuerst das Gel, welches zuvor kurz in Lösung I inkubiert wurde, und dann die mit Methanol angefeuchtete Membran. Abschließend wurde ein weiterer Stapel mit drei Lagen in Lösung II getränktes *Whatman 3 MM*-Papier darüber gelegt. Zum Schluss wurde die Anode aufgesetzt und der Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran erfolgte für 3 Stunden mit 1,5 mA pro cm² Gelfläche.

Der Proteintransfer von BN-Gelen erfolgte nach den Herstellerangaben der PVDF-Membran (2.4) mit kleinen Modifikationen. Dem Kathodenpuffer wurde 0,1% SDS zugesetzt und das Gel darin eine halbe Stunde inkubiert, bevor der Blot aufgebaut wurde.

2.14.16 Immundetektion mittels Enhanced Chemilumineszenz (ECL)

10x PBS	
NaCl	750 mM
KCl	30 mM
Na ₂ HPO ₄ x 12 H ₂ O	45 mM
KH ₂ PO ₄	15 mM
Waschlösung I	
PBS	1 x
Tween 20	1 % (v/v)
Magermilchpulver	5 %
Waschlösung II	
PBS	1 x
Tween 20	1 %
Entwicklerlösung (10 ml)	
H ₂ O	9,5 ml
Tris/HCL 1 M pH 8,5	500 µl
Luminol 250 mM in DMSO	50 µl
Coumarinsäure 90 mM in DMSO	22 µl
H ₂ O ₂	3 µl

Um freie Membranbindungen abzusättigen wurde die PVDF-Membran nach dem Proteintransfer eine Stunde in Waschlösung I inkubiert. Danach erfolgte eine 2-stündige Inkubation mit dem gegen das Zielprotein gerichteten primären Antikörper (in Waschlösung I). Nach 4x fünfminütigen Waschschritten mit Waschlösung I erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper an dem eine Meerrettichperoxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) gekoppelt war. Nach einem weiteren Waschschriff (4x 5 Minuten in Waschlösung II) und 1-minütiger Inkubation in der Entwicklerlösung konnte die durch die Meerrettichperoxidase vermittelte Chemilumineszenz auf einem Film (Hyperfilm ECL, Amersham Biosciences) nachgewiesen werden. Wenn mit diesem Detektionssystem nur schwache Banden detektiert wurden, wurden die sensitiveren Detektionslösungen des *ECL Advance* von Amersham anstatt der eigenen Entwicklerlösung eingesetzt.

2.14.17 Immunisierung von Kaninchen zur Antikörpergewinnung

Die Immunisierungen wurden von Dr. Harald Schubert vom Institut für Versuchstierkunde der Friedrich-Schiller-Universität Jena oder Eurogentec (Seraing, Belgien) durchgeführt. Die erhaltenen Seren wurden entweder direkt für die Immundetektion (2.14.16) eingesetzt, oder zuvor über eine Antigensäule (2.14.18) gereinigt.

2.14.18 Reinigung von Antikörpern aus Seren mittels Affinitätschromatographie

Kopplung des Antigens

Zur Antikörperreinigung, wurde zunächst das Antigen an eine Säule (HiTrap™NHS-activated HP, Amersham Biociences) gekoppelt. Die Kopplung basierte auf der Reaktion der aktivierten NHS-Sepharose mit den Aminogruppen des Antigens.

Die HiTrap-Säule wurde 2x mit 5 ml 2 mM HCL gewaschen um das Isopropanol zu entfernen. Die Beladung der Säule erfolgte, indem 1 ml (= 1 mg) Antigenlösung langsam mit einer aufgesetzten Spritze durchgetropft wurde. Danach wurde die Säule beidseitig mit Kappen verschlossen. Zum Koppeln des Antigens an die Säule, wurde diese über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Antikörperreinigung

Zur Antikörperreinigung wurde die mit Antigen beladene HiTrap-Säule an eine FPLC-Anlage (PHARMACIA-LKB GP-10, Pharmacia) angeschlossen. Zuerst wurde die Säule bei einer Flussgeschwindigkeit von 1 ml/min für jeweils 5 Minuten wie folgt gewaschen:

1. Glycin 100 mM, pH 2,8
2. Harnstoff 7 M mit 10 mM Glycin, pH 3,5
3. Guanidinhydrochlorid 6 M mit 10 mM Glycin, pH 3,5
4. Harnstoff 7 M mit 10 mM Glycin, pH 3,5
5. Glycin 100 mM, pH 2,8
6. 1x PBS (2.14.16)

15 ml Serum wurden mit 1x PBS auf 40 ml aufgefüllt und dann bei einer Flussgeschwindigkeit von 0,5 ml/min über die Säule gepumpt (der Durchfluss wurde aufgefangen). Anschließend wurde 20 Minuten mit 1x PBS gewaschen. Die gebundenen Antikörper wurden nun nacheinander bei einer Flussrate von 1 ml/min mit je 8 ml Glycin (100 mM, pH 2,8), Harnstoff (7 M mit 10 mM Glycin, pH 3,5) und Guanidinhydrochlorid (Guanidinhydrochlorid 6 M mit 10 mM Glycin, pH 3,5) eluiert. Die einzelnen Eluate wurden aufgefangen und anschließend gegen 1x PBS dialysiert. Dabei entspricht die Glycinfraction Antikörpern niedriger Affinität, die Harnstofffraktion Antikörpern mittlerer und die Guanidinhydrochlorid-Fraktion Antikörpern hoher Affinität.

2.14.19 Coimmunpräzipitation

IP-Puffer

HEPES/KOH	20 mM	pH 7,5
EDTA	2,5 mM	
NaCl	100 mM	
MgCl ₂	0,5 mM	
Triton X-100	2 %	
DTT	0,5 mM	(frisch zugeben)
PMSF	1 mM	(frisch zugeben)
Protease Inhibitor Cocktail (P9599 von Sigma)	5 µl/ml	(frisch zugeben)

Es wurden Gesamtmembranen (2.14.4) aus 320 mg FG mit 200 µl IP-Puffer versetzt und mit einem Pinsel resuspendiert. Die Solubilisierung erfolgte für eine Stunde bei 4°C auf dem Rotator. Anschließend wurden nicht solubilisierbare Bestandteile bei 100 000 xg in

der Ultrazentrifuge (MLA-80, Beckmann) für 30 Minuten abzentrifugiert. 150 μl der solubilisierten Membranproteine wurden für eine Coimmunpräzipitation eingesetzt. Nach Zugabe der Antikörper, die in einer ca 50-fach höheren Konzentration als für die Westernanalyse benutzt, eingesetzt wurden, wurde dieser Ansatz zum Binden der Antikörper an sein Antigen eine Stunde bei 4°C auf dem Rotator inkubiert. Danach wurden 100 μl (mit IP-Puffer äquilibrierte) 10 %ige Protein A Sepharose (*CL-4B*, Amersham) eine Stunde mit dem Ansatz inkubiert.

Nach dreimaligen Waschen mit IP-Puffer, wurde ein letztes Mal mit IP-Puffer ohne Detergenz gewaschen und der Ansatz in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

Das Pellet, mit den coimmunpräzipitierten Proteinen, wurde mit 65 μl 2x Probenpuffer versetzt, 5 Minuten auf 95°C erhitzt und dann 20 μl davon (entsprechend 73,8 mg FG), sowie Aliquots der solubilisierten Membranproteine, der ungebundenen Proteine und der letzten Waschfraktion auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

Die präzipitierten Proteine wurden mittels Immundetektion (2.14.16) nachgewiesen.

2.15 Molekularbiologische Methoden

2.15.1 Molekularbiologische Standardmethoden

Alle molekularbiologischen Arbeiten, wie DNA-Spaltung mit Restriktionsendonukleasen, Auffüllreaktionen von DNA, Dephosphorylierung und Ligation sowie die Herstellung von neutralisiertem Phenol wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Die Isolation von Plasmid-DNA erfolgte für die Identifizierung von positiven Klonen nach Birnboim und Doly (1979) und für größere Präparationen wurde der *NucleoBond[®]PC 100*-Kit (2.3) nach Herstellerangaben eingesetzt.

Die DNA-Sequenzierungsreaktion wurde mit dem *ABI PRISM[®] dRhodamine Terminator Cycle Sequencing*-Kit (2.3) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die elektrophoretische Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte über ein denaturierendes Polyacrylamidgel in einem DNA-Sequenzierer vom Typ *ABI Prism[®] 377* (Applied Biosystems, USA).

2.15.2 PCR

10x PCR-Puffer

Tween 20	0,5 %	
Gelatine	1 mg/ml	
MgCl ₂	15 mM	
KCl	250 mM	
Tris/HCl	200 mM	pH 8,3

Die PCR (Mullis und Faloona, 1987) wurde zur Amplifikation von DNA-Sequenzen eingesetzt. Eine Standard-PCR-Reaktion enthielt in einem Gesamtvolumen von 50 μ l 1x PCR-Puffer, 1-10 ng der zu amplifizierenden DNA, je 12 pmol der beiden spezifischen Primer, ein dNTP-Gemisch 100 μ M und 1-2 Units einer *Taq*-Polymerase. Die Amplifizierung erfolgte durch einminütiges Denaturieren der Matrizen-DNA bei 95°C, einminütiges Binden der Primer (*Annealing*) bei 58°C (je nach der T_m der Primer) und 2 1/2 minütige Synthese des komplementären Stranges durch die *Taq*-Polymerase bei 72°C. Diese Reaktionsschritte wurden im Thermocycler (T-Gradient, Biometra) 35 mal wiederholt. Im Anschluß an die Synthesesyklen folgte eine 4-minütige Elongationsphase bei 72°C.

2.15.3 Reinigung von DNA Fragmenten

Phenolisieren und Fällern von DNA

Zu 100 μ l DNA-Lösung wurde 1 Volumen neutralisiertes Phenol und 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) gegeben, 5 Minuten geschüttelt und dann 5 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Anschließend wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) 5 Minuten vermischt und zentrifugiert. Nun wurde der DNA-haltige Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gefällt. Dazu wurden dem Ansatz 1/10 Volumen 3M NaAcetat (pH 6,0) und das 2,5-fache Volumen an Ethanol (100%) zugegeben und mindestens 30 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach einer 30 minütigen Zentrifugation bei 4°C und 13 000 U/min wurde das DNA-Pellet mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und dann in gewünschter Menge H₂O aufgenommen.

DNA-Isolation aus einem *Low-Melting-Gel*

10x TE-Puffer

EDTA	100 mM
Tris/HCl	1 mM pH 8,0

Nach der Agarose-Gelelektrophorese (2.15.8), bei der *Low melting temperature*-Agarose (Cambrex Bio Science Rockland, USA) eingesetzt wurde, die schon bei 65°C schmilzt, wurde die entsprechende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und gewogen. Nach Zugabe des gleichen Volumens an 1x TE-Puffer wurde die Agarose bei 65°C geschmolzen. Dieser Ansatz wurde mit 1 Volumen Phenol (neutr.) 5 Minuten vermischt und dann 5 Minuten bei 13 000 U/min zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der Überstand wurde mit einem Volumen an Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) vermischt und erneut zentrifugiert. Mit Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) wurde dieser Schritt wiederholt. Anschließend wurde der DNA-haltige Überstand durch Zugabe von 1/4 Volumen an 7,5 M Ammonium-Acetat und dem 0,7-fachen an Isopropanol gefällt. Durch eine 20 minütige Zentrifugation bei 13 000 U/min und 4°C wurde die DNA sedimentiert. Nach zweimaligem Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das DNA-Pellet getrocknet und anschließend in H₂O aufgenommen.

2.15.4 Extraktion genomischer DNA aus Pflanzenmaterial

2x CTAB-Puffer

CTAB	2 % (w/v)
NaCl	1,4 M
EDTA	20 mM
Tris/HCl	100 mM pH 8,0

Rosettenblätter von *Arabidopsis thaliana* wurden mit einem „Eppie-Potter“ (*Destroy[®]-Sticks*, Biozym) im 1,5 ml Reaktionsgefäß mit flüssigem Stickstoff gemörsert. Nach der Zugabe von 500 µl 2x CTAB-Puffer erfolgte eine einstündige Inkubation bei 68°C. Anschließend wurde 5 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben und 15 Minuten bei 37°C inkubiert. 500 µl eines Chloroform-Isoamylalkoholgemisches (24:1) wurden hinzugefügt und 5 min geschüttelt. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 13 000 U/min in der Tischzentrifuge (Biofuge fresco, Heraeus) wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit 1 ml 100%igem Ethanol versetzt. Nach einer einstündigen Fällung bei -20°C wurde die DNA 20 min in der Tischzentrifuge, bei 13 000 U/min, abzentrifugiert.

fugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und anschließend in gewünschter Menge H₂O aufgenommen.

2.15.5 Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial

Extraktionspuffer

Na-Acetat	100 mM	
Na-EDTA	1 mM	
SDS	4 % (w/v)	pH 5,0

8 M LiCl Lösung

mit 0,2 % (v/v) DEPC behandelt

Die Isolierung von RNA aus *Arabidopsis thaliana* wurde nach der von Eggermont et al. (1996) beschriebenen Methode durchgeführt. Dazu wurde Pflanzenmaterial unter Zugabe von flüssigem Stickstoff mit einem Mörser zerkleinert. Nach Zugabe von 2 ml eines 1:1 Gemisches aus Extraktionspuffer und Phenol/Chloroform (1:1) wurde zunächst weiter gemörsert und anschließend gewartet bis die Proben aufgetaut waren. Die Lösung wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, fünf Minuten auf Eis inkubiert und dann bei 13 000 U/min und 4°C fünf Minuten zentrifugiert (Biofuge fresco, Heraeus). Der wässrige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen eines 1:1 Gemisches aus Phenol und Chloroform fünf Minuten geschüttelt und anschließend fünf Minuten bei 4°C und 13 000 U/min zentrifugiert. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Für alle Phenolisierungsschritte wurde dabei saures Phenol verwendet. Danach wurde zum Überstand das gleiche Volumen an Chloroform gegeben, fünf Minuten geschüttelt und abzentrifugiert. Zum Schluß wurde die RNA unter Zugabe von einem halben Volumen an 8 M LiCl aus der wässrigen Phase ausgefällt, indem die Lösung für mindestens eine Stunde bei -20°C inkubiert wurde. Danach wurde die RNA durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 13 000 U/min sedimentiert, zweimal mit 70%igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µl H₂O aufgenommen.

2.15.6 Extraktion von RNA aus Pflanzenmaterial für die Reverse Transkription

Für die Reverse Transkription wurde die RNA mit dem TRIZOL[®] Reagent von Invitrogen nach Herstellerangaben extrahiert.

2.15.7 Quantifizierung von DNA- und RNA-Lösungen

Die Nukleinsäurekonzentration wurde über die Messung der Absorption (A) mit dem Spektrophotometer (UV-1602, Shimadzu) bei 260 nm bestimmt. Dabei entspricht eine A_{260} -Einheit einer DNA Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und einer RNA-Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Bei geringen DNA Mengen, erfolgte die Quantifizierung visuell mittels eines DNA-Markers (HyperLadder I, Bioline) über Agarose-Gelelektrophorese.

2.15.8 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Als Laufpuffer diente 1x Tris-Acetat.

50x Tris-Acetat		
Tris	2 M	
Na-Acetat	1 M	
EDTA	50 mM	pH 7,5 (mit CH_3COOH)
5x Auftragspuffer		
Ficoll	15 %	
EDTA	50 mM	
SDS	0,5 % (v/v)	
50x Tris-Acetat	1 x	
Bromphenolblau	0,005 %	
Xylencyanol	0,005 %	

2.15.9 RNA-Gele

10x MOPS-Puffer	
MOPS	200 mM
Na-Acetat	50 mM
EDTA	5 mM pH 7,0 mit NaOH

Die Auftrennung der RNA-Proben erfolgte unter denaturierenden Bedingungen, um Sekundärstrukturen zu vermeiden. Dazu wurde eine 1,5%ige Agarose-Lösung mit 1x MOPS-Puffer aufgekocht und nach dem Abkühlen mit 2% (v/v) Formaldehyd versetzt.

Für den Northern Blot (2.15.11) wurden 30 μg RNA-Lösung mit 1/10 Volumen 10x MOPS versetzt und auf 4% Formaldehyd (37%) und 40% Formamid eingestellt. Danach wurde die Probe 15 Minuten auf 65°C erhitzt und kurz auf Eis abgekühlt. Nach Zugabe von 1 μl Ethidiumbromid wurden die Proben auf das RNA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V mit 1x MOPS als Laufpuffer.

2.15.10 Genomischer Southern Blot

Transferlösung

NaOH 0,4 M

NaCl 1,5 M

Neutralisierungslösung

NaCl 1,5 M

Tris/HCl 0,5 M pH 7,2

10 μg genomischer DNA wurden zunächst mit Restriktionsendonukleasen gespalten (2.15.1) und anschließend auf einem 0,8%igem Agarose-Gel (2.15.8) aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel zweimal 15 Minuten und die Membran nach kurzem anfeuchten mit H_2O für 5 Minuten in der Transferlösung unter leichtem Schütteln inkubiert. Die DNA wurde mittels Kapillartransfer, wie von Southern (1975) beschrieben, aus dem Agarose-Gel auf eine Nylonmembran (2.4) transferiert. Im Anschluß daran wurde die Membran 15 Minuten in Neutralisierungslösung inkubiert, getrocknet und dann 30 Minuten bei 80°C gebacken.

2.15.11 Northern Blot

20x SSC

NaCl 3 M

Na-Citrat 0,3 M pH 7,0

Die auf einem denaturierenden Agarosegel (2.15.9) aufgetrennten Ribonukleinsäuren wurden durch Kapillartransfer auf eine Nylonmembran (2.4) transferiert. Dazu wurde das Gel nach dem Lauf kurz in 10x SSC geschwenkt und die Membran erst mit H_2O und dann mit 10x SSC inkubiert, bevor der Blot wie unter 2.15.10 beschrieben aufgebaut wurde. Der Transfer erfolgte über Nacht mit 10x SSC als Transferlösung. Im Anschluß daran wurde die Membran kurz in 2x SSC gewaschen, getrocknet und dann 30 Minuten bei 80°C gebacken.

2.15.12 Radioaktive Markierung von DNA-Sonden

Lösung A

β -Mercaptoethanol	2 % (v/v)	
dCTP, dATP, dTTP	je 0,5 mM	
MgCl ₂	0,125 M	
Tris/HCl	1,25 M	pH 8,2

Lösung B

Hepes/NaOH	2 M	pH 6,6
------------	-----	--------

Lösung C

Hexadesoxynukleotide	3,6 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
----------------------	-------------------------------

OLB-Puffer

Lösung A : Lösung B : Lösung C		
100	:	250 : 100

Die radioaktive Markierung der DNA beruht auf der Methode von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984). Es wurden 30 μl DNA-Lösung (100 ng) zusammen mit 10 μl OLB-Puffer zum Denaturieren 10 Minuten auf 95°C erhitzt. Nach kurzem Abkühlen auf Eis, wurden dem Ansatz 2 μl BSA (1 mg/ml), 20 - 30 μCi α [³²P]-dCTP und 4 Units Klenow-Fragment zugegeben, so dass das Endvolumen 50 μl betrug. Es folgte eine Inkubation bei 37°C für 4 Stunden oder über Nacht bei 30°C. Bei diesem Schritt wurde der komplementäre DNA-Strang unter Verwendung des radioaktiven Nukleotides durch die DNA-Polymerase neu synthetisiert. Als Primer dienten hierbei die Hexadesoxynukleotide, die eine zufällige Sequenz aufwiesen, und somit an beliebigen Stellen der DNA binden konnten.

Der Einbau des radioaktiven Nukleotides wurde überprüft, indem die Aktivität des Sedimentes und des Überstandes nach einer TCA-Fällung eines Aliquots verglichen wurde.

2.15.13 Hybridisierung von Southern Blots

100x Denhardt 's	
Ficoll	2 %
PVP (M _r 40000)	2 %
BSA	2 %

Hybridisierungslösung	
SSC (2.15.11)	4 x
Denhardt 's	5 x
SDS	0,5 %

Die Nylonmembranen mit der fixierten DNA (2.15.10) wurden nach kurzem Anfeuchten mit H₂O für zwei Stunden bei 65°C in der Hybridisierungslösung mit 100 µg/ml denaturierter Heringsspermien DNA vorhybridisiert. Für die Hybridisierung wurde die radioaktiv markierte Sonde (2.15.12), die zuvor durch 5-minütiges Erhitzen auf 95°C denaturiert wurde, zu der Vorhybridisierungs-Lösung gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht. Anschließend wurde die unspezifisch gebundene Aktivität durch Waschungen bei 65°C entfernt. Dazu wurden Waschlösungen mit zunehmender Stringenz eingesetzt (je 2x 15 Minuten mit: 2x SSC/0,1 % SDS; 1x SSC/0,1 % SDS; 0,1x SSC/0,1 %).

2.15.14 Hybridisierung von Northern Blots

Northern-Hybridisierungs-Lösung		
NaH ₂ PO ₄	0,25 M	pH 7,2
NaCl	0,25 M	
EDTA	1 mM	
Heringsspermien-DNA	10 mg/l	
SDS	7 % (w/v)	
PEG (M _r 6000)	5 % (w/v)	
deion. Formamid	25 %	erst nach pH-Einstellung zugeben

Die Nylonmembranen (2.15.11) wurden mit H₂O angefeuchtet und anschließend kurz in 0,25 M NaCl, 0,25 M NaH₂PO₄ pH 7,2 inkubiert. Danach erfolgte die Vorhybridisierung bei 42°C für 2 Stunden in der Northern-Hybridisierungs-Lösung mit 100 µg/ml denaturierter Heringsspermien DNA. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht bei 42°C unter Zugabe der radioaktiv markierten Sonde, die zuvor durch 5-minütiges Erhitzen auf

95°C denaturiert wurde. Die Waschungen wurden wie bei der Southern-Hybridisierung (2.15.13) beschrieben bei 65°C durchgeführt.

2.15.15 Reverse Transkription

Für die Synthese des Erststranges wurden zunächst DNA-Verunreinigungen durch eine DNase-Behandlung abgedaut. Dazu wurde 1 µg RNA mit 5 µl 5x Puffer der eingesetzten Reversen Transkriptase und 1 µl DNase (RNase frei) in einem Volumen von 25 µl für 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Die DNase wurde durch die Zugabe von 2,5 µl EDTA (25mM) und 10-minütiges Erhitzen auf 65°C inhibiert. Von diesem Ansatz wurden 13 µl zu 10 µl oligo-dT (100 ng/ µl), 7,5 µl 5x Puffer, 10 µl dNTPs (2,5 mM jedes), 5 µl 0,1 M DTT, 4 µl H₂O und 0,5 µl M-MLV Reverse Transkriptase, RNase H Minus (M5301, Promega) gegeben bei 42°C inkubiert. Nach einer Stunde wird die Reaktion durch 10-minütiges Erhitzen auf 70°C gestoppt.

2.15.16 *real-time* PCR

Um den mRNA-Gehalt aus unterschiedlichen Pflanzen zu vergleichen wurde zunächst die RNA in Erststrang cDNA umgeschrieben 2.15.15 und dann eine *real-time* PCR mit der Erststrang cDNA und genspezifischen Primern durchgeführt. In der *real-time* PCR, die wie eine normale PCR (2.15.2) funktioniert, wird zusätzlich der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR[®] Green I* (Invitrogen) zugesetzt. Dieser Farbstoff gibt bei der Bindung an dsDNA ein Signal, welches proportional zur DNA-Menge ist. Der DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei $\lambda_{max} = 497$ nm und emittiert grünes Licht bei $\lambda_{max} = 520$ nm. Durch die Fluoreszenzmessung am Ende eines jeden Zyklus ist eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Menge möglich. Da hier der relative Gehalt eines Gens untersucht werden soll, wird die Zyklenzahl ($C = cycle$) bei der das Fluoreszenzsignal einen definierten Schwellenwert ($T = threshold$) überschreitet bestimmt. Er wird als CT-Wert bezeichnet. Anhand des CT-Wertes läßt sich der relative Gehalt eines Gens in Pflanze x nach der $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode von Livak und Schmittgen (2001) berechnen. Zunächst wird der CT-Wert des Zielgens durch Subtraktion des Referenzgens (Aktin) normalisiert ($\Delta CT = CT_{Zielgen} - CT_{Referenzgen}$). Vom ΔCT -Wert der Pflanze x wird der ΔCT -Wert der Kontrollpflanze subtrahiert. Der nun erhaltene $\Delta\Delta CT$ -Wert entspricht der Zyklendifferenz zwischen den beiden Pflanzen. Unter der Annahme, dass mit jedem Zyklus die DNA-Menge verdoppelt wird, läßt sich der relative Expressionsunterschied als n-fache Menge der Kontrollpflanze mit der Formel $2^{-\Delta\Delta CT}$ berechnen.

Die *real-time* PCR wurde auf dem *Bio-Rad iCycler* mit der *iCycler™iQ Optical System Software* Version 3.0a von Bio-Rad durchgeführt.

Ein 20 μl PCR-Ansatz enthielt 2 μl Erststrang cDNA, je 0,4 μl Primer (10 pmol/ μl), 0,8 μl MgCl_2 (50 mM), 2 μl 10x Puffer der Polymerase, 1,2 μl dNTPs (2,5 mM jedes) 1 μl *SYBR® Green I* (1:1000) und 0,08 μl *Platinum® Taq DNA Polymerase* (Invitrogen).

Die PCR erfolgte in Folgenden Schritten:

- | | | |
|--------------------------------|--------------------|----------------------------------|
| 1. Aktivierung der Polymerase: | 95°C | 3 min |
| 2. Denaturierung: | 95°C | 20 sek |
| 3. Anlagerung der Primer: | 59°C | 20 sek |
| 4. Synthese: | 72°C | 30 sek |
| | Fluoreszenzmessung | 40x zurück zu 2. |
| 5. Schmelzkurve: | 55 - 95°C | je 10 sek dann Erhöhung um 0,5°C |

Um die Genauigkeit der PCR zu verifizieren wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt, da *SYBR® Green I* an jede dsDNA bindet und so mögliche unspezifische Produkte wie Primerdimere detektiert werden können. Weiterhin wurde die falsch-positive Messung der Primerdimere durch eine Fluoreszenzmessung bei 72°C ausgeschlossen.

2.16 Klonierungen

2.16.1 Klonierung von atToc159A-His₆, atToc159G-His₆, atToc132A-His₆ und atToc120A-His₆

Die für die Erstellung der Konstrukte atToc159A-His₆ (Nukleotid 1-2208) im pQE-60 bzw. pET-28a(+)-Vektor, atToc159G-His₆ (Nukleotid 2211-3270), atToc132A-His₆ (Nukleotid 1-1296) und atToc120A-His₆ (Nukleotid 1-915) verwendeten Primer, Vektoren und Expressionsstämme sind in Tabelle 2.3 angegeben.

Zunächst wurde eine PCR mit den dort angegebenen Primern für das atToc159A-Fragment auf cDNA, da das *atToc159*-Gen ein Intron im Bereich der A-Domäne enthält, und für die atToc159G-, atToc132A- und atToc120A-Fragmente auf gDNA aus *Arabidopsis thaliana* durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden in den pGEM-T Easy-Vektor ligiert und an den durch die PCR eingebrachten Schnittstellen wieder herausgeschnitten. Nach der Abtrennung der geschnittenen Fragmente vom Vektor in einem *Low-Melting*-Gel wurden diese aus dem Gel eluiert (2.15.3). Anschließend wurden diese Fragmente in den, mit den selben Enzymen geschnittenen, Expressionsvektor ligiert. Nach der Transformation in *E. coli* wurde die Plasmid-DNA der erhaltenen Klone auf das Vorhandensein des eingebrachten Genfragments durch eine Sequenzierung überprüft und dann in den jeweiligen in der Tab. 2.3 angegebenen Expressionsstamm transformiert.

Tab. 2.3: Angegeben sind die für die Klonierungen von atToc159A-His₆, atToc132A-His₆, atToc120A-His₆ und atToc159G-His₆ verwendeten Primer, Vektoren und Expressionsstämme.

	Primer 5'	Primer 3'	Vektor	Expressionsstamm
atToc159A-His ₆	Toc1ATG/NcoI	Toc1N3'/BglII	pQE-60	C43
atToc159A-His ₆	Toc1ATG/NcoI	Toc1N3'/XhoI	pET-28a(+)	Rosetta(DE3)pLysS
atToc159G-His ₆	Toc1GTP5'NcoI	Toc1GTP3'XhoI	pET-28a(+)	Rosetta(DE3)pLysS
atToc132A-His ₆	Toc2_ATG_NdeI	Toc2_N3'_XhoI/2	pET-26b(+)	Rosetta(DE3)pLysS
atToc120A-His ₆	Toc3_ATG_NdeI	Toc3_N3'_XhoI	pET-26b(+)	Rosetta(DE3)pLysS

2.16.2 Klonierung des Toc132-RNAi-Konstrukts

Eine Übersicht über die Klonierungsschritte ist in Abb. 2.1 gezeigt. Für die Herstellung des Toc132-RNAi-Konstrukts wurde zunächst ein Sense- und Antisensefragment vom 5'-Ende des Gens mittels PCR von genomischer DNA aus *Arabidopsis thaliana* amplifiziert. Hierfür wurden folgende Primer eingesetzt: Toc2Sens5'FseI und Toc2Sens3'XbaI für das Sensefragment sowie Toc2Antisens5'NotI und Toc2Antisens3'BamHI für das Antisensefragment. Die 339 bp langen PCR Fragmente wurden in pGEM-T Easy ligiert.

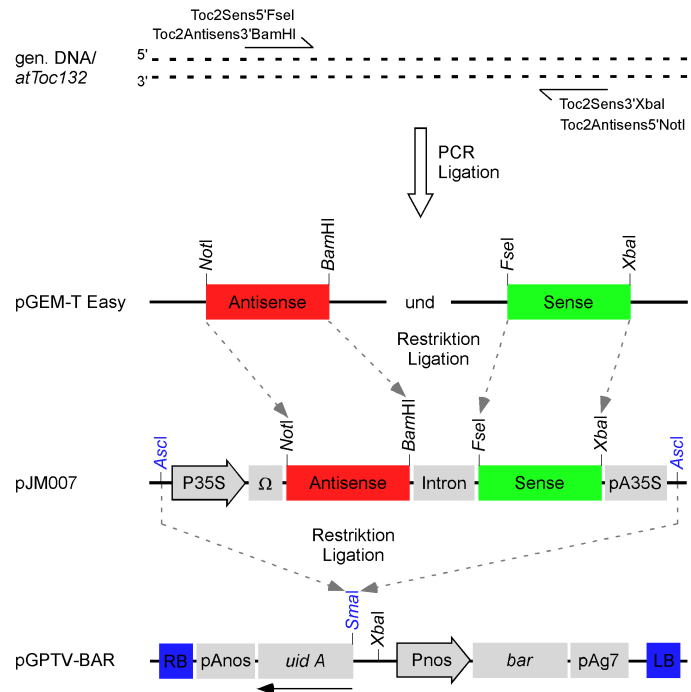


Abb. 2.1: Klonierungsschema für das Toc132RNAi-Konstrukt. P35S = Promotor des CaMV, Pnos = Promotor der Nopalin-Synthase, pA... = polyadenylierungs Sequenz, Ω = 67 bp leader-Sequenz des Tabakmosaikvirus, uid A = β-Glucuronidase-Gen (GUS), RB/LB = right- bzw. left border.

Danach wurden das Sense- und Antisensefragment an den durch die PCR eingebrachten Schnittstellen herausgeschnitten und in den, mit den selben Enzymen geschnittenen, pJM007-Vektor (Schattat et al., 2004) vor bzw. hinter die Intronsequenz ligiert. Mit dem Enzym *AscI* wurde der Bereich, der den 35S-Promotor sowie das Sense- und Antisensefragment umschließt, herausgeschnitten. Die Schnittstellen dieses Fragments wurden aufgefüllt und in die mit *SmaI* geschnittene und dephosphorylierte Schnittstelle des binären pGPTV-BAR-Vektors eingebracht.

Die Transformation von *Arabidopsis thaliana* mit diesem RNAi-Konstrukt erfolgte, wie im Abschnitt 2.12.5 angegeben.

3 Ergebnisse

3.1 Antikörperherstellung

Für die Analyse von Toc-Mutanten sowie für die Untersuchung der Zusammensetzung des Toc-Komplexes wurden Antikörper benötigt, welche atToc159, atToc132 und atToc120 trotz der hohen Homologie untereinander spezifisch erkennen.

Um geeignete Bereiche zu finden, die nur eine geringe Homologie zu den jeweils anderen Toc-Proteinen aufweisen und somit als Antigene genutzt werden können, wurde zunächst mit ClustalW ein Sequenzvergleich auf Aminosäureebene durchgeführt. Verglichen wurde jeweils die Übereinstimmung zweier Toc-Proteinen über ihre gesamte Länge und in den Bereichen der A-, G- bzw. M-Domäne. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.1 dargestellt.

Tab. 3.1: Vergleich der Aminosäuresequenzen mit ClustalW. Angegeben ist die Übereinstimmung der Aminosäuren zwischen zwei Toc-Proteinen in Prozent. Verglichen wurde die Identität über die gesamte Länge und in den Bereichen der A-, G- bzw. M-Domäne.

	Gesamt		A-Domäne		G-Domäne		M-Domäne	
	atToc132	atToc120	atToc132	atToc120	atToc132	atToc120	atToc132	atToc120
atToc159	36,9	40,1	15,5	21,2	51,2	50,9	50,1	48,3
atToc132	-	75,9	-	47,7	-	92,8	-	87,0

Die geringste Sequenzübereinstimmung ist im Bereich der A-Domänen zu finden, wie auch schon von Bauer et al. (2000) mit $\sim 20\%$ angegeben. Allerdings ist anhand der Ergebnisse zu sehen, dass nur zwischen atToc159 und atToc132 oder atToc120 eine geringe (15,5 bzw. 21,2%), zwischen atToc132 und atToc120 jedoch eine höhere Übereinstimmung von 47,7% besteht. Da die Aminosäureübereinstimmungen in den G- und M-Domänen zwischen allen Toc-Proteinen größer sind (50,1 – 92,8% Identität) wurden die A-Domänen als Antigene ausgewählt und heterolog in *E. coli* überexprimiert (2.16.1, 2.14.1). Des Weiteren wurde ein Antikörper gegen die G-Domäne von atToc159 hergestellt, da laut Bölder et al. (1998) die A-Domäne sehr leicht proteolytisch abgebaut wird und somit eventuell das atToc159-Protein nicht mehr mit einem Antikörper gegen die A-Domäne nachweisbar wäre.

3.1.1 Überexpression und Reinigung der Antigene

Alle Antigene wurden mit einem C-terminalen Hexahistidin-*tag*, der für die anschließende Reinigung des Proteins genutzt werden sollte, heterolog in *E. coli* exprimiert. Die Klonierung der Antigene ist in Abschnitt 2.16.1 auf Seite 46 näher beschrieben. Der Aufbau der Antigenkonstrukte ist in Abb. 3.1 gezeigt.

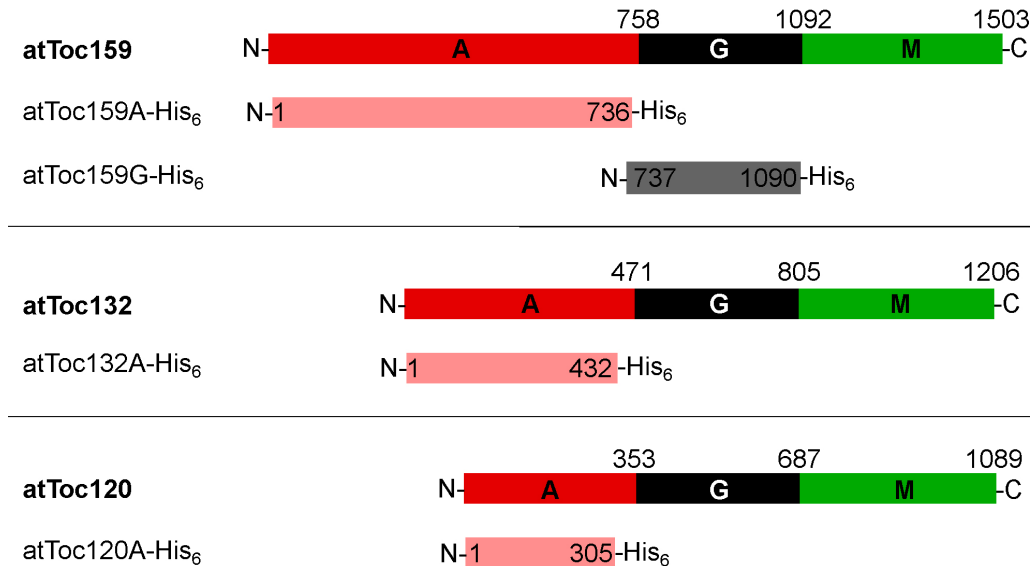


Abb. 3.1: Aufbau der Antigenkonstrukte. Es sind jeweils die authentischen Proteine und die zugehörigen Antigenkonstrukte untereinander dargestellt. Die Längen sind in Aminosäuren angegeben.

Das atToc159A-His₆-Konstrukt im pQE-60-Vektor, welches für die ersten 736 Aminosäuren der A-Domäne von atToc159 kodiert, wurde im *E. coli* Stamm C43 exprimiert. In Abb. 3.2 ist ein Coomassie gefärbtes SDS-Gel mit den aufgetrennten *E. coli*-Proteinen vor (-) und nach (+) der Induktion mit IPTG gezeigt. Beim Vergleich des Proteinmusters ist festzustellen, dass kein Protein nach der Induktion sichtbar stärker exprimiert wurde. Auch eine Veränderung der Anzuchtbedingungen (Temperatur und Medium), sowie der Einsatz anderer *E. coli*-Stämme, wie z. B. M15, SG13009 oder TG1 brachten keine Verbesserung der Expression (nicht gezeigt). Eine Westernanalyse der selben Proben mit dem Penta-His-Antikörper zeigt, dass eine geringe Expression vorhanden war. Erwartet wurde eine Expressionsbande von 77,7 kDa. Es konnten jedoch zwei stärkere Banden von ca. 125 kDa und 80 kDa und zwei schwächere von ca. 70 und 66 kD detektiert werden. Da diese Banden sowohl in der induzierten als auch uninduzierten Spur nachweisbar waren, scheint keine effiziente Expressionskontrolle erfolgt zu sein, obgleich

die Genexpression über das *lac*-Operon reguliert wird. Im Anschluss an die Expression wurde eine Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie durchgeführt, um das mit sechs Histidinen versehene Protein aufzureinigen (2.14.2). Die eluierten Proteine wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Wie in der Spur Ni^{2+} zu sehen ist, wurden neben den zuvor in der Westernanalyse detektierten 4 Proteinen weitere Proteine von der Ni^{2+} -NTA-Säule eluiert. Um zu klären, welche der Banden das Antigen repräsentieren, wurden die Banden, die auch in der Western-Analyse detektiert wurden (in Abb. 3.2 mit einem Dreieck markiert) mittels Massenspektrometrie analysiert. Es stellte sich heraus, dass es sich bei allen 4 Banden um die A-Domäne von atToc159 handelt. Dies lässt sich damit erklären, dass es sich bei den kleineren Fragmenten sehr

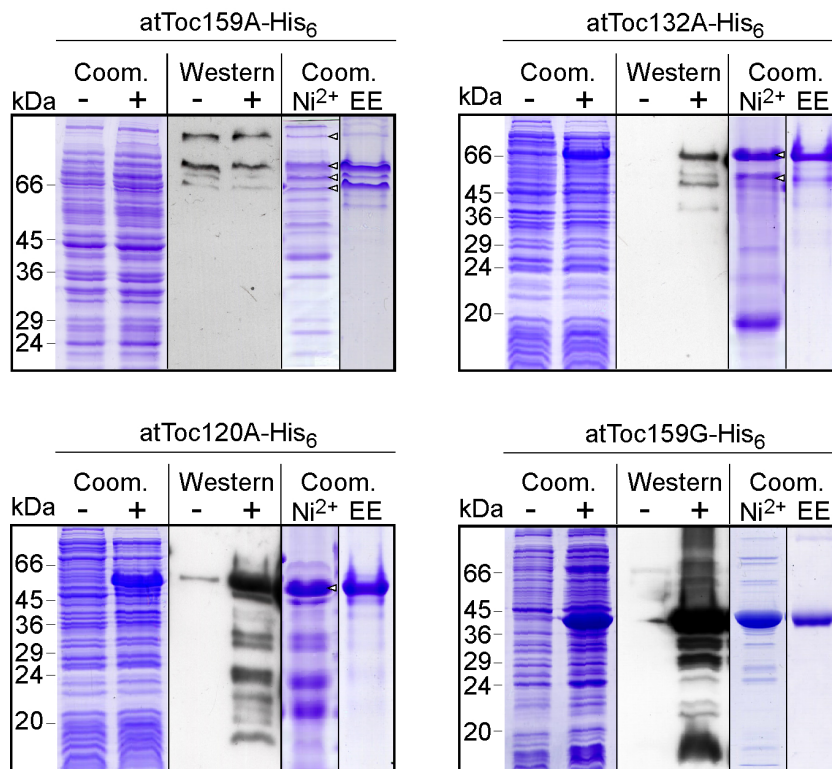


Abb. 3.2: Überexpression und Reinigung der Antigene. Die jeweiligen heterolog exprimierten Proteine sind über den Spuren 1 bis 6 angegeben. Die Spuren 1 und 2 zeigen ein Coomassie (Coom.) gefärbtes SDS-Gel mit den aufgetrennten *E. coli*-Proteinen vor (-) und nach (+) der Induktion mit IPTG. Die Spuren 3 und 4 entsprechen der Beladung von 1 und 2, wobei hier eine Immunodetektion mit dem Penta-His-Antikörper erfolgte. Die Spuren 5 und 6 zeigen ein Coomassie (Coom.) gefärbtes Polyacrylamid-Gel nach der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie (Ni^{2+}) bzw. der nachfolgenden Elektroelution (EE). Die elektroeluierten, gereinigten Antigene wurden für die Immunisierung eingesetzt. Die Dreiecke markieren die per Massenspektrometrie überprüften Banden.

wahrscheinlich um Abbauprodukte handelt. Selbst bei der ca. 125 kDa großen Bande ließ sich in der massenspektrometrischen Analyse nach dem Trypsinverdau kein Fragment vom N-Terminus nachweisen, sondern nur von der Mitte und dem C-Terminus mit den sechs Histidinresten.

Aufgrund der geringen Expressionsraten des pQE-Vektors wurde für eine effizientere Expression der folgenden Antigenkonstrukte das pET-Vektorsystem eingesetzt. Es beruht auf dem von Studier und Moffatt (1986) entwickelten Expressionssystem, bei welchem das zu exprimierende Gen unter die Kontrolle eines T7-Promotors gestellt wird. Für die Antigene atToc132A-His₆, atToc120A-His₆ und atToc159G-His₆ war in der Tat nach der Induktion eine eindeutige Expressionsbande im Coomassie gefärbten Gel mit den *E. coli*-Proteinen sichtbar (Abb. 3.2). Da die selben Banden auch in der Westernanalyse mit dem Penta-His-Antikörper nachgewiesen werden konnten, handelt es sich offenbar um die überexprimierten Antigene. Nach der Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie wurden hauptsächlich Proteine eluiert, die das selbe Molekulargewicht wie die zuvor detektierten Hauptexpressionsbanden aufwiesen. Für atToc159G-His₆ stimmt das apparente Molekulargewicht von 40 kDa mit dem berechneten Molekulargewicht (39,4 kDa) überein. Die Antigene atToc132A-His₆ und atToc120A-His₆ laufen auf einer Höhe von ca. 66 bzw. 55 kDa. Ihre Größe entspricht nicht dem berechneten Molekulargewicht von 48,5 kDa für atToc132A-His₆ bzw. 33,9 kDa für atToc120A-His₆. Daher wurden für atToc132A-His₆ die 66 kDa Bande und eine etwas kleinere Bande von ca. 55 kDa und für atToc120A-His₆ die 55 kDa Bande mittels Massenspektrometrie überprüft. Alle analysierten Banden entsprachen dem jeweiligen Antigen. Bei der kleineren Bande für atToc132A-His₆ handelt es sich sehr wahrscheinlich um ein Abbauprodukt desselben.

Die mittels Ni²⁺-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine wurden auf präparativen SDS-Polyacrylamid-Gelen (20 x 20 cm) aufgetrennt und die Banden, die in der Massenspektrometrie als Toc-Proteine identifiziert wurden, sowie die eindeutige Expressionsbande von atToc159G-His₆, aus dem Gel ausgeschnitten und elektroeluiert. Die elektroeluierten Antigene sind in Spur EE zu sehen. Jeweils 1 mg von ihnen wurde für die Immunisierung (2.14.17) eingesetzt.

3.1.2 Erkennung der Antigene durch die erhaltenen polyklonalen Antikörper

Nachdem die erhaltenen Antiseren im Western Blot mit Gesamtproteinextrakt aus *Arabidopsis thaliana* (hier nicht gezeigt) keine eindeutigen Signale zeigten, wurden alle Seren gegen das entsprechende Antigen affinitätsgereinigt (2.14.18).

Für die Affinitätsreinigung der Antikörperseren wurden die mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Antigene eingesetzt. Da die Expressionsrate von atToc159A-His₆ im pQE-60 Expressionsvektor sehr gering ausfiel, wurde zunächst atToc159A in den Expressionsvektor pET-28(+) kloniert (2.16.1). Nach der Induktion mit IPTG war nun eine Expressionsbande für atToc159A-His₆ bei ca. 80 kDa im *E. coli*-Gesamtproteinextrakt sichtbar, wie in Abb. 3.3 zu sehen.

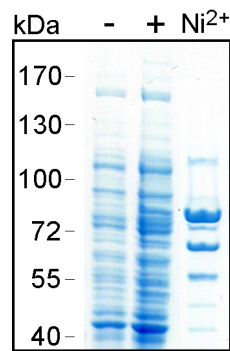


Abb. 3.3: AtToc159A-His₆ in pET-28(+). Coomassie gefärbte 7,5%ige SDS-PAGE von *E. coli*-Gesamtproteinextrakt vor (-) und nach (+) der Induktion mit IPTG, sowie die Elutionsfraktion nach der Ni^{2+} -NTA-Affinitätsreinigung (Ni^{2+}).

Das Bandenmuster nach der Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie (Ni^{2+}) entsprach dem, welches mit dem Konstrukt im pQE-60 Vektor beobachtet wurde. Es sind wieder eine schwache Bande bei ca. 125 kDa und drei weitere bei ca. 80, 68 und 55 kDa zu sehen, bei denen es sich sehr wahrscheinlich um Abbauprodukte handelt.

Die mittels Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Antigene wurden an eine NHS aktivierte Säule gekoppelt und das jeweilige Antiserum langsam darüber gepumpt, wie in Abschnitt 2.14.18 beschrieben. Anschließend wurden die gebundenen Antikörper mit steigender Stringenz von der Säule eluiert. Als erstes wurde die Glycinfraction mit Antikörpern niedriger Affinität, dann die Harnstofffraktion mit Antikörpern mittlerer und zum Schluss die Guanidinhydrochlorid-Fraktion mit Antikörpern hoher Affinität erhalten. Als Beispiel sind die drei Fraktionen des gereinigten Toc132A-Antikörpers in Abb. 3.4 gezeigt. Die letzte Antikörperfraktion enthielt bei allen Antikörpern nur noch

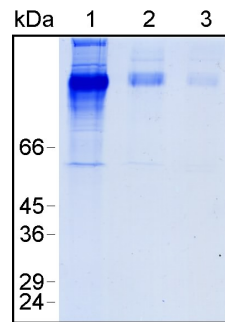


Abb. 3.4: Gereinigter Toc132A-Antikörper. Coomassie gefärbte 12,5%ige SDS-PAGE mit jeweils 12 μ l gereinigtem Antikörper der Glycin-(1), Harnstoff-(2) und Guanidinhydrochlorid-Fraktion (3) in 1x Probenpuffer ohne β -Mercaptoethanol.

sehr wenige Antikörper, weshalb nur die Glycin- und Harnstofffraktion für die folgenden Versuche eingesetzt wurde.

Erkennung der heterolog exprimierten Antigene

Um die Spezifität und Sensitivität der Antikörper zu testen, wurden jeweils 1, 5 und 10 (bzw. 1, 10 und 100) ng des affinitätsgereinigten Antigens auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und eine Westernanalyse mit den gereinigten Antikörperfraktionen durchgeführt (Abb. 3.5, 3.6). Die Verdünnungen der Antikörper wurden zuvor ausgetestet, wobei immer mehr von der Harnstofffraktion eingesetzt wurde, da die Antikörperkonzentration hier geringer ist als in der Glycinfraction (siehe Abb. 3.4).

Mit den Glycinfractionen von α Toc159A, α Toc132A und α Toc120A konnte 1 ng des jeweiligen Antigens detektiert werden (Abb. 3.6). Die Glycinfraction von α Toc159G hingegen detektierte nur ganz schwach die 1 ng Bande des atToc159G-His₆-Antigens (Abb. 3.5). Erst ab 5 ng Antigen war ein deutliches Signal sichtbar. Mit der Harnstoff-

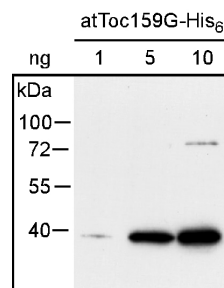


Abb. 3.5: Sensitivität von α Toc159G. Jeweils 1, 5 und 10 ng des überexprimierten Antigens wurden mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend eine Immundetektion mit der Glycin-Fraktion des Toc159G-Antikörpers (1:750) durchgeführt.

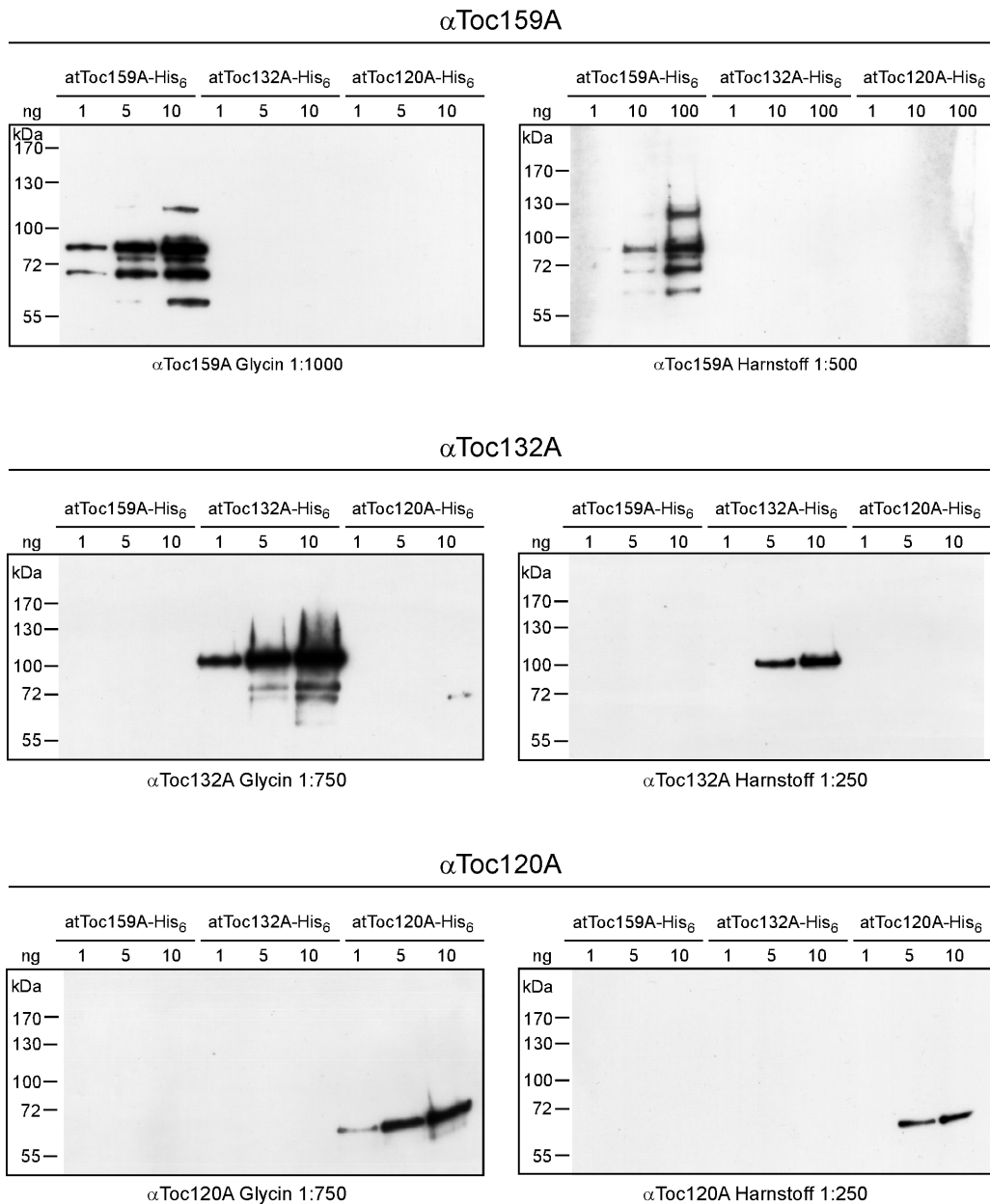


Abb. 3.6: Spezifität und Sensitivität der Toc-Antikörper. Jeweils 1, 5 und 10 (bzw. 1, 10 und 100) ng des affinitätsgereinigten Antigens wurden mittels SDS-PAGE getrennt und anschließend einer Westernanalyse mit der jeweiligen Glycin- und Harnstofffraktion der Toc159A-, Toc132A- und Toc120A-Antikörper unterzogen. Die Detektion erfolgte durch eine ECL-Reaktion.

fraktion von α Toc132A und α Toc120A ist ein Signal ab 5 ng Antigen bzw. 10 ng für α Toc159A nachweisbar. Bedingt durch den proteolytischen Abbau von atToc159A-His₆ verteilen sich die 10 ng Protein auf mehrere Banden, weshalb die Sensitivität der Harnstofffraktion von α Toc159A mit der der anderen Harnstofffraktionen gleichzusetzen ist. Beide Fraktionen des Toc159A-Antikörpers erkennen spezifisch das atToc159A-Antigen und nicht atToc132A-His₆ oder atToc120A-His₆. Die Glycinfraction von α Toc132A kreuzreagiert mit der 10 ng Bande des atToc120A-His₆-Antigens. Gleiches gilt für den Toc120A-Antikörper. Es ist eine Kreuzreaktion der Glycinfraction mit dem atToc132A-His₆-Antigen ab einer Konzentration von 100 ng (hier nicht gezeigt) nachweisbar. Für die Harnstofffraktionen von α Toc132A und α Toc120A konnte keine Kreuzreaktion mit den anderen Antigenen beobachtet werden.

Erkennung der Antigene in *Arabidopsis thaliana*

Zur Klärung der Frage, ob die gewonnenen Antikörper auch ihr natürliches Antigen in *Arabidopsis thaliana* erkennen, wurden lösliche Proteine und Gesamtmembranproteine aus jeweils 16 mg Rosettenblättern in einer SDS-PAGE aufgetrennt und eine Westernanalyse durchgeführt (Abb. 3.7). Neben dem WT wurden auch *Arabidopsis* T-DNA Insertionsmutanten für *atToc159*, *atToc132* und *atToc120*, die in Abschnitt 3.2 näher charakterisiert werden, untersucht. Da sie keine mRNA für die entsprechenden Gene mehr exprimieren, wie in Abschnitt 3.2.2 gezeigt wird, können sie auch kein entsprechendes Protein mehr enthalten.

Die Immundetektionen wurden mit den Glycin- (Gly) und Harnstofffraktionen der A-Domänen-Antikörper bzw. der Glycinfraction von α Toc159G durchgeführt.

Mit α Toc159A (Gly) konnte in der Spur mit den löslichen Proteinen (L) aus dem WT eine Bande bei 170 kDa und eine schwache Bande bei 80 kDa detektiert werden. Diese Banden wurden nicht mit der Harnstofffraktion des Antikörpers detektiert. Mit beiden Antikörperfraktionen konnte jedoch eine Bande von 230 kDa in der Spur mit den Membranproteinen (M) und mit der Glycinfraction noch eine kleinere bei 170 kDa nachgewiesen werden. Die Glycin- und Harnstofffraktionen des Toc159A-Antikörpers detektierten keine Banden in den Spuren L und M mit Proteinen aus der *atToc159*-Mutante, daher scheinen alle Signale spezifisch für atToc159 zu sein.

Mit dem Antikörper, der gegen die G-Domäne von atToc159 gerichtet ist, konnte in der Spur L im WT keine Bande detektiert werden, daher handelt es sich höchstwahrscheinlich bei der 170 kDa Bande, die mit dem Toc159A-Antikörper in Spur L detektiert wurde, um die A-Domäne. In der Spur mit den Membranproteinen wurden mit α Toc159G (Gly)

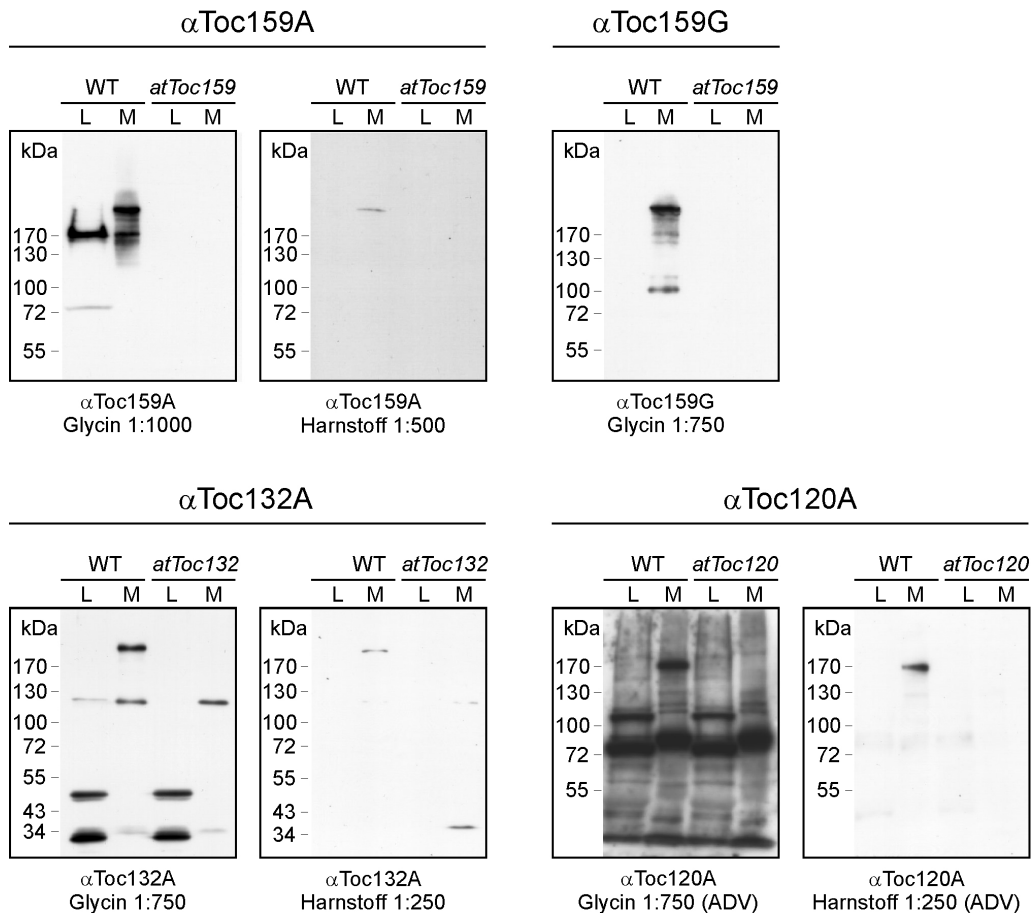


Abb. 3.7: Antikörpertest auf *Arabidopsis thaliana*. Jeweils lösliche Proteine (L) und Membranproteine (M) aus 16 mg Rosettenblättern von WT und Mutante wurden auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion erfolgte mit den jeweils angegebenen Antikörpern durch eine ECL Reaktion mit normaler Detektionslösung 2.14.16 oder dem sensitiveren *ECL-Advance*-Detektionssystem (ADV).

Signale des selben Molekulargewichts detektiert wie mit α Toc159A (Gly), bis auf eine kleinere Bande bei 100 kDa. Bei dieser 100 kDa Bande handelt es sich sehr wahrscheinlich um die G- und M-Domäne, da diese nicht von α Toc159A erkannt wurde. Auch mit α Toc159G ist kein Signal in der Mutante nachweisbar, somit sind die Signale spezifisch für *atToc159*. Im Vergleich zum Toc159A-Antikörper erkennt der Toc159G-Antikörper das *atToc159*-Protein schlechter, denn es waren längere Expositionszeiten nötig, um die selbe Signalintensität zu erhalten.

Der Toc132A-Antikörper (Gly) detektierte in der Spur mit den löslichen Proteinen aus dem WT Banden bei 120, 50 und 32 kDa und in der Spur mit den Membranproteinen Signale bei 200 und 120 kDa. Bis auf die 200 kDa Bande in der Spur M und der 120 kDa

Bande in der Spur L erschienen alle Banden auch in den Spuren L und M mit Proteinen aus der *atToc132*-Mutante, hierbei handelt es sich um unbekannte Kreuzreaktionen des Antikörpers, jedoch nicht um *atToc132*. Bei dem 120 kDa Signal in der Spur mit den löslichen Proteinen kann es sich möglicherweise ebenfalls, wie für *atToc159* beobachtet um die alleinige A-Domäne von *atToc132* handeln. Die 200 kDa Bande in der Membranspur vom WT wurde gleichfalls von der Harnstofffraktion des Antikörpers erkannt.

Mit der normalen ECL-Detektionslösung (2.14.16) war *atToc120* nur schwach zu detektieren, weshalb hier das sensitivere *ECL-Advance*-Detektionssystem von Amersham eingesetzt wurde. Aufgrund des sensitiven *ECL-Advance* ist nach der Immundetektion mit α Toc120A (Gly) ein starker Hintergrund zu sehen. Es sind jedoch Hauptbanden bei 110 kDa und 78 kDa in der Spur mit löslichen Proteinen aus dem WT und bei ca 170 kDa und 80 kDa in der Membranfraktion zu erkennen. Die 170 kDa Bande ist in der Membranfraktion der *atToc120*-Mutante nicht vorhanden, weshalb es sich sehr wahrscheinlich um ein spezifisches Signal handelt. Mit der Harnstofffraktion des Toc120A-Antikörpers ist nur die 170 kDa Bande in der M Spur des Wildtyps vorhanden.

Es konnte beobachtet werden, dass die Toc-Proteine *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* ausschließlich in den Membranfraktionen und nicht in der löslichen Fraktion enthalten sind. Obgleich von Hiltbrunner et al. (2001b) eine cytosolische Form von *atToc159* und *Toc159* aus Erbse nachgewiesen wurde, konnte diese nicht detektiert werden. Dies stimmt mit den Daten von Becker et al. (2004b) überein, die für das *Toc159*-Protein aus Erbse ebenfalls das Vorhandensein einer löslichen Form nicht bestätigen konnten.

Des Weiteren besitzen die Toc-Proteine in *Arabidopsis thaliana* folgende apparente Molekulargewichte: *atToc159*, 230 kDa; *atToc132*, 200 kDa und *atToc120*, 170 kDa. Alle Proteine laufen deutlich höher als nach ihrem berechneten Molekulargewicht zu erwarten wäre. Gleiches wurde auch schon für die A-Domänen beobachtet. Die Ursache dafür ist aber ungeklärt.

Für die folgenden Versuche wurde zum Nachweis von *atToc159* der A-Domänen-Antikörper eingesetzt, da er sensitiver als der G-Domänen-Antikörper ist und durchaus intaktes *atToc159* isoliert werden konnte. Es wurde die Glycinfraction des *Toc159A*-Antikörpers verwendet, da dieser sensitiver ist als die Harnstofffraktion. Gleiches gilt für α Toc132A, auch hier wurde die Glycinfraction eingesetzt. Nur für α Toc120A wurde die Harnstofffraktion eingesetzt, um die auftretenden starken Kreuzreaktionen mit der Glycinfraction des *Toc120A*-Antikörpers zu vermeiden.

3.2 Charakterisierung der Toc-Rezeptor-Mutanten *atToc159*, *atToc132* und *atToc120*

Um die jeweils spezifische Funktion von *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* weiter aufzuklären, bietet sich die Analyse von *Arabidopsis*-Nullmutanten an, welche das jeweilige Protein nicht mehr bilden. Sollten durch das Fehlen eines Rezeptorproteins bestimmte Vorstufenproteine in ihrem Import in die Chloroplasten betroffen sein, dann sollte dieses anhand ihres Phänotyps und dem veränderten Gehalt an kernkodierten Plastidenproteinen zu beobachten sein. Es ist ebenfalls möglich, dass der eingeschränkte Import von Vorstufenproteinen zu einer Regulation der Genexpression im Kern führt.

Zu Beginn der Arbeit lag nur eine T-DNA Insertionsmutante für *atToc159* (Gen Nr. At4g02510) im Ökotyp Wassilewskija (Ws-O) vor. Nach T-DNA Insertionen im *atToc132*- bzw. *atToc120*-Gen wurde zunächst in 1000er DNA-Pools von T-DNA Insertionsmutanten (in Kooperation mit Burkhard Schulz) mittels PCR gesucht. Auf diesem Wege konnten jedoch keine Mutanten isoliert werden.

Erst die Suche in Datenbanken von T-DNA Insertionsmutanten über die Internetseite <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress> führte zum Erfolg. Für *atToc120* mit der Gen Nr. At3g16620 wurden Samen der Salk-Linie N543456 vom „Nottingham Arabidopsis Stock Centre“ (NASC) bezogen (Alonso et al., 2003). Für *atToc132* (At2g16640) wurde zunächst ein RNAi-Konstrukt hergestellt, welches in Abschnitt 3.2.4 beschrieben ist, da erst zu einem späteren Zeitpunkt die T-DNA Linie 394E01, die im Rahmen des GABI-Kat Programms generiert wurde, zur Verfügung stand (Rosso et al., 2003). Beide T-DNA Insertionsmutanten liegen im Ökotyp Columbia (Col-0) vor. Die Lage der T-DNA Insertionen ist in der Abb. 3.8 zu sehen. Alle Insertionen liegen im kodierenden Bereich und sollten somit zu einem unterbrochenen Transkript führen, von dem kein vollständiges Protein translatiert werden kann.

3.2.1 Nachweis der T-DNA Insertionen

Die erhaltenen T-DNA Insertionsmutanten für *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* wurden zunächst auf das Vorhandensein der T-DNA im Zielgen und auf Homo- bzw. Heterozygotie überprüft.

In allen Mutanten kann nur mit einem *Borderprimer*, der sich am Rand der T-DNA befindet, und einem 5'- bzw. 3'-Genprimer ein Fragment mittels PCR amplifiziert werden, nicht aber mit den zwei Genprimern, wie in der Abb. 3.9 (A) für *atToc159* (B)

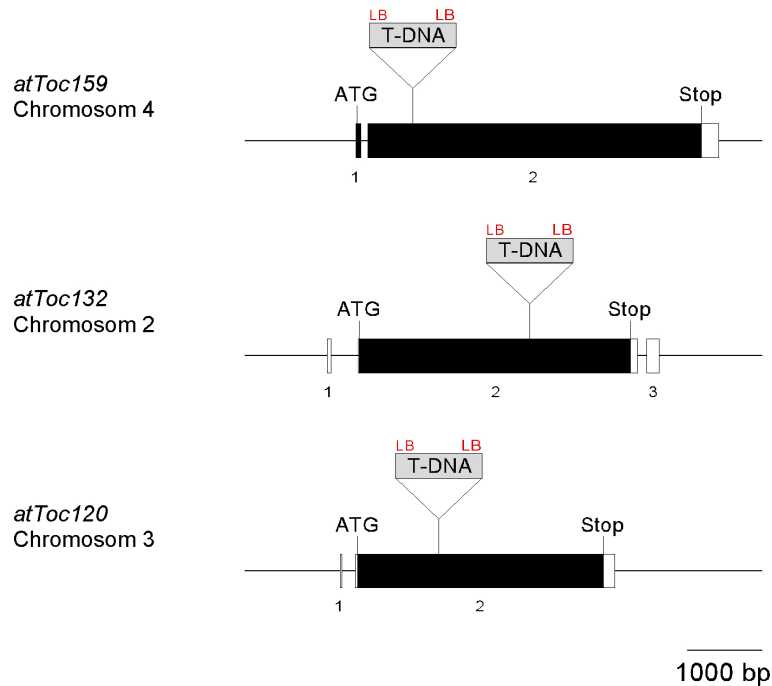


Abb. 3.8: T-DNA Insertionen. Maßstabsgetreue Genkarten von *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* mit entsprechenden T-DNA Insertionen (schematisch). Die Exons sind durch schwarze (kodierender Bereich) und weiße (5' und 3' UTR) Boxen dargestellt. LB steht für *Left border*.

für *atToc132* und (C) für *atToc120* gezeigt. Dies bedeutet, dass in den Mutanten kein WT-Gen mehr vorliegt, sondern nur zwei Kopien des Gens mit der T-DNA Insertion. Sie sind somit alle homozygot bezüglich der T-DNA Insertion.

Interessanterweise konnte kein Amplifikat mit dem *Rightborder*- (RB, am rechten Rand der T-DNA), sondern nur mit dem *Leftborder*-Primer (LB, am linken Rand der T-DNA) in Kombination mit dem 5'- bzw. 3'-Genprimer erhalten werden. Die PCR-Ergebnisse mit den LB-Primern sind in Abb. 3.9 gezeigt. Das bedeutet, dass bei allen Mutanten die T-DNA mindestens zweifach mit dem *Leftborder* außen liegend enthalten ist.

Nun musste noch ausgeschlossen werden, dass weitere T-DNA Insertionen in den Mutanten vorhanden sind, da nur dann die beobachteten Veränderungen in der Mutante auf das fehlende Gen zurückzuführen sind. Die *atToc159*-Mutante wurde schon von Bauer et al. (2000) beschrieben und enthält keine weiteren T-DNA Insertionen. Zum Nachweis der alleinigen T-DNA Insertion für *atToc132* und *atToc120* wurde eine Southernanalyse durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA aus WT und Mutante mit Restriktionsendonukleasen geschnitten und auf einem Agarosegel aufgetrennt. Anschließend wurden die Nukleinsäuren auf eine Nylon-Membran transferiert und mit einer Gensonde, die den Bereich der T-DNA Insertion umschließt, bzw. einer *Leftborder*-Sonde, die den linken

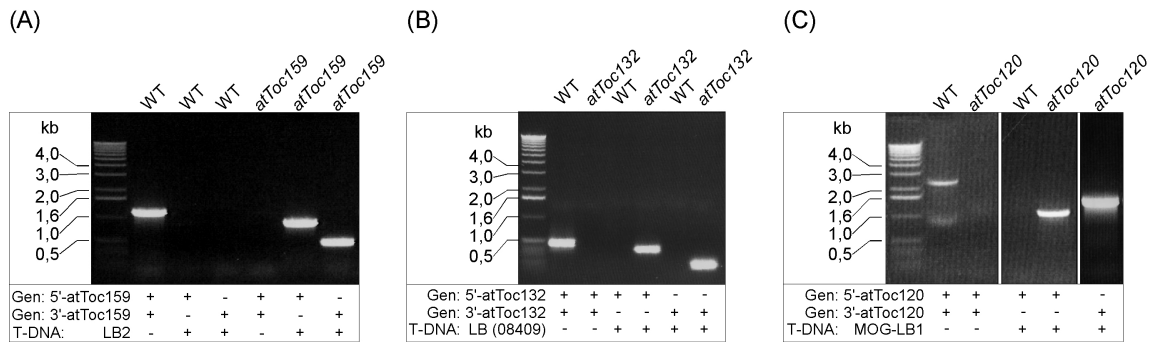


Abb. 3.9: Nachweis der Homozygotie. PCR auf genomischer WT- und Mutanten-DNA (jeweils oben angegeben) mit den 5'- und 3'-Genprimern bzw. mit einem Gen- und T-DNA-Primer (jeweils unten angegeben). Zu sehen ist das etidiumbromidgefärbte Agarosegel.

Bereich der T-DNA erkennt, hybridisiert.

In Abb. 3.10 sind die Ergebnisse der Southernanalyse für *atToc132* gezeigt. Im WT sind mit der Gensonde in jeder Spur zwei Banden zu detektieren, wobei eine Bande dem *atToc132*-Gen entspricht und die andere dem *atToc120*-Gen. Die Kreuzreaktion mit dem *atToc120*-Gen resultiert aus der hohen Homologie der Gene zueinander. Im Bereich der Gensonde sind sie zu 93% identisch. In Abb. 3.10 (B) und (C) sind schematische Restriktionskarten der *atToc132*- bzw. *atToc120*-Gene gezeigt, anhand derer sich die resultierenden Fragmentgrößen ablesen lassen, die als Tabelle in (D) zusammengefasst sind. Mit der *atToc132*-Gensonde können in der *atToc132*-Mutante neben dem *atToc120*-Gen (mit einem Dreieck markierte Banden) jeweils zwei weitere Banden detektiert werden, die dem *atToc132*-Gen entsprechen, da die T-DNA Insertion im Bereich der Gensonde liegt und die T-DNA Schnittstellen für alle drei Enzyme enthält. Die selben Fragmente lassen sich auch mit der LB-Sonde in der *atToc132*-Mutante detektieren. Die *atToc132*-Mutante enthält somit keine weiteren T-DNA Insertionen.

In Abb. 3.11 sind die Ergebnisse der Southernanalyse für *atToc120* dargestellt. Die für die Hybridisierung mit der *atToc120*-Gensonde erwarteten Banden (siehe Abb. 3.11, D) konnten alle nachgewiesen werden, auch wenn das kleine 1022 Basenpaar-Fragment, welches beim Verdau mit *NcoI* im WT entsteht, nur sehr schwer zu erkennen ist. Außerdem wurden Banden detektiert, die durch eine Kreuzreaktion mit dem *atToc132*-Gen entstehen. Sie sind in der Abb. 3.11 (A) mit einem Dreieck markiert. Es wurden aber nicht alle möglichen Kreuzreaktionen der *atToc120*-Gensonde (siehe Abb. 3.11, D) detektiert. So ist keine Kreuzreaktion in der Spur mit der *NcoI*-geschnittenen gDNA zu sehen. Mit der LB-Sonde konnten alle erwarteten Banden detektiert werden. Allerdings sind in jedem enzymatischen Verdau zwei bis drei weitere Banden sichtbar (mit einem Stern

markiert), was bedeutet, dass weitere unbekannte T-DNA Insertionen vorliegen. Dieses hat zur Konsequenz, dass im Falle eines veränderten Phänotyps dieser nicht ohne weitere Kontrollen (z. B. Komplementation oder Rückkreuzung mit dem WT) der T-DNA Insertion im *atToc120*-Gen zugeschrieben werden kann.

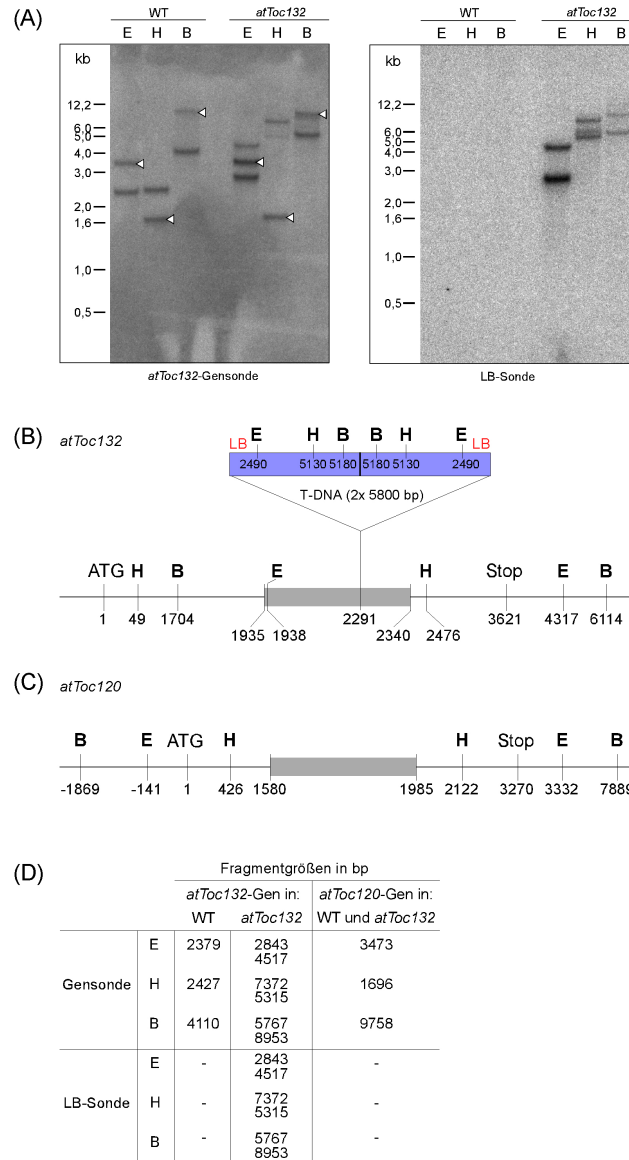


Abb. 3.10: Southernanalyse von *atToc132*. (A) Analyse der genomischen DNA vom WT und der *atToc132*-Mutante. Jede Spur enthält 10 μ g genomische DNA, die mit *EcoRI* (E), *HindIII* (H) oder *BamHI* (B) geschnitten wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit der *atToc132*-Gensonde bzw. der *Leftborder*-Sonde (LB). Die weißen Dreiecke markieren die Banden, die aus der Kreuzreaktion mit *atToc120* resultieren. (B) Schematische Restriktionskarte von *atToc132*. Angegeben sind die Positionen der Schnittstellen auf dem Gen und der T-DNA in Basenpaaren. Der Bereich der Gensonde ist grau hinterlegt. (C) Schematische Restriktionskarte von *atToc120*. Grau hinterlegt ist der Bereich, der eine hohe Homologie zur *atToc132*-Gensonde aufweist. (D) Übersicht über die entstehenden Fragmentgrößen.

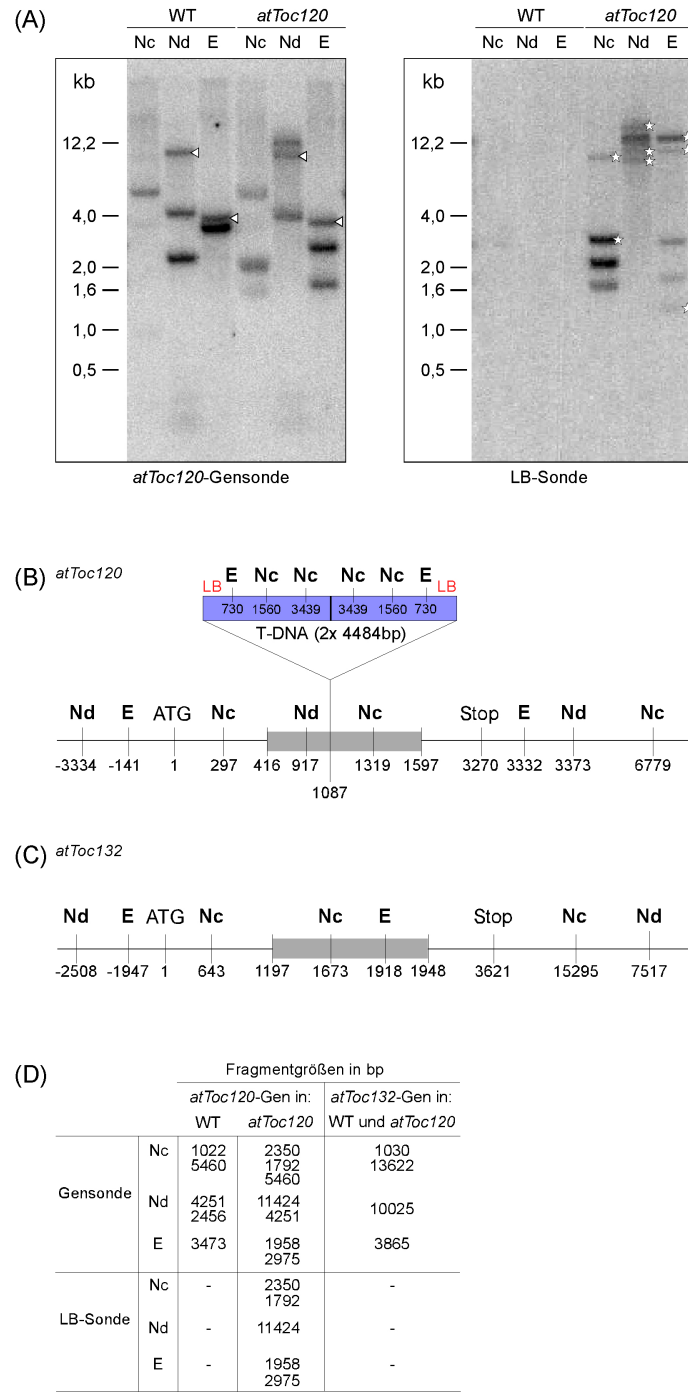


Abb. 3.11: Southernanalyse von *atToc120*. (A) Analyse der genomischen DNA vom WT und der *atToc120*-Mutante. Jede Spur enthält 10 μ g genomische DNA, die mit *Nco*I (Nc), *Nde*I (Nd) oder *Eco*RI (E) geschnitten wurde. Die Hybridisierung erfolgte mit der *atToc120*-Gensonde bzw. der *Leftborder*-Sonde (LB). Die weißen Dreiecke markieren die Banden, die durch die Kreuzreaktion mit *atToc132* entstehen. Mit Sternen markierte Banden zeigen weitere auftretende T-DNA Insertionen. (B) Schematische Restriktionskarte von *atToc120*. Angegeben sind die Positionen der Schnittstellen auf dem Gen und der T-DNA in Basenpaaren. Der Bereich der Gensonde ist grau hinterlegt. (C) Schematische Restriktionskarte von *atToc132*. Grau hinterlegt ist der Bereich, der eine hohe Homologie zur *atToc120*-Gensonde aufweist. (D) Übersicht über die entstehenden Fragmentgrößen.

3.2.2 Transkriptgehalte der Toc-Gene in den Toc-Rezeptor-Mutanten

Nachdem gezeigt wurde, dass die T-DNA Insertionen sich in den Zielgenen befinden, sollte nun überprüft werden, ob noch Transkripte gebildet werden.

Um dieses zu überprüfen wurde eine Northernanalyse durchgeführt. Dazu wurden jeweils 30 μg RNA aus WT- und Mutantepflanzen auf einem denaturierenden Agarosegel aufgetrennt und auf eine Nylonmembran transferiert. Nach der Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Gensonde waren im Autoradiogramm für *atToc159*- und *atToc132* verkürzte Transkripte nachweisbar (Abb. 3.12, 3.13), die ungefähr der Länge bis zur T-DNA Insertion entsprechen (ca. 1000 bzw. 2400 bp). Von diesen verkürzten Transkripten könnten Proteine der Größe 36 kDa (*atToc159*) bzw. 80 kDa (*atToc132*) entstehen. Derartige verkürzte Proteine wurden jedoch nicht in den Western Blots mit Proteinen der *atToc159*- bzw. *atToc132*-Mutante detektiert (siehe Abb. 3.7). Für die *atToc120*-Mutante wurde kein Northern Blot durchgeführt, da die *atToc120*-mRNA, aufgrund der geringen Expression, nur schwer zu detektieren ist. Stattdessen wurde die mRNA in cDNA umgeschrieben und als Matrize für eine PCR mit Genprimern verwendet. *AtToc120* konnte von der WT-cDNA, nicht aber von der *atToc120*-cDNA amplifiziert werden. Als Kontrolle wurde ebenfalls eine PCR mit Primern für das Aktin-Gen (*At3g18780*) durchgeführt, welches von beiden cDNAs amplifiziert werden konnte (Abb. 3.14). Bei allen drei Mutanten konnte weder ein Vollängen-Transkript noch ein Protein (siehe Abb. 3.7) nachgewiesen werden. Es handelt es sich somit um Nullmutanten.

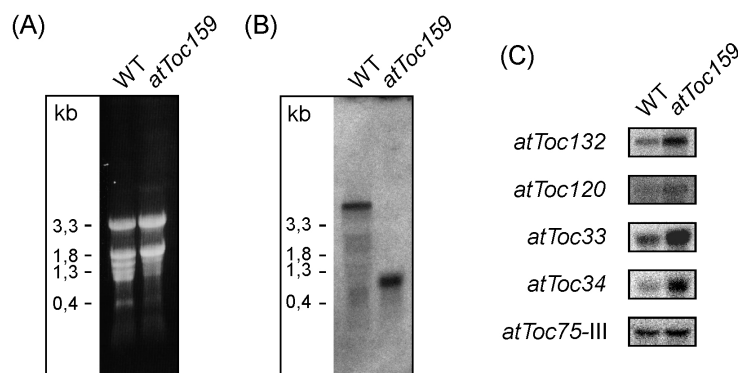


Abb. 3.12: Northernanalyse von *atToc159*. (A) Mit Ethidiumbromid gefärbtes, 1,5%iges RNA-Gel mit jeweils 30 μg RNA von WT und *atToc159*-Mutante. (B) Autoradiogramm nach der Hybridisierung mit der *atToc159*-Gensonde. (C) Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit den links angegebenen Sonden.

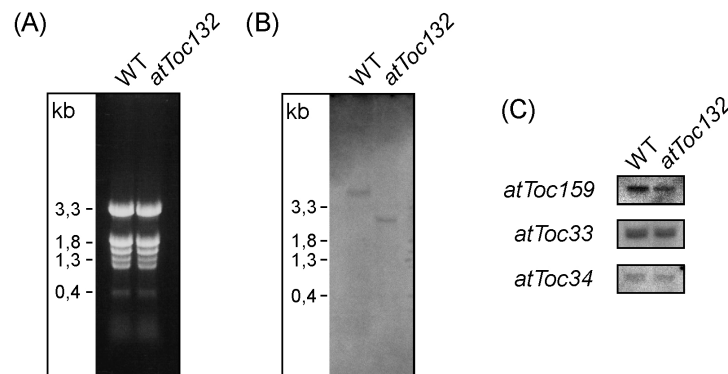


Abb. 3.13: Northernanalyse von *atToc132*. (A) Mit Ethidiumbromid gefärbtes, 1,5%iges RNA-Gel mit jeweils 30 μg RNA vom WT und *atToc132*-Mutante. (B) Autoradiogramm nach der Hybridisierung mit der *atToc132*-Gensonde. (C) Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit den links angegebenen Sonden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob es zu einer Genregulation der anderen Toc-Rezeptoren in den Toc-Rezeptor-Mutanten kommt. Dies lässt möglicherweise Rückschlüsse auf die Funktion der Rezeptoren zu. Dazu wurden die Transkriptgehalte von *atToc159*, *atToc132*, *atToc120*, sowie *atToc33* und *atToc34* und als Kontrolle *atToc75-III*, welches für die Translokationspore kodiert, mittels Northern Blot (Abb. 3.12, 3.13) oder *real-time* PCR ermittelt. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3.2 zusammengefasst. In der *atToc159*-Mutante ist der Transkriptgehalt der anderen Toc-Rezeptoren auf das 1,4 bis 2,8-fache vom WT erhöht. Dabei liegt von *atToc34* das 2,8- und von *atToc132* das 2,3-fache des Transkriptgehalts vor. Nur für *atToc75-III* findet keine Regulation auf Transkriptionsebene statt.

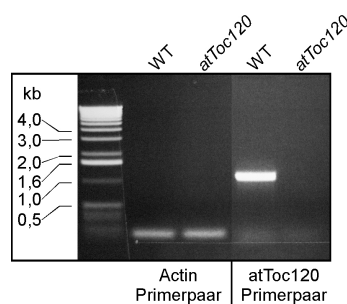


Abb. 3.14: RT-PCR auf *atToc120*. Aus WT und *atToc120* isolierte RNA wurde revers transkribiert und anschließend eine PCR mit Aktin- bzw. *atToc120*-Primern durchgeführt (Actin2-RT-F und Actin2-RT-R, Toc3RTfor und Toc3TGA). Zu sehen ist das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel.

In der *atToc132*-Mutante ist lediglich der Transkriptgehalt von *atToc120* signifikant auf das 2,9-fache erhöht. Die mittels *real-time* PCR ermittelten leichten Erhöhungen auf das 1,4-fache des Transkriptgehalts von *atToc159* und *atToc34* können nicht als signifikant angesehen werden, da diese Ergebnisse nicht im Northern Blot bestätigt wurden. *AtToc159*, *atToc34* sowie *atToc33* und *atToc75-III* liegen somit unverändert in ihrem Transkriptgehalt vor (siehe Abb. 3.13).

Die *atToc132*-mRNA ist in der *atToc120*-Mutante auf das 2,0-fache vom WT erhöht. Die Transkripte der anderen Toc-Gene sind unverändert. Für *atToc33* konnten keine Werte erhalten werden.

Die recht unterschiedliche Regulation der Transkription in den Toc-Rezeptormutanten lässt vermuten, dass es sich um eine gezielte Genregulation handelt, die durch das Fehlen einzelner Rezeptor-Proteine verursacht wird, möglicherweise um das Fehlen eben dieser Komponenten zu kompensieren. Ob der Transkriptgehalt sich auch in einem ebenso veränderten Proteingehalt widerspiegelt wird in Abschnitt 3.3.1 näher untersucht.

Tab. 3.2: Relativer Transkriptgehalt der Toc-Gene in den Toc-Rezeptormutanten. Angegeben ist der relative Transkriptgehalt in den Toc-Mutanten als n-fache Menge vom WT. Die Werte wurden durch Northern Blots oder *real-time* PCR (*) ermittelt.

	<i>atToc159</i> -Mutante	<i>atToc132</i> -Mutante	<i>atToc120</i> -Mutante
<i>atToc159</i>	-	0,8 / 1,4*	1,0*
<i>atToc132</i>	2,3	-	2,0*
<i>atToc120</i>	2,0	2,9*	-
<i>atToc33</i>	1,4	0,9	k. A.
<i>atToc34</i>	2,8	1,4*	0,7*
<i>atToc75-III</i>	1,1	1,2*	1,0*

3.2.3 Phänotyp der Toc-Rezeptor-Mutanten

Die *atToc159*-Mutante zeigt, wie schon von Bauer et al. (2000) beschrieben, einen albi-no Phänotyp. Dieses lässt auf einen Defekt in der Chloroplastenbiogenese schließen. Ihre Blätter sind schmäler als die des Wildtyps und sie zeigt kein photoautotrophes Wachstum, welches dazu führt, dass sie im Keimlingsstadium abstirbt.

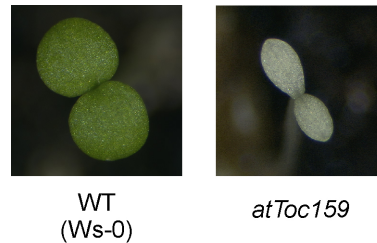


Abb. 3.15: Phänotyp von *atToc159* auf Erde. Gezeigt sind die auf Erde angezogenen Keimlinge einer WT- und *atToc159*-Pflanze.

In heterotropher Kultur ist die *atToc159*-Mutante jedoch lebensfähig. Die verschiedenen Entwicklungsstadien in Sterilkultur auf saccharosehaltigem Medium sind in Abb. 3.16 gezeigt. Vom weißlichen Keimling (A) über die leicht grünen Rosettenblätter einer 3 Wochen alten Pflanze (B) bis zur Bildung der Infloreszenz (C). Der Stengel ist hier grünlich und die Hochblätter weiß.



Abb. 3.16: Phänotyp von *atToc159* in verschiedenen Entwicklungsstadien. Auf saccharosehaltigem Medium angezogene Pflanzen. Gezeigt sind jeweils der WT (links) und die *atToc159*-Mutante (rechts) im Keimlingsstadium (A), als 3 Wochen alte Pflanzen (B) und der Stengel mit der Infloreszenz (C). Chlorophyllfluoreszenz eines WT- (D) und *atToc159*-Keimlings (E).

Ogleich der Keimling der *atToc159*-Mutante völlig weiß erscheint, ist eine Chlorophyllfluoreszenz vorhanden (siehe Abb. 3.16, E). Der Keimling enthält somit Chlorophyll, wenn auch in sehr viel geringeren Mengen als der WT (D).

Um zu sehen wie die Plastiden in der *atToc159*-Mutante aussehen, die für die Chlorophyllfluoreszenz und das leichte Ergrünen verantwortlich sind, wurde die Morphologie von Keimlingen und drei Wochen alten Rosettenblättern elektronenmikroskopisch analysiert. Die transmissionselektronenmikroskopischen (TEM) Aufnahmen wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Hause (Leiter der Abteilung für Bildgebende Verfahren, Biozentrum, MLU Halle) durchgeführt. Im TEM ist eindeutig zu erkennen, dass der Keimling

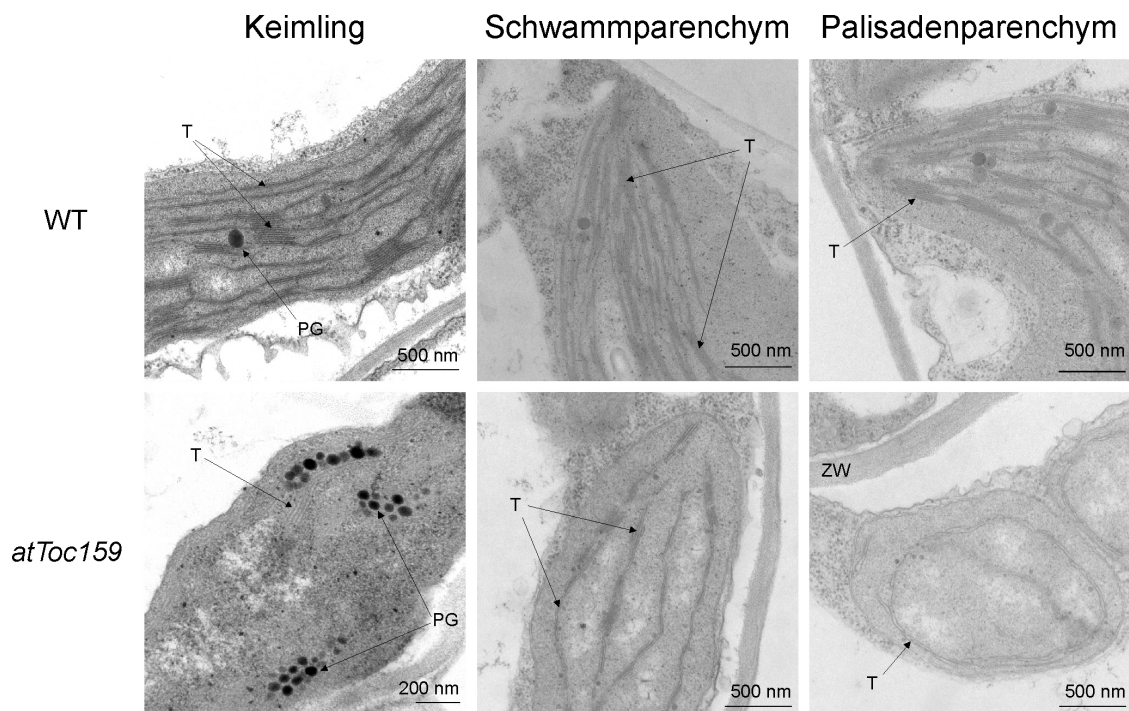


Abb. 3.17: TEM-Aufnahmen von *atToc159*. TEM-Bilder vom Keimling, sowie Schwamm- und Palisadenparenchym von 3 Wochen alten Rosettenblättern. T=Thylakoid, ZW=Zellwand, PG=Plastoglobuli

im Vergleich zum WT sehr kleine und undifferenzierte Plastiden besitzt (Abb. 3.17), wie auch schon von Bauer et al. (2000) beobachtet. Sie enthalten viele Plastoglobuli, die nach Lichtenthaler und Sprey (1966) größtenteils aus Lipiden bestehen. Es wird angenommen, dass sie als Membranspeicher während der Thylakoidbildung dienen. Es sind jedoch selbst hier einige thylakoidartige Strukturen zu sehen. Die Chloroplasten im Schwamm- und Palisadenparenchym der Rosettenblätter sind im Vergleich zum WT kleiner, tragen aber einige Thylakoide.

Es konnte somit gezeigt werden, dass in der *atToc159*-Mutante nicht nur undifferenzierte Plastiden vorliegen, sondern sich auch Chloroplasten mit Thylakoiden entwickeln. Diese tragen offensichtlich funktionsfähige Photosysteme, welche für die leichte Ergrünung der Pflanze verantwortlich sind.

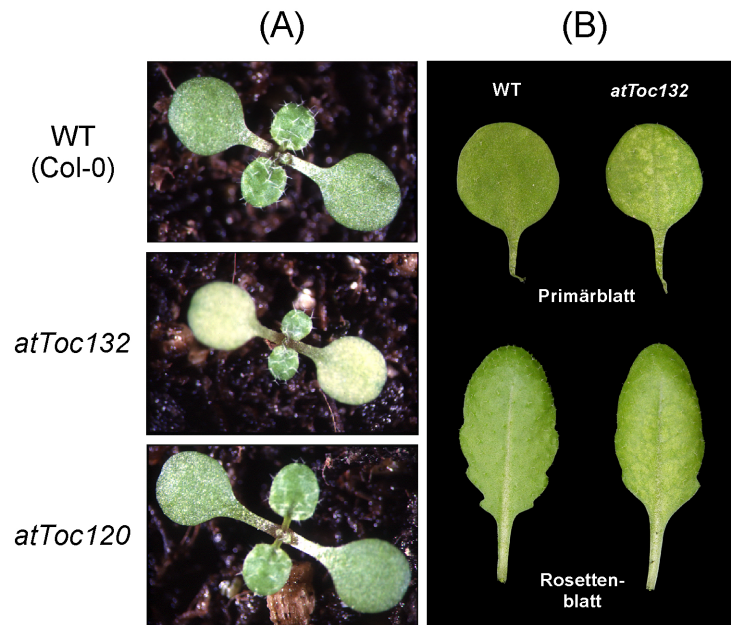


Abb. 3.18: Phänotyp von *atToc132* und *atToc120*. Auf Erde angezogene 10 Tage alte Pflanzen (A) sowie die Primär- und Rosettenblätter von 6 Wochen alten Pflanzen (B).

Die Phänotypen von *atToc132* und *atToc120* sind in Abb. 3.18 (A) zu sehen. Bei der *atToc132*-Mutante sind die Keimblätter (A) und später die Primär- und Rosettenblätter (B) leicht gelblich gescheckt, wobei die gescheckten Bereiche in einigen Fällen nur schwer zu erkennen waren. Dies ist möglicherweise auf unterschiedliche Wachstumsbedingungen zurückzuführen. Demgegenüber ist die *atToc120*-Mutante nicht vom WT zu unterscheiden.

AtToc159 und *atToc132* zeigen beide einen unterschiedlichen Phänotyp. Es ist daher anzunehmen, dass *atToc159* und *atToc132* unterschiedliche Funktionen haben. Da das Fehlen von *atToc120* in der *atToc120*-Mutante zu keinem veränderten Phänotyp führt, scheint seine Funktion von anderen Rezeptorproteinen übernommen zu werden. Es ist demzufolge mit dieser Mutante nicht möglich mehr Informationen über die Substrate von *atToc120* zu erfahren, weshalb nur *atToc159* und *atToc132* für weitere Analysen eingesetzt wurden.

3.2.4 Herstellung und Analyse von RNAi-Pflanzen für *atToc132*

Es wurden erst spät T-DNA Insertionsmutanten für *atToc132* gefunden. Daher wurde zuvor die RNA-Interferenz-Methode (RNAi) eingesetzt um posttranskriptionelles *Gensilencing* hervorzurufen (Fire et al., 1998; Cogoni und Macino, 2000). Die Methode beruht auf der Spaltung von dsRNA in der Zelle durch das Enzym Dicer in 21 bis 24 Nukleotid lange Moleküle, den sogenannten siRNAs (*short interference RNAs*). Die siRNAs bilden mit weiteren Proteinen den *RNA-induced silencing-Complex* welcher sequenz-spezifisch an die endogene mRNA bindet und diese abbaut (Baulcombe, 2004).

Es wurde, wie unter 2.16.2 beschrieben, ein binärer Vektor mit einem 339 bp langen *atToc132*-Fragment in Sense- und Antisenseorientierung unter dem CaMV 35S Promotor in *Arabidopsis thaliana* eingebracht.

Die Transformation und Selektion der Pflanzen erfolgte wie im Abschnitt 2.12.5 bzw. 2.12.6 angegeben. Die positiven Transformanten (T1-Generation) wurden auf Erde pikiert und die Samen geerntet. Von drei unabhängigen Linien (1,6,10) wurden die Nachkommen (T2-Generation) analysiert. In Abb. 3.19 sind die Phänotypen der Keimlinge im Vergleich zum WT gezeigt. Alle drei RNAi-Linien zeigen den leicht gelblichen Phänotyp, genau wie die *atToc132* T-DNA Insertionsmutante. Der Transkriptgehalt in den RNAi-Pflanzen ist im Vergleich zum WT um 84-90 % reduziert (3.19, C). In Folge dessen ist der

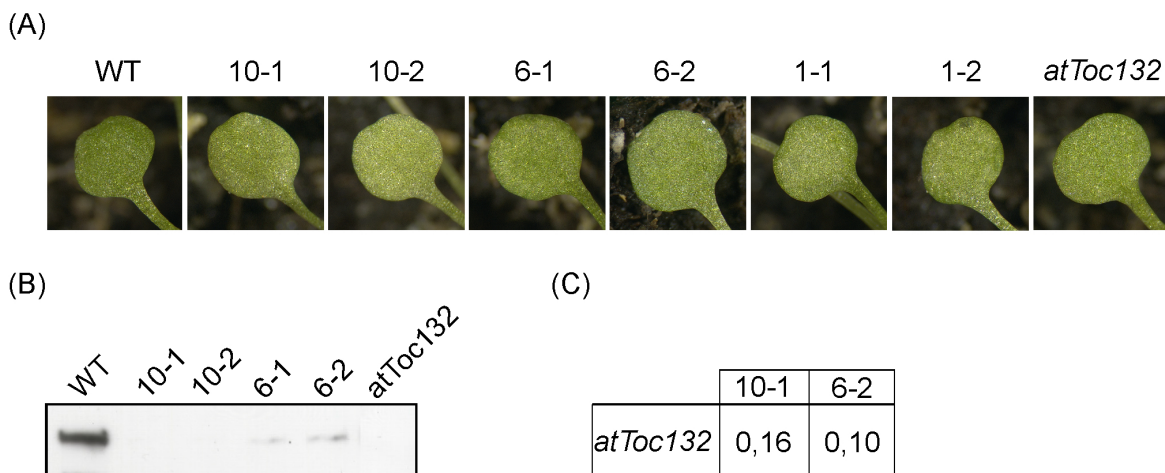


Abb. 3.19: Analyse der *atToc132*-RNAi-Pflanzen (A) Keimblätter vom WT, der *atToc132*-Mutante und der T2-Generation von drei unabhängigen RNAi-Linien. (B) Westernanalyse mit dem Toc132A-Antikörper auf den oben angegebenen Pflanzen. Es wurde die gleiche Menge an Gesamtprotein eingesetzt. (C) Mittels *real-time* PCR ermittelter relativer Transkriptgehalt, angegeben als n-faches vom WT.

Proteingehalt ebenfalls drastisch reduziert (B). Für die Pflanzen 10-1 und 10-2 ist der atToc132-Proteingehalt so gering, dass er bei dieser Exposition nicht mehr nachweisbar ist. In längeren Expositionen ist jedoch ein Signal zu sehen (nicht gezeigt).

Es konnten somit auf zwei unterschiedlichen Wegen (T-DNA Insertion im Gen, RNAi-Konstrukt) Mutanten für *atToc132* erhalten werden, die beide den selben Phänotyp zeigen. Da die RNAi-Pflanzen noch geringe Mengen des atToc132-Proteins exprimieren und die T-DNA Mutante trotz des defekten *atToc132*-Gens noch lebensfähig ist, wurde die T-DNA Mutante für die weiteren Untersuchungen eingesetzt.

3.2.5 Akkumulation plastidärer Proteine in den *atToc159*- und *atToc132*-Mutanten

Durch das Fehlen der Rezeptorproteine *atToc159* bzw. *atToc132* könnten kernkodierete Plastidenproteine in ihrem Import betroffen sein. Um dieses zu untersuchen wurde der Proteingehalt von kernkodierten Plastidenproteinen in den Mutanten *atToc159* bzw. *atToc132* genauer analysiert. Hierfür wurden gleiche Mengen an Gesamtprotein aus Rosettenblättern von 3-4 Wochen alten Pflanzen der *atToc159*- bzw. *atToc132*-Mutante und dem WT in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

Zunächst erfolgte eine Westernanalyse mit Antikörpern gegen photosynthetische Proteine. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.20 und 3.22 zu sehen. Alle untersuchten Proteine des PSII (A), PSI (B), LHCII (C) sowie weiterer an der Photosynthese beteiligter Proteine (D) sind in der *atToc159*-Mutante drastisch reduziert. Die Reduktion ist für OEC23 mit ca. 50 % vom WT am geringsten und für Lhcb₁ und Lhcb₂ mit weniger als 25 % vom

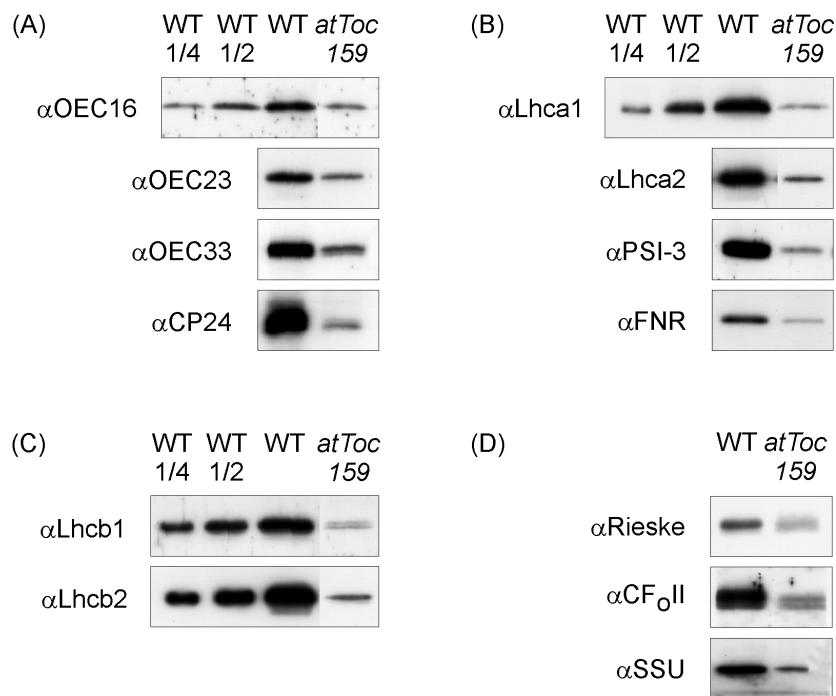


Abb. 3.20: Photosynthetische Proteine in *atToc159*. Es wurden jeweils gleiche Proteilmengen vom WT und der *atToc159*-Mutante, und zum Teil auch Verdünnungsreihen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Es wurden Antikörper gegen die Komponenten des PSII (A), PSI (B), LHCII (C) sowie weiteren an der Photosynthese beteiligten Proteinen (D) eingesetzt. Gezeigt sind die ECL-Filme der Westerndetektionen.

WT am höchsten. Die Proteine werden aber offensichtlich noch transportiert, denn sie liegen als reife Proteine vor. Vorstufenproteine konnten nicht nachgewiesen werden.

In der *atToc132*-Mutante konnten für die drei Untereinheiten des Wasserspaltungsapparates (OEC16, OEC23 und OEC33) und das chlorophyllbindende Apoprotein CP24 des PSII sowie für die Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase des PSI keine Veränderungen im Vergleich zum WT festgestellt werden (Abb. 3.22).

Neben den photosynthetischen Proteinen wurden auch nicht-photosynthetische, kernkodierte Proteine untersucht, wofür nur wenig unterschiedliche Antikörper zur Verfügung standen. Die Westernentwicklung der Glutamin-Synthetase wurde freundlicherweise von Bertrand Hirel (Unité de Nutrition Azotée des Plantes, Frankreich) durchgeführt. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.21 und 3.22 gezeigt. In der *atToc159*-Mutante sind einige Proteine gegenüber dem WT erhöht, welche alle an der Faltung, bzw. dem Abbau von Proteinen beteiligt sind, wie die Chaperone Cpn60 (α Hsp60) und Hsp70, sowie ClpP, der Protease-Untereinheit der chloroplastidären Clp-Protease (Peltier et al., 2001). Um ca. 50% reduziert liegt hingegen die plastidäre Glutamin-Synthetase vor (Abb. 3.21). Interessanterweise nimmt mit der Abnahme der plastidären Enzyms (45 kDa) die cytosolische Glutamin-Synthetase (40 kDa) zu. Ebenfalls reduziert liegt Hcf136 vor, welches

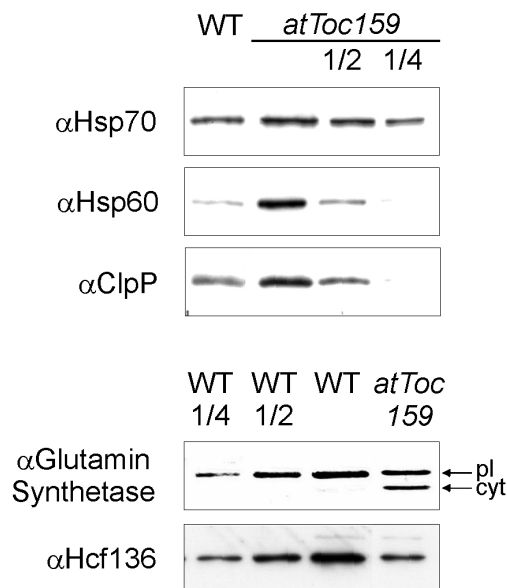


Abb. 3.21: Nicht-photosynthetische Proteine in *atToc159*. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen vom WT und der *atToc159*-Mutante, und zum Teil auch Verdünnungsreihen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Immundetektionen erfolgten mit den jeweils links angegebenen Antikörpern. Gezeigt sind die ECL-Filme der Westerndetektionen. pl=plastidär, cyt=cytosolisch

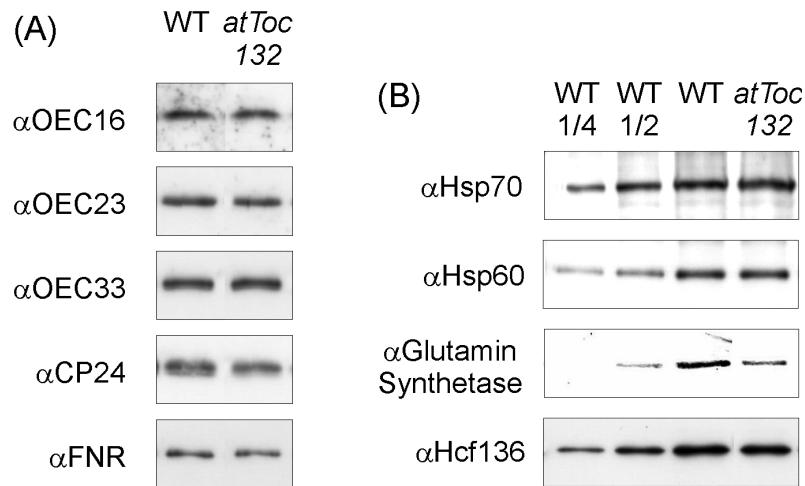


Abb. 3.22: Photosynthetische und nicht-photosynthetische Proteine in *atToc132*. Es wurden jeweils gleiche Proteinmengen vom WT bzw. und der *atToc132*-Mutante und, und zum Teil auch Verdünnungsreihen, in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die eingesetzten Antikörper gegen photosynthetische Proteine (A) und nicht-photosynthetische Proteine (B) sind jeweils links angegeben. Gezeigt sind die ECL-Filme der Westerndetektionen.

als Assemblierungs- und/oder Stabilitätsfaktor vom PSII beschrieben wurde (Meurer et al., 1998). Dieses zeigt, dass neben den ausnahmslos reduziert vorliegenden kernkodierten, photosynthetischen Proteinen auch weitere nicht-photosynthetische Proteine in der *atToc159*-Mutante nur in geringeren Mengen akkumulieren.

Die Ergebnisse für *atToc132* sind in Abb. 3.22 dargestellt. Im Gegensatz zur *atToc159*-Mutante ist der Gehalt der Chaperone Cpn60 und Hsp70 in *atToc132* unverändert. In reduzierten Mengen liegen, wie bei der *atToc159*-Mutante, Hcf136 und die Glutamin-Synthetase vor. Allerdings sind die beiden Proteine lediglich um ca. 25 % im Vergleich zum WT reduziert.

3.2.6 2D-Gelanalyse der *atToc159*-Mutante

Die Auswahl der zur Verfügung stehenden Antikörper war sehr begrenzt und zum größten Teil nur gegen photosynthetische Proteine gerichtet. Aus diesem Grund wurde, um einen besseren Überblick über die veränderten Proteingehalte in der Mutante zu erhalten, eine 2D-Gelanalyse durchgeführt. Nur die *atToc159*-Mutante wurde mit dieser Methode analysiert, da zeitgleich eine entsprechende Analyse für die *atToc132*-Mutante schon von der Gruppe um Paul Jarvis veröffentlicht wurde (Kubis et al., 2004). Durch einen Vergleich der beiden Analysen könnten Anhaltspunkte zu den möglichen Substraten der einzelnen Rezeptoren erhalten werden.

Es wurden lösliche Proteine (2.14.4) vom WT und der *atToc159*-Mutante in der 1. Dimension einer IEF (2.14.8) von pH 4 – 7 unterzogen und dann in der 2. Dimension mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Mit dieser Methode war es möglich ca. 500 Proteinspots aufzutrennen. Davon wurden 24 in der Mutante sichtbar veränderte Spots analysiert.

Die in der Mutante sichtbar veränderten Spots wurden mittels Massenspektrometrie bestimmt und ihre Zu- bzw. Abnahme mit dem Programm ImageMaster™2D Elite Version 3.10 (amersham pharmacia biotech) ermittelt. Dazu wurden aus je drei unabhängigen Gelpaaren (WT und Mutante) die vom Programm angegebenen Volumenwerte der Spots auf einen internen Standard (S) normalisiert. Hierfür wurde ein Spot ausgewählt, der im WT und der Mutante nahezu keine Veränderung zeigte. Die Normalisierung war aufgrund der unterschiedlich stark gefärbten Gele notwendig. Aus diesen normalisierten Volumenwerten wurde der n-fache Proteingehalt der Mutante im Vergleich zum WT und die Standardabweichung bestimmt. Ein Gelpaar ist in Abb. 3.23 exemplarisch gezeigt. Alle analysierten Spots sind markiert. Ihr Proteingehalt ist im Vergleich zum WT in Tabelle 3.3 angegeben.

Von den 24 analysierten Proteinspots waren 14 Spots im Vergleich zum WT reduziert und 10 Spots erhöht. Interessanterweise handelt es sich bei allen reduzierten Proteinen um kernkodierte Plastidenproteine, obgleich hier nicht nur plastidäre, sondern gesamtlösliche Proteine untersucht wurden. Bei den reduzierten Proteinen handelt es sich größtenteils um photosynthetische Proteine. Dazu gehören unter anderem die kleine Untereinheit der RubisCO und die 23 kDa Untereinheit des Wasserspaltungapparates (OEC23), welche auch schon in der Westernanalyse (Abb. 3.2.5) reduziert vorlagen, weshalb hier der verringerte Proteingehalt von OEC23, trotz der hohen Standardabweichung, als signifikant angesehen werden kann. Des Weiteren lagen mehrere Proteine des Calvin-Zyklus reduziert vor. Dazu gehören die Triosephosphat-Isomerase, 2 Isoformen der Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase, von denen die eine Isoform als ein Spot und die

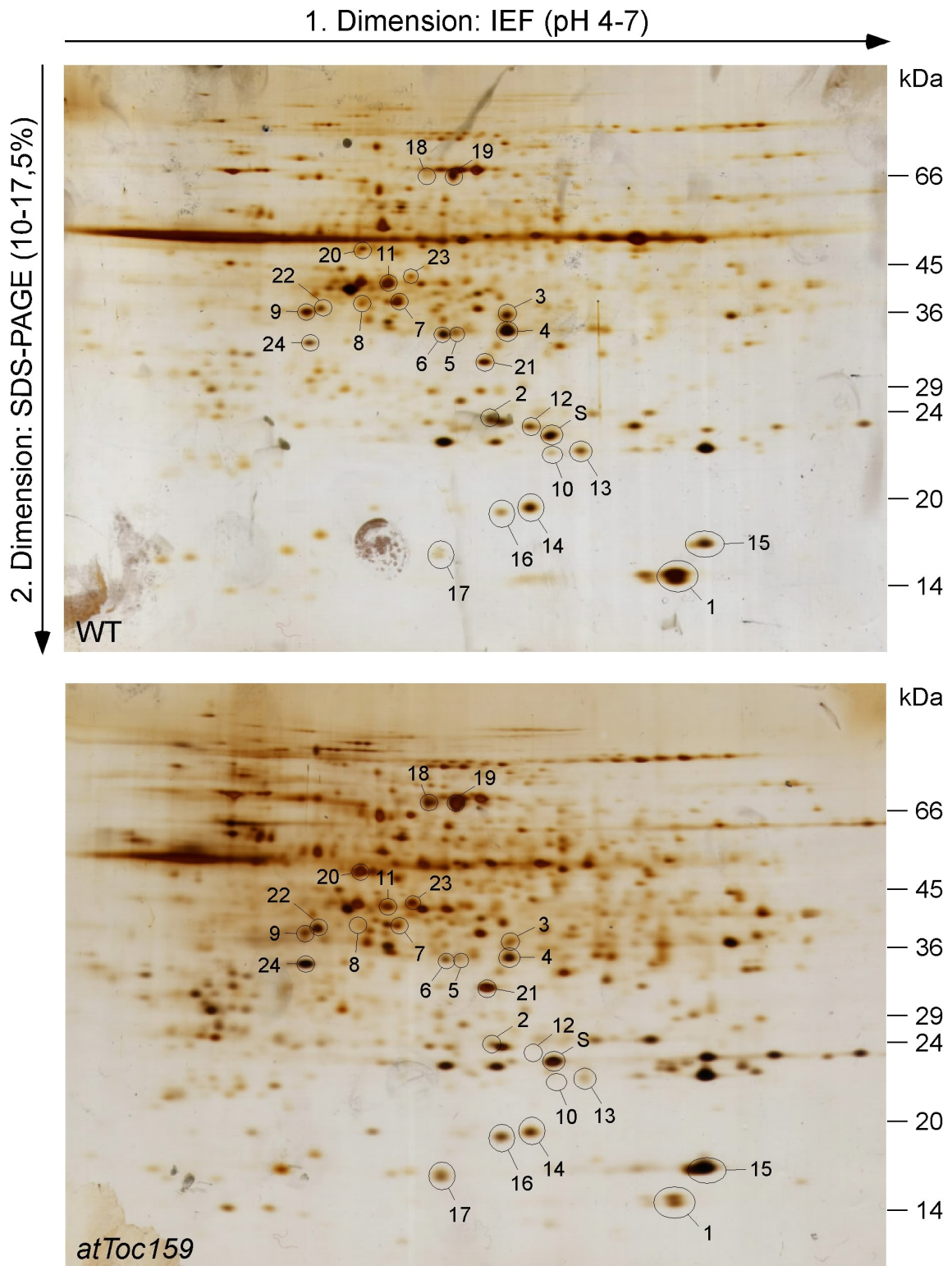


Abb. 3.23: 2D-Gele vom WT und *atToc159*. Es wurden jeweils 90 μg lösliche Proteine einer IEF von pH 4-7 unterzogen und anschließend in der 2. Dimension in einer 10-17,5%igen SDS-PAGE aufgetrennt. Gezeigt sind die silber gefärbten SDS-Gele. Die Zahlen geben die Spotnummern an. Als gelinterner Standard wurde das mit S markierte Protein gewählt.

andere Isoform in drei unterschiedlichen Spots nachweisbar war. Ebenfalls in zwei Spots war die Ribulosephosphat-Kinase und als ein Spot die Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase nachweisbar. Neben diesen sieben meist auf unter 50 % verringerten photosynthetischen Proteinen waren weitere 4 nicht unmittelbar an der Photosynthese beteiligte Proteine reduziert. Dazu zählt die plastidäre Glutamin-Synthetase, welche auch schon in der Westernanalyse (Abb. 3.21) in verringertem Gehalt in der Mutante nachweisbar war und an der Ammoniumassimilierung beteiligt ist. Ebenfalls in verminderter Menge liegt die Carboanhydrase vor, welche in einer Gleichgewichtsreaktion H_2O und CO_2 zu HCO_3^- und H^+ hydratisiert. Bei der im Vergleich zum WT um 70 % reduzierten Superoxid-Dismutase handelt es sich um das Schlüsselenzym für die Detoxifizierung von reaktiven Sauerstoffspezies. Als letztes Protein dieser Gruppe ist die Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase zu nennen, von der das 0,65-fache des Wildtyps in der *atToc159*-Mutante vorliegt.

Tab. 3.3: Durch 2D-Gele und Massenspektrometrie identifizierte Spots in der *atToc159*-Mutante.

Spot-Nr.	Gen-Nr.	n-fache vom WT	Protein (Genname)	Lokalisation
1	At5g38420	0,32 ± 0,09	RubisCO; kleine Untereinheit (<i>Rbcs-2B</i>)	Chloroplast
2	At2g21170	0,40 ± 0,25	Triosephosphat-Isomerase (<i>Tim</i>)	Chloroplast
3	At4g38970	0,41 ± 0,03	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase	Chloroplast
4	At4g38970	0,49 ± 0,02	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase	Chloroplast
5	At4g38970	0,58 ± 0,24	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase	Chloroplast
6	At2g21330	0,40 ± 0,02	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase	Chloroplast
7	At1g32060	0,27 ± 0,20	Ribulosephosphat-Kinase	Chloroplast
8	At1g32060	0,39 ± 0,28	Ribulosephosphat-Kinase	Chloroplast
9	At3g55800	0,51 ± 0,46	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	Chloroplast
10	At1g06680	0,77 ± 0,78	OEC23 (<i>PsbP1</i>)	Chloroplast
11	At5g35630	0,47 ± 0,06	Glutamin-Synthetase (<i>Gln2</i>)	Chloroplast
12	At3g01500	0,47 ± 0,33	Carboanhydrase (<i>Ca1</i>)	Chloroplast
13	At4g25100	0,29 ± 0,09	Superoxid-Dismutase [Fe] (<i>SodB</i>)	Chloroplast
14	At3g62030	0,65 ± 0,04	Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase (<i>Roc4</i>)	Chloroplast
15	At4g23670	1,39 ± 0,43	Major latex protein	Vakuole
16	At1g70890	1,32 ± 0,23	MLP-like protein 43 (<i>Mlp43</i>)	-
17	At2g01520	1,84 ± 0,59	MLP-like protein 328 (<i>Mlp328</i>)	-
18	At5g26000	1,67 ± 1,25	Myrosinase (<i>Tgg1</i>)	Vakuole
19	At5g26000	1,60 ± 0,10	Myrosinase (<i>Tgg1</i>)	Vakuole
20	At2g39310	2,30 ± 1,13	Myrosinase-binding protein-like	-
21	At3g16420	1,42 ± 0,17	Myrosinase-binding protein-like	-
22	At1g66200	1,32 ± 0,25	Glutamin-Synthetase (<i>Gln1-2</i>)	Cytosol
23	At3g14990	1,13 ± 0,43	ähnlich zu 4-methyl-5(β -hydroxyethyl)-thiazole monophosphat Biosyntheseenzym	-
24	At4g20260	3,19 ± 1,77	ähnlich zu DREPP	Plasmamembran

Sie gehört zu der Cyclophilin-Familie und ist an der Proteinfaltung beteiligt (He et al., 2004).

Zehn der 24 Spots zeigen in der Mutante im Vergleich zum WT einen erhöhten Proteingehalt. Für neun von ihnen konnte mittels TargetP (Emanuelsson et al., 2000), einem Programm zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation, keine plastidäre Lokalisation ausgemacht werden. Nur für ein Protein (At3g16420) wurde eine plastidäre Lokalisation, wenn auch nur mit einer sehr geringen Wahrscheinlichkeit, vorhergesagt. Die Erhöhungen der Proteingehalte wurden somit nicht direkt durch das Fehlen des Rezeptors verursacht. So dient die stärker akkumulierende cytosolische Glutamin-Synthetase möglicherweise zur Kompensation der verminderten plastidären Glutamin-Synthetase. Bei gleich drei Spots handelt es sich um Major Latex Proteine, deren Funktion noch unbekannt ist. Sie weisen aber große Ähnlichkeit zu den Pathogen-abhängigen-Proteinen (IPR oder PR10) auf, welche eine erhöhte Expression während Pathogen- und Stresseinwirkungen zeigen (Osmark et al., 1998). Für ein Major Latex Protein (At4g23670) konnte von Carter et al. (2004) gezeigt werden, dass es in der Vakuole lokalisiert ist. Ein weiteres Protein, das einen erhöhten Proteingehalt gegenüber dem WT aufweist, ist die Myrosinase, welche gleich in zwei Spots vorkommt, wobei nur für Spot 19 eine signifikante Erhöhung vorliegt. Das Enzym katalysiert die Hydrolyse von Glucosinolaten in für viele Mikroorganismen und Herbivoren toxische Verbindungen (Husebye et al., 2002). Es liegt ebenfalls in der Vakuole vor (Carter et al., 2004). Es wurden auch zwei Myrosinase-Bindeproteine gefunden, welche zusammen mit der Myrosinase nach der Verwundung einen Komplex bilden (Eriksson et al., 2002). Bei der Spotauswahl wurden optisch sichtbar veränderte Spots ausgewählt. Im Fall des Proteins von Spot 23, welches an der Thiaminbiosynthese beteiligt ist, konnte nach der Quantifizierung keine signifikante Erhöhung festgestellt werden. Beim letzten erhöhten Spot handelt es sich um ein Protein aus der Familie der entwicklungsabhängig regulierten Plasmamembran Polypeptide (DREPP), dessen Funktion noch unbekannt ist (Logan et al., 1997).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass von den 24 analysierten Spots 14 in der Mutante reduziert sind. Dabei handelt es sich um 11 unterschiedliche, kernkodierte Plastidenproteine, von denen 7 photosynthetische und 4 nicht-photosynthetische Funktionen aufweisen. Des Weiteren sind 9 Spots in der Mutante erhöht und 1 unverändert. Alle erhöhten Spots sind nicht-plastidär und haben größtenteils eine Funktion während Stresssituationen.

3.2.7 DNA-Array der *atToc159*-Mutante

Die Western- und 2D-Gelanalyse (Kapitel 3.2.5, 3.2.6) hat gezeigt, dass das Fehlen von *atToc159* zu einem reduzierten Gehalt an bestimmten kernkodierten Plastidenproteinen führt. Nun stellt sich die Frage, wie sich der Transkriptgehalt dieser Proteine in der Mutante verhält, und ob es möglich ist anhand dieser beobachteten Veränderung weitere potentielle Substrate von *atToc159* zu identifizieren. Dazu wurden die mRNA-Gehalte von kernkodierten Plastidenproteinen in einem DNA-Array untersucht.

Die Analyse erfolgte mit jeweils drei unabhängigen Gesamt-RNA-Proben aus 4 Wochen alten Pflanzen (WT und *atToc159*-Mutante), die nach der Reversen Transkription als Sonde für die Hybridisierung von je drei Nylonmembranen eingesetzt wurden (Kurth et al., 2002; Richly et al., 2003). Auf die Nylonmembran waren 3292 *gene-specific tags* (GSTs) aufgespottet. 81 % der repräsentierten Gene kodieren für plastidäre und 19 % für nicht-plastidäre Proteine. Die cDNA-Synthese, sowie die Hybridisierung der Membranen erfolgte in Kooperation mit Alexander Biehl und Dario Leister (Max-Planck-Institut für Züchtungsforschung, Köln).

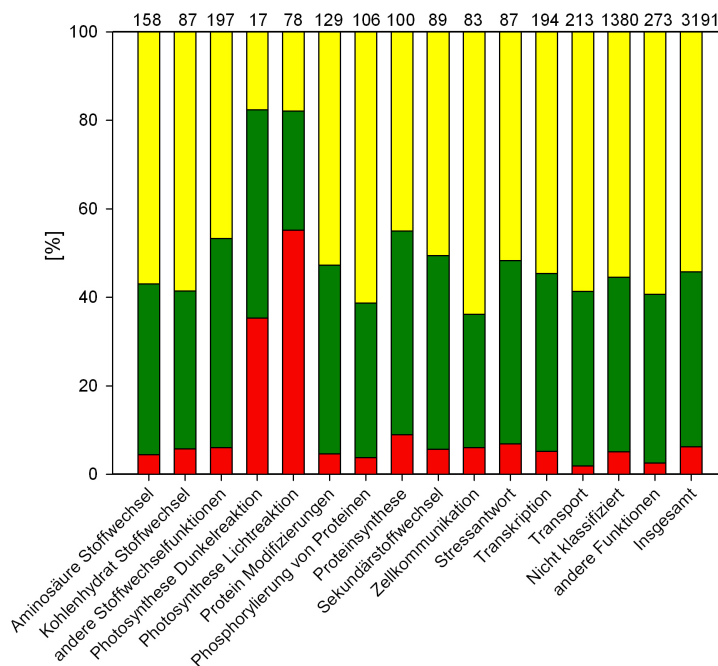


Abb. 3.24: Graphische Darstellung des DNA-Arrays von *atToc159*. Gezeigt sind die Veränderungen des Transkriptgehaltes in der *atToc159*-Mutante. Die Gene wurden in Gruppen zusammengefaßt und die jeweiligen Veränderungen in Prozent als Säule dargestellt (hochreguliert = gelb, unverändert = grün, runterreguliert = rot). Die Gesamtzahl der Gene ist jeweils über dem Diagramm angegeben.

Von den 3292 untersuchten Genen zeigten 3191 eindeutige Hybridisierungssignale. Davon waren 1261 (39,5 %) Gene im Vergleich zum WT unverändert, 1731 (54,3 %) hoch- und 199 (6,2 %) runterreguliert. Neben der Gesamtverteilung, wie im Diagramm in Abbildung 3.24 zu sehen, erfolgte auch eine Einteilung in 15 funktionelle Gruppen. Interessanterweise zeigen 13 der 15 Gruppen eine ähnliche Expressionsverteilung. So sind bei allen 13 durchschnittlich 55 % der Gene hochreguliert, 40 % unverändert und 5 % runterreguliert. Im Gegensatz dazu sind in den übrigen zwei Gruppen, der Licht- und Dunkelreaktion der Photosynthese, nur durchschnittlich 18 % hochreguliert, 37 % unverändert und 45 % in ihrer Expression im Vergleich zum WT reduziert.

In Tabelle 3.4 auf Seite 81 sind Gene aufgeführt, die aufgrund ihrer Expression, ihrer besonderen Funktion oder weil sie ebenfalls in der Western- bzw. 2D-Gelanalyse untersucht wurden, exemplarisch ausgewählt wurden. Bereits untersuchte Proteine (17 Stück), welche einen verringerten Proteingehalt in der Western- bzw. 2D-Gelanalyse gegenüber dem WT zeigten, sind in der Tabelle mit einem Stern (*) markiert. Von ihnen weisen 10 einen verringerten und 7 einen unveränderten Transkriptgehalt gegenüber dem WT auf. Auffällig ist, dass 9 der 10 in der Mutante reduzierten Gene (Ausnahme: At2g21330, Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase) im WT hohe Signalintensitäten, d. h. Transkriptgehalte (2,08 - 30,87) aufweisen. Das gleiche Bild zeigt sich beim Vergleich der Signalintensitäten aller Gene des Arrays. So liegen die Signalintensitäten der reduzierten Gene durchschnittlich bei 4,91. Im Vergleich dazu liegen die Signalintensitäten der unveränderten und hochregulierten Gene durchschnittlich bei 1,04 bzw. 0,75. Es scheint, dass vorwiegend die normalerweise stark exprimierten Gene in der *atToc159*-Mutante herabreguliert wurden.

Interessant ist, dass die Transkripte für verschiedene Untereinheiten des gleichen Komplexes sowohl hoch als auch runterreguliert vorliegen. Dieses ist für die 50S- und 30S-ribosomalen Untereinheiten zu beobachten. Gleiches gilt für die Transkripte von Genen, die für Proteine der Aminosäuresynthese bzw. Fettsäuresynthese kodieren.

Der Transkriptgehalt von Cpn60, Hsp70 und ClpP ist in der *atToc159*-Mutante im Vergleich zum WT erhöht und führt auch zu einer höheren Proteinmenge, wie in der Westernanalyse (3.2.5) gezeigt wurde. Da diese Proteine offensichtlich in der Mutante akkumulieren, ist davon auszugehen, dass sie ganz normal importiert wurden und es sich bei ihnen nicht um Substrate von *atToc159* handelt. Ihr gegenüber dem WT erhöhter Transkriptgehalt ist somit nicht direkt auf das Fehlen von *atToc159* zurückzuführen. Es handelt sich vermutlich um einen sekundären Effekt, der durch das Fehlen anderer plastidärer Proteine hervorgerufen wurde. Für die drei Proteine Hsp70, Cpn60 und

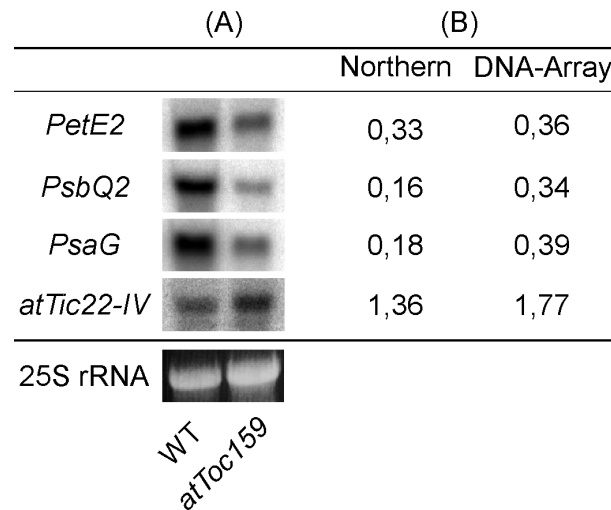


Abb. 3.25: Kontroll-Northern zum DNA-Array von *atToc159*. (A) Gezeigt sind die Autoradiogramme nach der Hybridisierung mit den links angegebenen Sonden. (B) Vergleich der Werte vom DNA-Array mit den durchgeführten Northern Blots. Angegeben ist der Transkriptgehalt in der *atToc159*-Mutante als n-fache Menge vom WT.

ClpP macht dieses durchaus Sinn, denn sie sind alle an der Faltung bzw. dem Abbau von Proteinen beteiligt. Sie werden wahrscheinlich benötigt, da importierte Proteine, die aufgrund fehlender Komplexpartner nicht gefaltet werden können, vermutlich länger mit Chaperonen verbunden bleiben, oder aber abgebaut werden.

Um die Ergebnisse der Array-Analyse zu überprüfen, wurde RNA aus dem WT- und der *atToc159*-Mutante isoliert und eine Northernanalyse durchgeführt. Wie in Abbildung 3.25 zu sehen ist, wurden vier Transkriptgehalte von kernkodierten Plastidenproteinen untersucht. Darunter drei Gene, die im Array eine Herabregulation zeigten (*PetE2*, *PsbQ2*, *PsaG*) und ein hochreguliertes Gen (*atTic22-IV*). Für alle vier Gene konnte die Zu- bzw. Abnahme der Transkriptmenge bestätigt werden.

Tab. 3.4: Übersicht über die veränderten Transkriptgehalte in der *atToc159*-Mutante. Transkriptwerte, die gegenüber dem WT nicht signifikant verändert waren sind mit (-) gekennzeichnet. Für weitere Details, siehe Text.

Gruppe/ Gen-Nr.	n-faches vom WT	Signal- intensität im WT	Genname/Produkt	Funktion
Photosynthese				
At4g05180*	0,34	2,23	<i>PsbQ2</i> , OEC16	Photosystem II
At1g06680*	0,40	3,70	<i>PsbP1</i> , OEC23	Photosystem II
At5g66570*	0,57	3,36	<i>PsbO1</i> , OEC33	Photosystem II
At1g15820*	-	1,20	<i>Lhcb6</i> , CP24	Photosystem II
At1g29910*	0,14	21,01	<i>Lhcb1.2</i> , Lhcb1	LHC II
At1g31330*	0,59	2,50	<i>PsaF</i> , PSI-3	Photosystem I
At1g55670	0,39	2,52	<i>PsaG</i> , PSI-G	Photosystem I
At1g20340	0,37	4,26	<i>PetE2</i> , Plastocyanin	Photosystem I
At3g54890*	0,20	11,93	<i>Lhca1</i> , Lhca1	LHC I
At3g61470*	0,51	2,08	<i>Lhca2</i> , Lhca2	LHC I
At4g32260*	-	1,25	<i>AtpG</i> , CFoII	ATP-Synthese
At5g38420*	0,32	30,87	<i>Rbcs-2B</i> , RubisCO, kleine Untereinheit	Calvin-Zyklus
At2g21330*	0,77	0,60	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase	Calvin-Zyklus
At4g38970*	-	1,59	Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase	Calvin-Zyklus
At3g55800*	-	0,64	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	Calvin-Zyklus
At1g32060*	-	0,57	Ribulosephosphat-Kinase	Calvin-Zyklus
Metabolismus				
At1g32900	1,22	0,52	<i>Waxy</i> , Stärke Synthase I	Stärkesynthese
At5g03650	1,35	0,64	1,4- α -Glucan-Verzweigungsenzym	Stärkesynthese
At5g04360	1,46	0,65	α -Amylase	Stärkeabbau
At4g00490	1,41	0,35	β -Amylase	Stärkeabbau
At1g75330	2,71	0,06	<i>Otc</i> , Ornithin Carbamoyltransferase	Aminosäuresynthese
At1g18500	2,41	0,04	2-Isopropyl Malatsynthase	Aminosäuresynthese
At1g31230	0,67	1,63	Aspartat Kinase	Aminosäuresynthese
At5g17990	0,58	3,50	Anthranilat Phosphoribosyltransferase	Aminosäuresynthese
At5g16390	1,67	0,08	Acetyl-CoA Carboxylase	Fettsäuresynthese
At1g62640	0,36	24,10	3-Ketoacyl-ACP Synthase III	Fettsäuresynthese
At2g15620	1,30	2,20	<i>Nir1</i> , Nitritreduktase	N-Fixierung
At5g35630*	-	1,88	<i>Gln2</i> , Glutamin-Synthetase	N-Fixierung
At5g36790	0,49	0,76	Phosphoglycolat Phosphatase	Photorespiration
At3g01500*	0,21	2,18	<i>Ca1</i> , Carboanhydrase	CO ₂ -Aufnahme
Transkription/Translation				
At1g34380	1,55	0,50	DNA-Polymerase	DNA-Replikation

Gruppe/ Gen-Nr.	n-faches vom WT	Signal- intensität im WT	Genname/Produkt	Funktion
At1g64860	1,40	0,90	<i>Sig1</i> , Sigma Faktor 1	Transkription
At2g24120	1,30	2,19	<i>Rpo T3</i> , RNA-Polymerase	Transkription
At1g78630	2,94	0,07	<i>RpL13</i> , 50S ribosomales Protein L13	Translation
At2g38140	2,30	0,04	<i>RpS31</i> , 30S ribosomales Protein S31	Translation
At5g54600	0,38	16,72	<i>RpL24</i> , 50S ribosomales Protein L24	Translation
At2g33800	0,39	12,64	<i>RpS5</i> , 30S ribosomales Protein S5	Translation
At4g20360	-	0,56	Elongationsfaktor Tu	Translation
Proteintransport				
At1g04940	1,42	0,59	atTic20-I	Proteinimport
At1g06950	1,25	0,64	atTic110	Proteinimport
At5g16620	-	0,25	atTic40	Proteinimport
At5g03940	1,48	0,21	cpSRP54	SRP-Transportweg
At2g45770	1,60	0,80	cpFtsY (SRP-Rezeptor)	SRP-Transportweg
At1g21650	1,49	0,10	SecA	Sec-Transportweg
At2g18710	1,43	0,23	SecY	Sec-Transportweg
At5g28750	-	0,16	TatA	Tat-Transportweg
At5g52440	-	0,43	TatB	Tat-Transportweg
Proteinfaltung und -abbau				
At1g55490	1,49	0,06	Cpn60 β	Chaperonin
At5g20720	1,52	0,59	Cpn21	Chaperonin
At2g22360	2,32	0,15	DnaJ-Homolog	Chaperon
At4g24280	1,33	0,57	Hsp70-Homolog	Chaperon
At5g17710	1,45	0,62	GrpE	Chaperon
At3g62030*	-	0,41	<i>Roc4</i> , Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase	Proteinfaltung
At5g45390	1,41	0,37	ClpP	Proteinabbau
At5g53170	1,45	0,65	FtsH-Protease	Proteinabbau

3.3 Analyse der Toc-Komplexe

Für den Toc-Komplex aus Erbse wurde mittels Größenausschlußchromatographie gezeigt, dass er ca. 500 kDa groß ist und sich aus Toc159, Toc34 und Toc75 zusammensetzt (Schleiff et al., 2003b). Da in *Arabidopsis thaliana* gleich mehrere homologe Vertreter der Rezeptorkomponenten Toc159 und Toc34 vorhanden sind, stellt sich die Frage, wie hier die Größe und Zusammensetzung des bzw. der Toc-Komplexe/s ist.

Um die Größe der Komplexe zu analysieren wurde die *Blue native*-PAGE gewählt (Schägger und von Jagow, 1991; Schägger et al., 1994). Hierbei handelt es sich um ein Gelsystem welches native Proteinkomplexe aufgrund ihres Molekulargewichts auftrennt. Laut Schägger et al. (1994) erfolgt in der BN-PAGE eine höhere Auflösung der Proteinkomplexe als mit einer Dichtegradientenzentrifugation oder Gelfiltration möglich wäre. Darüber hinaus ist eine Größenabschätzung der Komplexe möglich.

Zur Untersuchung der Zusammensetzung sollten die erhaltenen Komplexe in der 2. Dimension auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und die Toc-Komponenten durch eine Westernanalyse nachgewiesen werden.

Neben den drei charakterisierten Mutanten (*atToc159*, *atToc132*, *atToc120*) standen auch die Mutanten für die beiden Rezeptoren *atToc33* und *atToc34* zur Verfügung, welche zur weiteren Analyse der Komplexe mit herangezogen wurden. Die Untersuchung aller Mutanten kann möglicherweise mehr Hinweise auf die Zusammensetzung der Toc-Komplexe geben. Zum einem über den Vergleich der Toc-Proteingehalte in den Mutanten, denn möglicherweise führt das Fehlen einer Rezeptorkomponente zum Fehlen oder aber erhöhtem Gehalt einer anderen Komponente. Zum anderen könnte das Fehlen einer Rezeptorkomponente zu einer Größenveränderung des Toc-Komplexes in der BN-PAGE führen.

3.3.1 Vergleich der Toc-Proteingehalte in den Toc-Rezeptor-Mutanten

Zunächst wurde untersucht, wie sich das Fehlen einer Rezeptorkomponente auf den Proteingehalt der anderen Rezeptoren auswirkt. Dazu wurden Gesamtmembranen aus Rosettenblättern von allen Toc-Rezeptormutanten isoliert und die Membranproteine entsprechend der gleichen Menge Frischgewicht mittels SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert.

Die Ergebnisse der Westernanalyse sind in Abb. 3.26 zu sehen. Wie schon für die *atToc159*- *atToc132*- und *atToc120*-Antikörper gezeigt, sind auch die Antikörper für

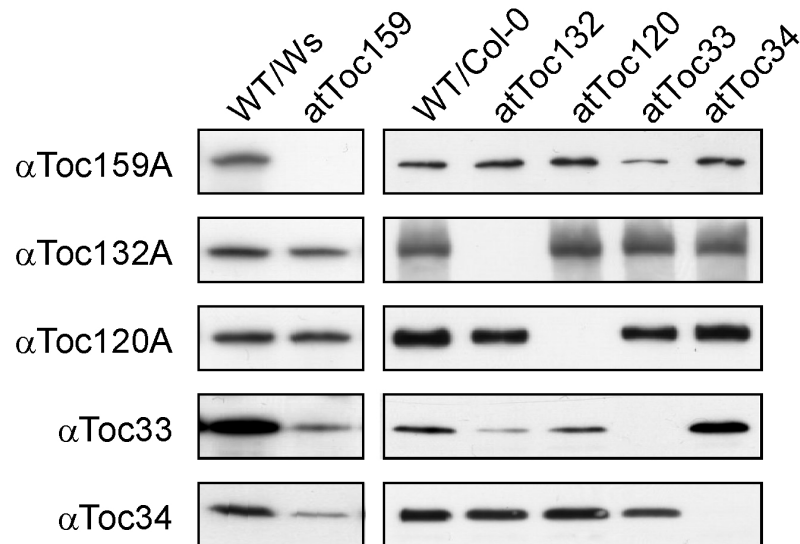


Abb. 3.26: Toc-Proteine in den Toc-Rezeptor-Mutanten. Gesamtmembranproteine aus der gleichen Menge Rosettenblättern von den über der Abbildung angegebenen Pflanzen wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Gezeigt sind die ECL-Filme der Immundetektionen mit den links angegebenen Antikörpern.

atToc33 und atToc34 spezifisch für ihr Antigen. Von Voigt et al. (2005) wurde beobachtet, dass der Toc34-Antikörper auch eine geringe Kreuzreaktion zum atToc33-Protein aufweist, doch diese ist hier nicht zu sehen.

In der *atToc159*-Mutante ist der Gehalt an atToc33 und atToc34 auf unter 50 % im Vergleich zum WT reduziert wogegen atToc132 und atToc120 nahezu unverändert vorliegen. In der *atToc132*-Mutante sind atToc120 sowie atToc33 und atToc34 gegenüber dem WT leicht verringert. Dagegen ist in der *atToc120*-Mutante keine signifikante Veränderung festzustellen. Sowohl atToc159 als auch atToc34 und atToc120 liegen in der *atToc33*-Mutante in reduzierten Mengen vor. Die einzige Veränderung in der *atToc34*-Mutante ist die Erhöhung von atToc33.

Es konnten bis auf atToc33 in der *atToc34*-Mutante keine Erhöhungen anderer Rezeptorproteine in den Mutanten beobachtet werden, die möglicherweise zur Kompensation der fehlenden Rezeptoren dienen. Dieses steht im Gegensatz zu den oftmals beobachteten erhöhten Transkriptmengen der jeweils anderen Rezeptoren in den *atToc159*, *atToc132* und *atToc120*-Mutanten (siehe Tab. 3.2). Stattdessen ist zu beobachten, dass das Fehlen eines Rezeptors zur gleichzeitigen Abnahme eines anderen Rezeptors führt. So ist in der *atToc159*-Mutante das atToc33-Protein und umgekehrt in der *atToc33*-Mutante das atToc159-Protein reduziert. Dies weist darauf hin, dass atToc159 und atToc33 zusammen einen Komplex bilden.

3.3.2 Auftrennung von Toc-Komplexen mittels BN-PAGE

Für die Auftrennung der Toc-Komplexe mussten zunächst die Bedingungen der Membranisolation und *Blue native*-PAGE optimiert werden, um die Proteine nachweisen zu können. Zunächst sollten Chloroplasten isoliert und nach erfolgter Lyse die Hüllmembranen fraktioniert werden. Da die Expression von atToc33 und atToc34 nachweislich in jungen Blättern am größten ist (Jarvis et al., 1998), ist anzunehmen, dass die Expression der anderen Toc-Rezeptoren in diesem Gewebe ebenfalls hoch ist. Aufgrund dessen sollten Chloroplasten aus jungen Pflanzen isoliert werden. Die jungen, kleinen *Arabidopsis*-Pflanzen ließen sich im *Waring Blender* nur sehr schwer zerkleinern. Leider war es nicht möglich Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren, ohne dabei die empfindliche cytosolische Domäne von atToc159, wogegen der Toc159A-Antikörper gerichtet ist, zu beschädigen. Es wäre möglich gewesen atToc159 mit dem Antikörper, der gegen die G-Domäne gerichtet ist zu identifizieren, aber es war von Interesse intaktes atToc159 und somit auch einen intakten Toc-Komplex zu isolieren. Durch eine schnelle Isolation eines Gesamtextraktes aus *Arabidopsis* und eine anschließende Trennung in eine lösliche und eine Membranfraktion war es schließlich möglich intaktes atToc159 zu isolieren. Es wurde versucht die Thylakoidmembranen, die die meisten Proteinkomplexe enthalten, abzutrennen, doch beim Abtrennen der Thylakoidmembranen in einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden viele chloroplastidäre Hüllmembranen mitsedimentiert. Dieses Phänomen, dass Thylakoidmembranen und Hüllmembranen sehr stark zusammenhängen, wurde auch schon von Akita et al. (1997) beschrieben, weshalb die Toc-Komplexe aus Gesamtmembranen solubilisiert wurden.

Bei den ersten Versuchen zeigte sich, dass in der BN-Spur nach der Detektion mit dem Toc159A-Antikörper ein sehr starkes Signal gleich an der oberen Trenngelkante und davon ausgehend ein Schmier vorhanden war. Um den Eintritt größerer Komplexe in das BN-Gel zu ermöglichen wurde die Acrylamidkonzentration von 5 % auf 3 % als Anfangskonzentration verringert, was zu einer geringen Verbesserung führte.

Für die Solubilisierung der Toc-Komplexe wurden drei verschiedene Detergenzien in mehreren Konzentrationen getestet, um zu untersuchen mit welchem Detergenz sich die Komplexe am besten aus den Membranen herauslösen lassen, denn es ist bekannt, dass sich nicht jeder Komplex gleich gut mit jedem Detergenz solubilisieren lässt.

Es wurden die nicht-ionischen Detergenzien Digitonin, Dodecylmaltosid (n-Dodecyl β -D-maltosid) und Triton X-100 getestet. Die Ergebnisse sind in Abb. 3.27 zu sehen. Es ist für alle Detergenzien zu beobachten, dass mit zunehmender Detergenzkonzentration mehr Komplexe solubilisiert werden. Dies ist anhand der zunehmenden Blaufärbung

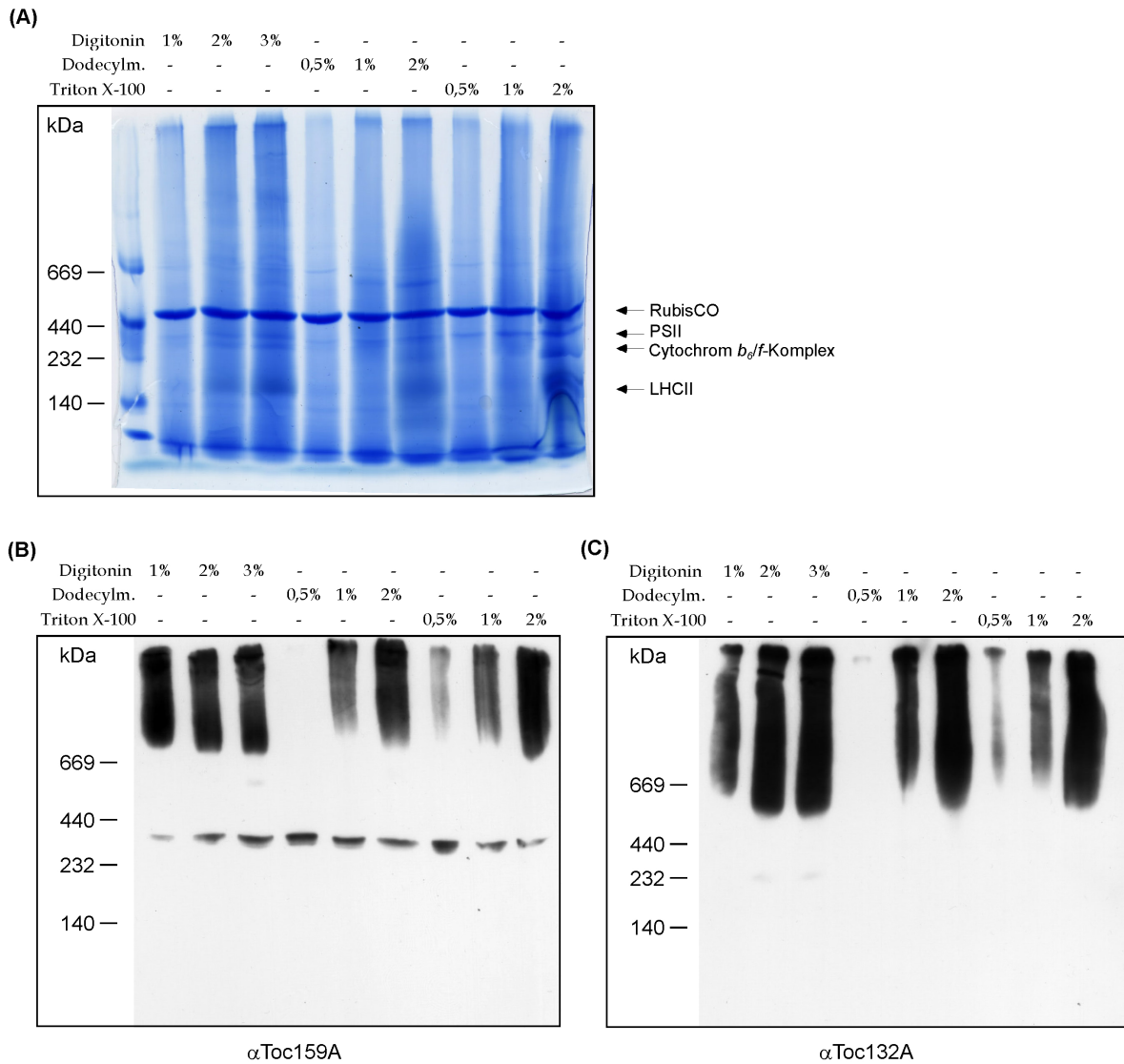


Abb. 3.27: Auftrennung von Toc-Komplexen mittels BN-PAGE. Gesamtmembranproteine aus jeweils 20 mg WT Rosettenblättern wurden mit den angegebenen Detergenzien unterschiedlicher Konzentration solubilisiert und auf einem 3-13,5%igen BN-Gel aufgetrennt. Zu sehen sind das colloidal gefärbte Gel und die erhaltenen ECL-Filme nach der Immundetektion mit den unter den Bildern angegebenen Antikörpern.

der Spuren des colloidalgefärbten BN-Geles (A) zu sehen. Die Colloidalfärbung erfolgte, um den Marker anzufärben. Die stärksten Banden waren auch schon zuvor durch das zugesetzte Coomassie G-250 in der BN-PAGE zu erkennen. Bei der in allen Spuren vorkommenden Bande von ca. 500 kDa handelt es sich aufgrund seiner Größe und Menge um den RubisCO-Komplex, der sich bei der Gesamtmembranisolation trotz Waschung nicht von den Membranen ablösen ließ. Weitere Banden ließen sich durch den Vergleich mit dem BN-Gel von solubilisierten Thylakoidmembranen aus Erbse aus der Arbeit von Sabine Molik (Molik, 2005) zuordnen. So handelt es sich sehr wahrscheinlich bei den unter der RubisCO liegenden Banden um das PSII (ca. 390 kDa), den Cytochrom b_6/f -Komplex (ca. 330 kDa) und dem meist bei höheren Detergenzkonzentrationen sichtbaren LHCII mit ca. 200 kDa.

Um die Toc-Komplexe nachzuweisen, die nur einen geringen Anteil der solubilisierten Komplexe ausmachen, wurden die aufgetrennten Komplexe nach der BN-PAGE auf eine PVDF-Membran transferiert und eine Westerndetektion mit Toc-Antikörpern durchgeführt (Abb. 3.27, B).

Mit dem Toc159A-Antikörper konnte bei allen eingesetzten Detergenzien ein Schmier von der oberen Trenngelkante bis zu einer Größe von ca. 700 kDa nachgewiesen werden. Dabei war es mit allen drei getesteten Digitoninkonzentrationen (1-3%) möglich den Komplex gleich effizient zu solubilisieren. Mit Dodecylmaltosid und Triton X-100 ließ sich ein Komplex um atToc159 ab einer Konzentration von 1% aus den Membranen solubilisieren. Eine effizientere Solubilisierung erfolgte aber mit 2% Dodecylmaltosid bzw. Triton X-100. Es ist jedoch zu beobachten, dass die Komplexe um atToc159, die mit 1% solubilisiert wurden größer sind als welche die mit 2% solubilisiert wurden. Dabei stimmen die mit 2% Detergenz erhaltenen Komplexgrößen mit denen aus der Solubilisierung mit Digitonin überein. Bei der Bande um ca. 300 kDa handelt es sich nicht um das atToc159-Monomer, sondern vielmehr um ein Degradationsprodukt desselben, was zu einem späteren Zeitpunkt noch gezeigt wird.

Mit dem Toc132A-Antikörper ist ebenfalls ein Schmier ab der oberen Trenngelkante zu detektieren. Dieser zieht sich jedoch, im Gegensatz zu dem von α Toc159A, bis zu einer Größe von ca. 600 kDa. Ein hochmolekularer Komplex mit atToc132 ließ sich mit allen Detergenzien nachweisen, wobei mit zunehmender Detergenzkonzentration offensichtlich mehr Komplexe solubilisiert wurden. Es war ebenfalls zu beobachten, dass mit Detergenzkonzentrationen von 1% die Komplexe, die atToc132 enthalten, ein höheres Molekulargewicht aufweisen.

Die folgenden Solubilisierungen wurden mit 2% Digitonin durchgeführt, da mit Digito-

nin die Komplexe am effizientesten solubiliert wurden und eine distinkte Minimalgröße aufweisen, anstatt eines diffus auslaufenden Schmiere.

Um zu testen, ob es sich bei dem Signal mit dem Toc159A-Antikörper auch in der BN-PAGE um ein spezifisches Signal handelt, wurde dieses für *atToc159* in einem weiteren Experiment untersucht. Es wurden neben den WT-Membranproteinen auch Membranproteine von der *atToc159*-Mutante solubilisiert und auf einer BN-PAGE aufgetrennt.

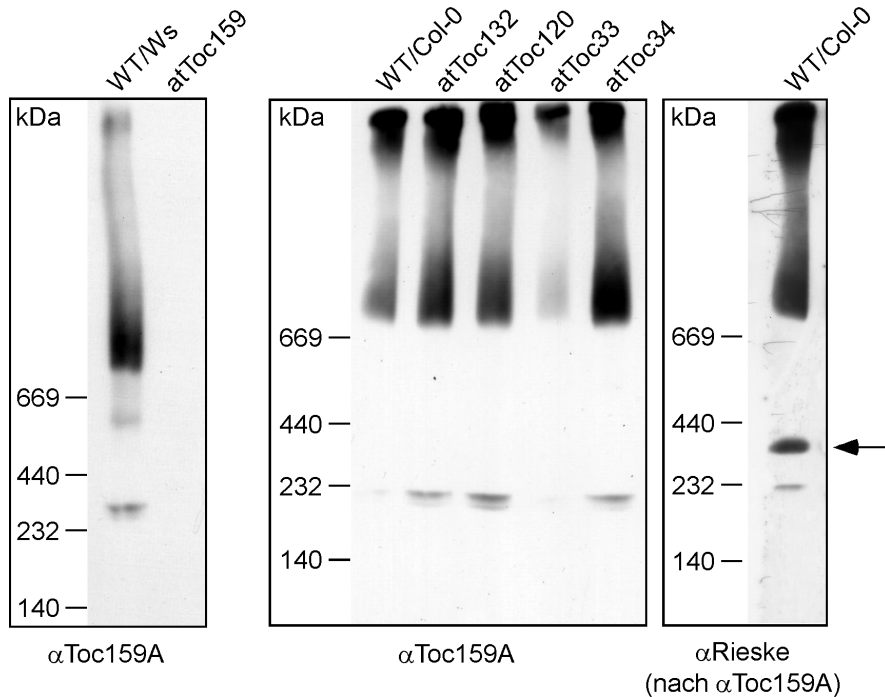


Abb. 3.28: Westernanalyse der BN-Gele. Gesamtmembranproteine aus jeweils 20 mg Rosettenblättern wurden mit 2% Digitonin solubilisiert, auf einem 3-13,5%igen BN-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zu sehen sind die ECL-Filme nach der Immundetektion mit den unter den Bildern angegebenen Antikörpern.

Wie in Abb. 3.28 (links) zu sehen ist, ist in der *atToc159*-Membranspur mit dem Toc159-Antikörper kein Signal zu detektieren. Ebenfalls getestet wurde in diesen Versuch, ob es möglich ist den Schmier durch einen längeren Gellauf besser aufzulösen. Es scheint, dass durch den längeren Gellauf sich in der Tat ein Komplex von ca. 700 – 900 kDa abtrennen lässt.

Neben dem WT und der *atToc159*-Mutante wurde nun auch in den weiteren Rezeptormutanten nach dem Komplex, der *atToc159* enthält geschaut, um eventuelle Veränderungen der Größe, die durch das Fehlen der jeweiligen Rezeptorkomponenten hervorgerufen werden könnten, zu beobachten. Wie in Abb. 3.28 (mitte) zu sehen ist, ist nirgends eine Veränderung in der Minimalkomplexgröße zu erkennen. Es ist jedoch auffällig,

dass in der *atToc33*-Mutante offensichtlich weniger atToc159-Komplexe enthalten sind. Trotz des langen Gellaufs ist an der oberen Trenngelkante atToc159 zu detektieren. Es ist unklar, ob es sich hier um sehr große native Komplexe handelt, oder ob ein Teil der Komplexe aus unbekanntem Gründen aggregiert.

Durch die Westerndetektion mit dem Rieske-Antikörper (Abb. 3.28 rechts) konnte gezeigt werden, dass mit den BN-Gelen eine vernünftige Auftrennung von Proteinkomplexen möglich ist. Es ist eine eindeutige Bande bei ca. 330 kDa für den Cytochrom *b₆/f*-Komplex zu detektieren.

3.3.3 2D: BN/SDS-PAGE mit Membranproteinen aus Rosettenblättern

Es wurden alle Rezeptormutanten im Hinblick auf die Größe der Komplexe, die atToc159, atToc132, atToc120, atToc33 bzw. atToc34 enthalten untersucht. Aufgrund dessen, dass einige der Antikörper unbekannte Kreuzreaktionen (α Toc33 und α Toc34) zeigen, oder nur schlecht in den Western der ersten Dimension (BN-PAGE) funktionieren (α Toc120A), wurde nach der BN-PAGE eine 2. Dimension, die SDS-PAGE durchgeführt. Nun war es möglich die Westernsignale aufgrund ihres apparenten Molekulargewichts eindeutig zuzuordnen.

Aufgrund der geringen Acrylamidkonzentration im oberen Bereich der BN-Streifen war es teilweise schwer die Größen der Komplexe zuzuordnen, da die BN-Streifen in der 2. Dimension beim Fixieren auf dem SDS-Gel zum Teil gestaucht oder gestreckt wurden. Die einzelnen Western Blots wurden darum an der RubisCO-Bande, die auf den PVDF-Membranen gut zu sehen war, ausgerichtet, so dass der mittlere Bereich um 500 kDa sehr gut übereinstimmt. Im hochmolekularen Bereich liegen die Signale gleicher Größe aber nicht immer direkt übereinander.

Die Ergebnisse mit den solubilisierten Membranproteinen aus dem WT/Ws und der *atToc159*-Mutante sind in Abb. 3.29 gezeigt. Eine genaue Komplexgröße ist für die Toc-Rezeptorkomponenten nicht auszumachen, da auch hier, wie schon in der 1. Dimension beobachtet, ein langer Schmier vom hochmolekularen Bereich ausgehend zu sehen ist. Es ist aber eindeutig zu sehen, dass die großen Rezeptoren (atToc159, atToc132 und atToc120) ausschließlich in sehr großen Komplexen von über 500 kDa enthalten sind und die kleinen Rezeptoren (atToc33 und atToc34) sowohl in großen, als auch in kleineren Komplexen vorkommen. Die Minimalgröße der Komplexe um atToc159, atToc132 bzw. atToc120 ist für den atToc159-Komplex mit ca. 700 kDa am größten. Die Minimalkom-

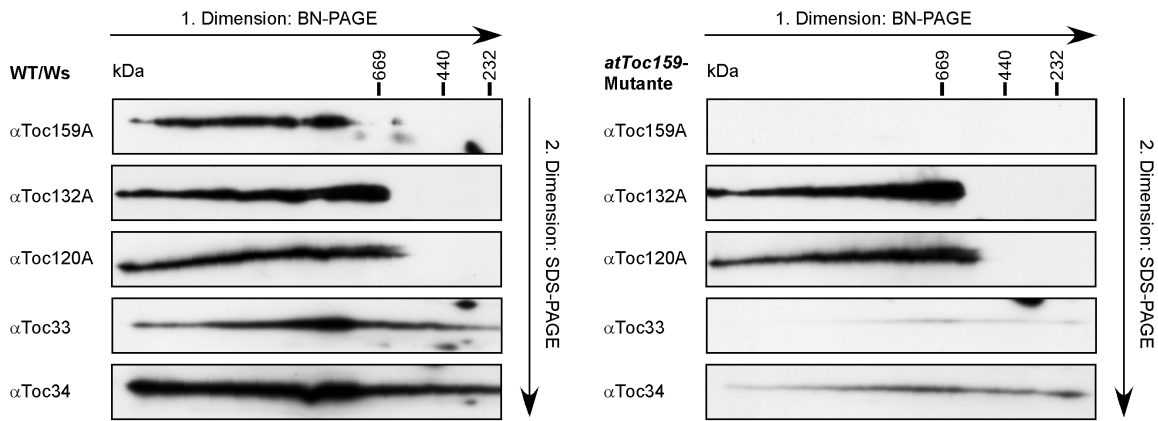


Abb. 3.29: Zweidimensionale BN/SDS-PAGE vom WT/Ws und *atToc159*. Gesamtmembranproteine aus jeweils 40 mg Rosettenblättern wurden mit 2% Digitonin solubilisiert, in der 1. Dimension auf einem 3-13,5%igen BN-Gel und in der 2. Dimension auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zu sehen sind die ECL-Filme nach der Immundetektion mit den jeweils links angegebenen Antikörpern.

plexgröße für *atToc132* und *atToc120* liegt bei ca. 600- bzw. 550 kDa. Die in der ersten Dimension mit dem *Toc159A*-Antikörper detektierte Bande zwischen 200 und 300 kDa (hier ca. 300 kDa) ist in der zweiten Dimension nur als kleinere Bande nachweisbar. Es handelt sich somit nicht um das intakte Monomer, sondern um ein Degradationsprodukt von *atToc159*. Die Hauptmenge des *atToc33* und *atToc34* befindet sich im gleichen Bereich wie die des *atToc159*.

In der *atToc159*-Mutante ist für die Komplexe, die *atToc132* bzw. *atToc120* enthalten, keine Veränderung in ihrer Größe zu beobachten. *AtToc33* und *atToc34* hingegen sind in viel geringeren Mengen in der Mutante enthalten und ihre Hauptmenge liegt in diesem Fall im Bereich von *atToc132*. Die Hauptkomplexe, die *atToc33* oder *atToc34* enthalten, sind damit eindeutig kleiner als die im Wildtyp.

Die Westernanalyse für die weiteren Mutanten ist in Abb. 3.30 zu sehen. Die Ergebnisse des Col-0 Wildtyps entsprechen dem des Wassilewskija Wildtyps, bis darauf, dass hier sehr deutlich zu sehen ist, dass *atToc159* einen Komplex von ca. 700 – 900 kDa bildet. In der *atToc120*-Mutante ist sehr gut zu beobachten, dass die Hauptmenge von *atToc33* und *atToc34* beim selben Molekulargewicht wie *atToc159* nachweisbar ist. Beim Vergleich der Minimalgröße der Toc-Komplexe in den Mutanten (*atToc132*, *atToc120*, *atToc33* und *atToc34*) ist festzustellen, dass die Komplexe, in denen *atToc159*, *atToc132*, *atToc120*, *atToc33* bzw. *atToc34* enthalten ist, sich nicht vom WT unterscheiden. Dies würde, zumindest für die großen Rezeptoren bedeuten, dass sie sich nicht zusammen in einem Komplex befinden.

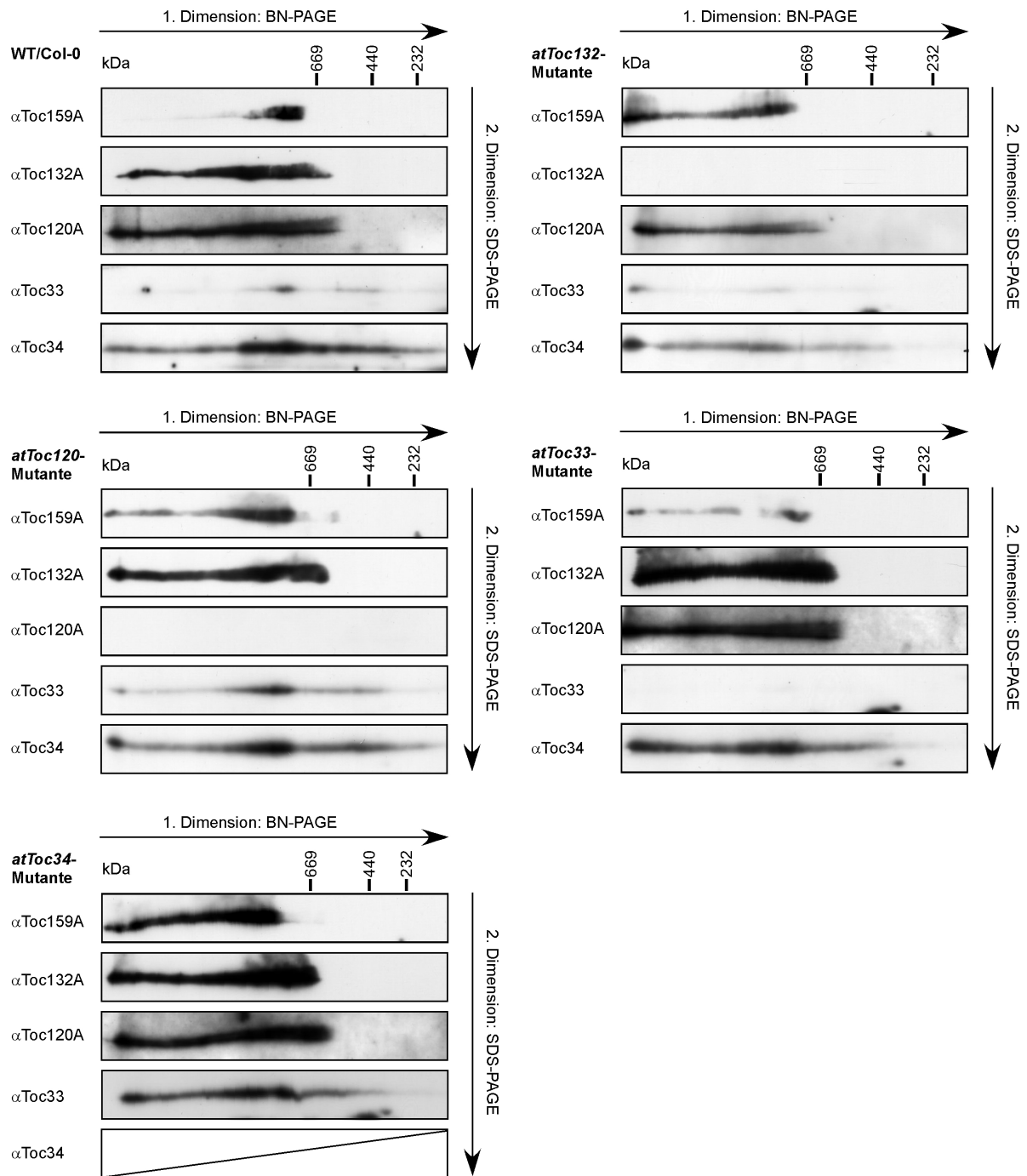


Abb. 3.30: Zweidimensionale BN/SDS-PAGE vom WT/Col-0, *atToc132*, *atToc120*, *atToc33* und *atToc34*. Gesamtmembranproteine aus jeweils 40 mg Rosettenblättern wurden mit 2 % Digitonin solubilisiert, in der 1. Dimension auf einem 3-13,5 %igen BN-Gel und in der 2. Dimension auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zu sehen sind die ECL-Filme nach der Immundetektion mit den jeweils links angegebenen Antikörpern.

3.3.4 2D: BN/SDS-PAGE mit Membranproteinen aus Wurzeln

Nachdem die Toc-Komplexe in den Rosettenblättern untersucht wurden, stellt sich die Frage, ob die selben Komplexe auch in nicht-photosynthetischen Geweben vorkommen. Dazu wurden die Komplexe in Wurzelmembranen genauer analysiert.

Zunächst einmal wurde der Proteingehalt der Toc-Rezeptoren in den beiden Geweben untersucht. Dazu wurden die Gesamtmembranen isoliert und die Membranproteine aus jeweils 5 bzw. 10 mg Frischgewicht auf einer SDS-PAGE aufgetrennt und eine Westernanalyse durchgeführt (Abb. 3.31).

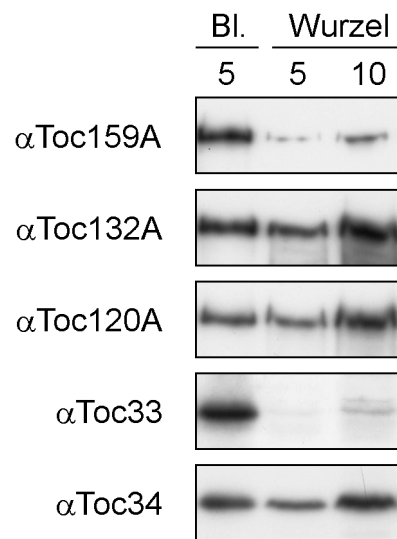


Abb. 3.31: Vergleich der Toc-Proteine in Blättern und Wurzeln. Gesamtmembranproteine aus 8 mg WT/Col-0 Rosettenblättern (R) bzw. Wurzeln (W) wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zu sehen sind die ECL-Filme nach der Immundetektion mit den jeweils links angegebenen Antikörpern.

Es ist zu sehen, dass bezogen auf die gleich Menge Frischgewicht, die Toc-Rezeptoren atToc132, atToc120 und atToc34 in etwas geringeren Mengen als in den Blättern vorkommen, doch das Verhältnis zueinander bleibt unverändert. Demgegenüber sind die Mengen an atToc159 und atToc33 in den Wurzelmembranen stark verringert.

Aufgrund der sehr geringen atToc159- und atToc33-Proteinmengen, wurde die folgende BN-PAGE mit Membranproteinen aus 54 mg Frischgewicht, anstatt der sonst eingesetzten 40 mg, durchgeführt (Abb. 3.32). Für die gezeigten Immundetektionen mit α Toc159A und α Toc33 wurden ebenfalls die Expositionszeiten der ECL-Filme gegenüber der sonst eingehaltenen Dauer bei den vorherigen BN/SDS-Gelen verlängert. Es ist zu beobachten, dass die Komplexe, die atToc159, atToc132 bzw. atToc120 enthalten sich nicht in ihrer Minimalgröße von denen aus den Blättern unterscheiden. Lediglich die Menge der

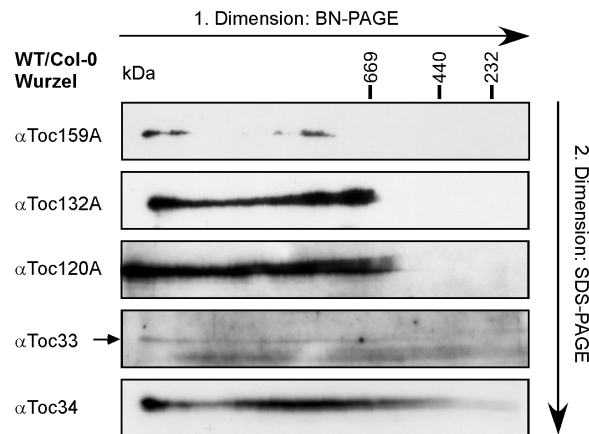


Abb. 3.32: Zweidimensionale BN/SDS-PAGE von WT/Col-0 Wurzelmembranproteinen. Gesamtmembranproteine aus 54 mg WT/Col-0 Wurzeln wurden mit 2% Digitonin solubilisiert, in der 1. Dimension auf einem 3-13,5%igen BN-Gel und in der 2. Dimension auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Zu sehen sind die ECL-Filme nach der Immundetektion mit den jeweils links angegebenen Antikörpern.

Komplexe, die atToc159 und atToc33 enthalten, ist eindeutig in den Wurzeln geringer als in den Blättern.

3.3.5 Bestimmung der Größe und Zusammensetzung der Toc-Komplexe mittels BN/SDS-PAGE

Um genauer analysieren zu können, welche Toc-Proteine in Komplexen mit der selben Größe laufen um somit auf ihre Zusammensetzung rückschließen zu können, wurde die 1. Dimension (BN-Gel) in gleich hohe Stücke geschnitten, und in die Taschen eines SDS-Gels für die 2. Dimension geladen, so dass auf jedem Blot die selben Proben in den selben Taschen sind.

Die Ergebnisse mit den Gesamtmembranproteinen aus dem WT sind in Abb. 3.33 zu sehen. Neben den Toc-Rezeptorproteinen konnte hier die Analyse auf atToc75 und zwei Tic-Komponenten (Tic110 und Tic40) ausgedehnt werden, da die Antikörper hierfür freundlicherweise von Dr. John Fröhlich („Michigan State University“, USA) zur Verfügung gestellt wurden.

Die stärkste Bande für atToc159 ist in Spur 11 zu sehen. In der selben Spur ist ebenfalls die größte Menge an atToc33, atToc34 und atToc75 vorhanden. Von atToc120 und atToc132 ist in der Spur 11 auch viel Protein enthalten, allerdings ist ebensoviel von ihnen in den Spuren 12 und 13 vorhanden. Bei dem Komplex aus Spur 11 scheint es sich allein um einen Toc-Komplex zu handeln, denn die Tic-Komponenten Tic110 und Tic40 sind

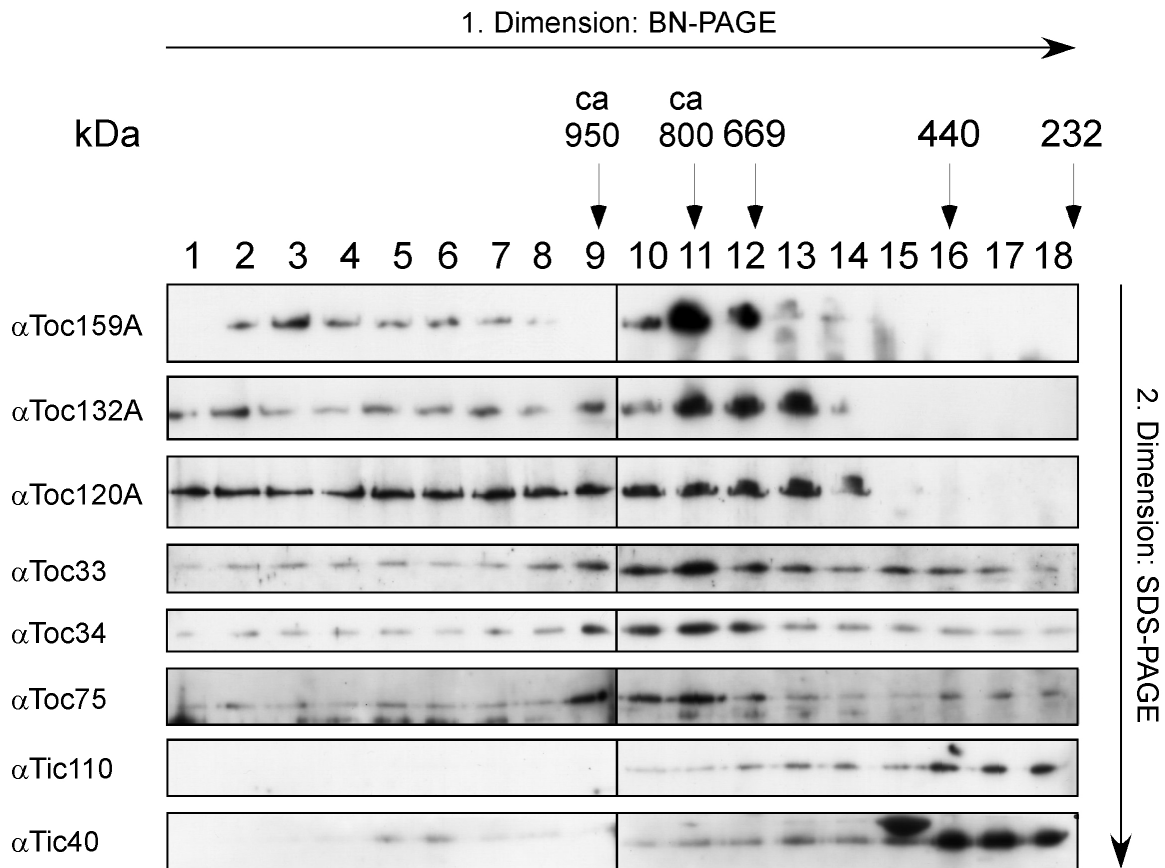


Abb. 3.33: Zweidimensionale BN/SDS-PAGE vom WT/Col-0. Gesamtmembranproteine aus jeweils 20 mg FG wurden mit 2% Digitonin solubilisiert und in der 1. Dimension auf einem 3-13,5%igen BN-Gel aufgetrennt. Im Anschluß daran wurde der BN-Streifen in 18 gleichhohe ($1 \cong 3\%$ -Acrylamidbereich) Stücke geschnitten und zur Auftrennung in der 2. Dimension in die Taschen eines 6-13%igen SDS-Gels geladen. Zu sehen sind die ECL-Filme nach der Immundetektion mit den jeweils links angegebenen Antikörpern.

hauptsächlich in den Spuren 16, 17 und 18 zu finden. Auffällig ist, dass in den Spuren 16 bis 18 neben den Tic-Komponenten auch eine Zunahme von atToc75 zu beobachten ist. Für atToc132 und atToc120 ist keine eindeutige Zuordnung von möglichen Komplexpartnern möglich, da in den Spuren 12 und 13 keine sichtbare Erhöhung anderer Toc-Proteine nachweisbar ist.

AtToc159 ist offensichtlich in einem Komplex von ca. 800 kDa. AtToc33, atToc34 und atToc75 sind ebenfalls größtenteils in einem ca. 800 kDa großem Komplex enthalten. Der Hauptkomplex, der atToc132 enthält liegt im Bereich von ca. 600 – 800 kDa. AtToc120 ist bis zum hochmolekularen Bereich nachweisbar, doch die größte Menge ist in den Spuren 11-14 nachweisbar, welches einer Größe von ca. 550 – 800 kDa entspricht.

3.3.6 Coimmunpräzipitation der Toc-Komplexe

Die Ergebnisse der BN-PAGE weisen darauf hin, dass atToc159 mit atToc75, atToc33 und atToc34 zusammen einen Komplex bildet. Im Gegensatz dazu war die Zuordnung der Komplexpartner von atToc132 und atToc120 nicht eindeutig möglich. Um die Zusammensetzung der Toc-Komplexe zu überprüfen, bzw. näher zu analysieren wurde die Methode der Coimmunpräzipitation eingesetzt. Dabei wird mit Hilfe eines Antikörpers das entsprechende Antigen mit seinen Komplexpartnern aus einem Gemisch an solubilisierten Membranproteinkomplexen durch die Zugabe von Protein A Sepharose präzipitiert (2.14.19). Die Membranproteinkomplexe wurden aus Gesamtmembranen aus Rosettenblättern mit 2% Triton X-100 solubilisiert und die präzipitierten Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt.

Zur Überprüfung der Methode, wurde zunächst eine Coimmunpräzipitation mit einem TatB-Antikörper durchgeführt (Abb. 3.34). TatB gehört zu der in der Thylakoidmembran

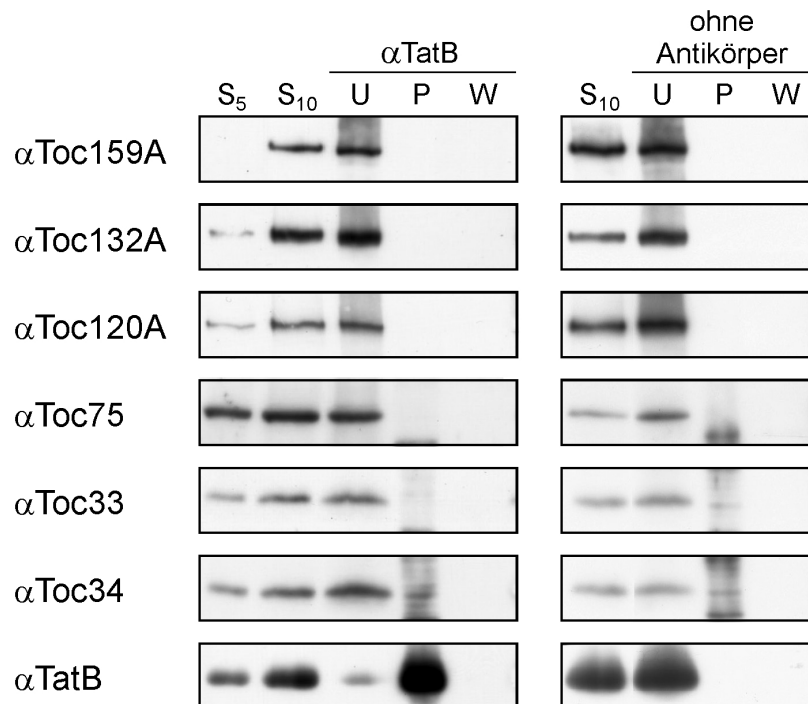


Abb. 3.34: Kontroll-Coimmunpräzipitation mit TatB- bzw. ohne Antikörper. Mit 2% Triton X-100 solubilisierte Gesamtmembranen aus 80 mg Rosettenblättern wurden mit α TatB immunpräzipitiert. Zur Kontrolle, ob Proteine unspezifisch an die Protein A Sepharose binden wurde ein Ansatz ohne Antikörper durchgeführt. Spur S₅ enthält 5% und Spur S₁₀ 10% der solubilisierten Proben. Von den ungebundenen Proteinen (U) wurden 20% und der letzten Waschfraktion (W) 17% aufgetragen. Spur P enthält das präzipitierte Pellet. Zu sehen sind die ECL-Filme nach der Immundetektion mit den jeweils links angegebenen Antikörpern.

lokalisierten Tat-Translokase (Gutensohn et al., 2006). Der TatB-Antikörper ist wie die Toc-Antikörper affinitätsgereinigt und sollte die Toc-Proteine nicht erkennen. Eine Negativ-Kontrolle ohne Antikörper wurde ebenfalls durchgeführt, um mögliche unspezifische Proteinbindungen an die Protein A Sepharose zu detektieren.

In Abb. 3.34 ist das Ergebnis der Coimmunpräzipitation mit α TatB bzw. ohne Antikörper gezeigt. Es konnten über 10% der solubilisierten TatB-Proteine präzipitiert werden, was anhand der Spur mit den präzipitierten Proteinen (P) im Vergleich zu den solubilisierten Proteinen (S_5 , S_{10}) zu sehen ist. Nicht präzipitiert wurden hingegen atToc159, atToc132, atToc120, atToc75 und atToc33. Nur für atToc34 ist ein Signal in der Spur mit den präzipitierten Proteinen sichtbar. Im Kontrollansatz, der ohne Antikörper durchgeführt wurde, ist ebenfalls ein Signal mit dem atToc34-Antikörper detektierbar. Das beobachtete Signal für atToc34 ist somit auf eine unspezifische Reaktion mit der Protein A Sepharose zurückzuführen. Neben atToc34 ist auch atToc33 schwach detektierbar. Alle anderen Toc-Proteine und TatB wurden nicht unspezifisch präzipitiert.

Die Ergebnisse der Coimmunpräzipitationen mit den Toc-Antikörpern sind in Abb. 3.35 zu sehen. Die Entwicklung der Western erfolgte für α Toc159A und α Toc132A mit den normalen, als auch mit dem sensitiveren *ECL-Advance*-Detektionslösungen (ADV), um auch sehr schwache Signale nachweisen zu können. In der Kontrollpräzipitation mit α TatB konnte auch mit dem *ECL-Advance*-System kein Signal für atToc159 und atToc132 detektiert werden (nicht gezeigt). Die Detektionen von atToc120, atToc75, atToc33 und atToc34 erfolgten alle nur mit dem *ECL-Advance*-System.

Die Ergebnisse zeigen, dass nicht alle Antikörper die gleiche Effizienz aufweisen. Mit α Toc34, α Toc132A, α Toc33 und α Toc159A ist es möglich die jeweiligen Proteine zu ca. 6 – 15% vom Gesamtansatz zu präzipitieren. In der Immunpräzipitation mit α Toc120 konnte dagegen nur ca. 0,5% des solubilisierten atToc120A präzipitiert werden.

Mit α Toc159A wurden neben atToc159 (ca. 15%) große Mengen an atToc75 (ca. 12%), atToc33 (ca. 12%) und atToc34 (ca. 12%) präzipitiert, was darauf schließen lässt, dass sie sehr wahrscheinlich zusammen einen Komplex bilden (atToc159, atToc75, atToc33 und atToc34). Es wurden ebenfalls sehr geringe Mengen an atToc132 und atToc120 coimmunpräzipitiert.

Mit atToc132 (ca. 9%) wurden atToc75 (ca. 3%), atToc34 (ca. 2%) sowie geringe Mengen an atToc120 und atToc159 (ADV) coimmunpräzipitiert. Da der Toc132A-Antikörper, wie in Abb. 3.6 gezeigt, eine geringe Kreuzreaktion mit dem atToc120A-His₆-Protein aufweist, ist es nicht auszuschließen, dass das Signal für atToc120 durch eine Kreuzreaktion des Antikörpers verursacht wurde. Um dies zu untersuchen, wurde ebenfalls eine

Coimmunpräzipitation mit der Harnstofffraktion des Toc132A-Antikörpers durchgeführt (nicht gezeigt), aber auch hier war eine sehr geringe Präzipitation von atToc120 zu beobachten. Dieses zeigt, dass atToc132 sehr wahrscheinlich einen Komplex mit atToc75 und atToc34 bildet. Es ist ebenfalls möglich, dass es einen geringen Anteil an Komplexen gibt, die neben atToc132 auch atToc120 und/oder atToc159 enthalten.

Für α Toc120 war die Immunpräzipitation schon so schwach, dass keine weiteren Komponenten coimmunpräzipitiert wurden.

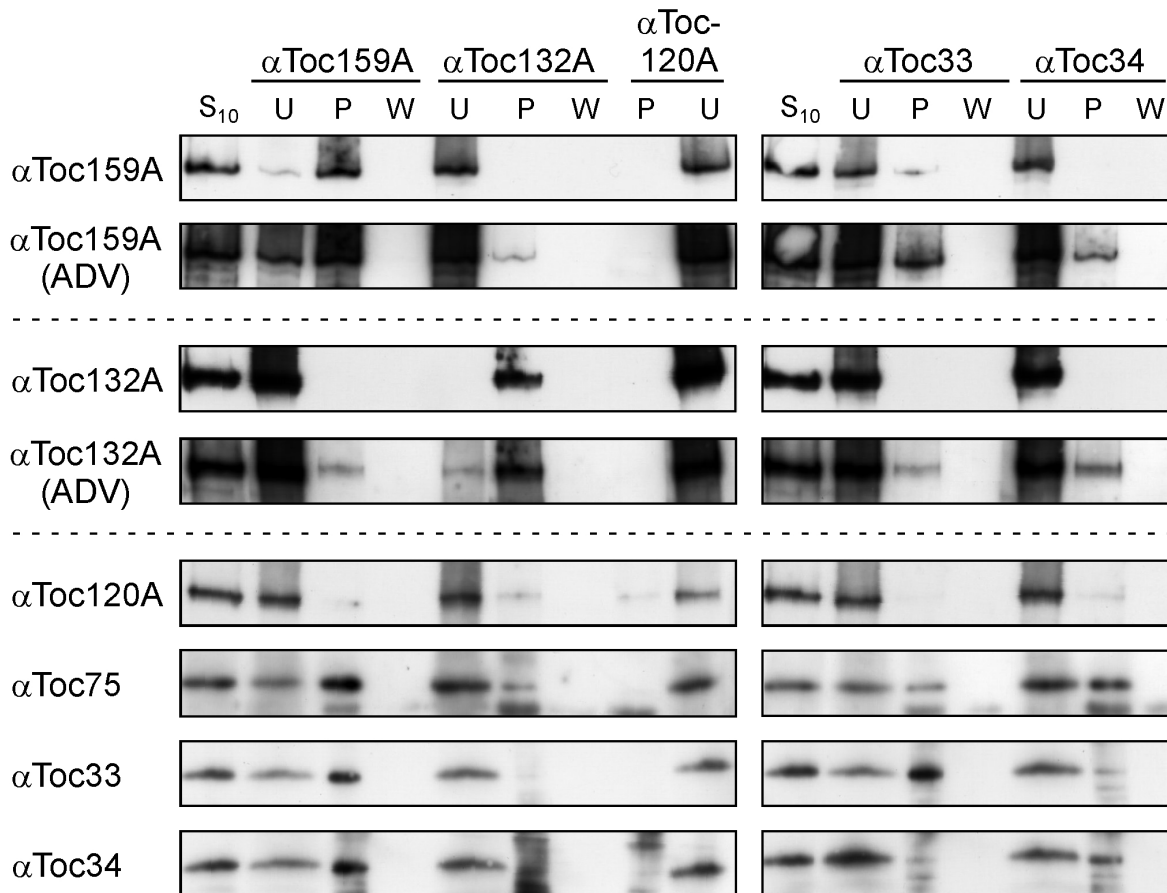


Abb. 3.35: Coimmunpräzipitation von Toc-Komplexen aus *A. thaliana* mit den Toc-Antikörpern. Mit 2% Triton X-100 solubilisierte Gesamtmembranproteine aus 80 mg Rosettenblättern wurden mit den über den Spuren angegebenen Antikörpern immunpräzipitiert. Spur S₁₀ enthält 10% der solubilierten Proben, U ca. 20% ungebundene Proteine, P das präzipitierte Pellet und W ca. 17% der letzten Waschfraktion. Die Entwicklung der Western Blots mit den Toc159A- und Toc132A-Antikörpern erfolgte sowohl mit den normalen Detektionslösungen (obere Spur), als auch mit dem sensitiveren *ECL-Advance*-System (ADV), welches auch für α Toc120A, α Toc75, α Toc33 und α Toc34 eingesetzt wurde. Zu sehen sind die ECL-Filme nach der Immundetektion mit den jeweils links angegebenen Antikörpern.

Mit atToc33 (ca. 12 %) wurde zum größten Teil atToc75 (ca. 4 %) coimmunpräzipitiert. Geringe Mengen an atToc159, atToc132 (ADV) und atToc34 sind ebenfalls nachweisbar. Es ist möglich, dass das für atToc34 beobachtete Signal auf eine Kreuzreaktion des Toc34 Antikörpers zurückzuführen ist, denn in anderen Westerndetektionen konnte beobachtet werden, dass α Toc34 mit atToc33, welches in großen Mengen vorliegt, wie auch in dieser Coimmunpräzipitation, kreuzreagiert. Des Weiteren war auch in den Kontroll Coimmunpräzipitationen zu beobachten, dass geringe Mengen an atToc34 unspezifisch präzipitiert wurden (siehe Abb. 3.34).

Zusammen mit atToc34 (ca. 6 %) wurden ca. 10 % des solubilisierten atToc75 präzipitiert. Geringe Mengen an atToc159 (ADV), atToc33 und atToc120 wurden ebenfalls coimmunpräzipitiert. Da der Toc34-Antikörper auch eine geringe Kreuzreaktion zu atToc33 aufweist, ist unklar, ob das mit dem Toc34-Antikörper präzipitierte atToc33 auf die Kreuzreaktion des Antikörpers, oder eine spezifische Coimmunpräzipitation zurückzuführen ist.

Nach den Ergebnissen der Coimmunpräzipitation mit α Toc159, bei der atToc33 und atToc34 coimmunpräzipitiert wurden, war umgekehrt mit dem Toc33- bzw. Toc34-Antikörper zu erwarten, dass atToc159 coimmunpräzipitiert wird. Es sind in der Tat Signale für atToc159 detektierbar, aber atToc159 liegt offenbar nur in geringen Mengen vor. Dieses lässt sich damit begründen, dass atToc159 nur im Komplex mit atToc33 bzw. atToc34 vorkommt und somit quantitativ mit dem Toc159A-Antikörper coimmunpräzipitiert werden kann, während die kleinen Rezeptoren auch Komplexe ohne atToc159 bilden, so dass nur ein Teil der mit α Toc33 bzw. α Toc34 präzipitierten Komplexe auch atToc159 enthält. Dieses deckt sich mit den Ergebnissen der BN-PAGE, wo zu sehen ist, dass atToc159 nur große Komplexe bildet, atToc33 und atToc34 hingegen auch in kleineren Komplexen vorhanden sind (siehe Abb. 3.33).

4 Diskussion

4.1 Größe und Zusammensetzung der Toc-Komplexe in *Arabidopsis thaliana*

Der aus Erbse isolierte Toc-Kernkomplex besteht aus den zwei Rezeptorproteinen Toc159 und Toc34, sowie der Translokationspore Toc75 (Kessler und Schnell, 2006; Gutensohn et al., 2006). In *Arabidopsis thaliana* dagegen existieren jeweils Genfamilien für Toc159 (*atToc159*, *atToc132*, *atToc120* und *atToc90*) und Toc34 (*atToc33* und *atToc34*), wobei ich mich im Rahmen dieser Arbeit auf *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* konzentriert habe. Das Vorhandensein mehrerer homologer Proteine führt zur Frage wie der Toc-Komplex in *Arabidopsis thaliana* aufgebaut ist. Zwei Alternativen erscheinen möglich: entweder es existiert ein großer Komplex, der alle Toc159-Homologen enthält, oder es gibt unterschiedliche Komplexe, in denen jeweils nur ein Rezeptorprotein der Toc159-Familie vorkommt. Dieser Frage und der nach der Größe und Zusammensetzung des bzw. der Komplexe wurde hier nachgegangen.

4.1.1 Gibt es einen großen Komplex, der *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* gemeinsam enthält?

In den BN-Analysen von Wildtyp Blättern waren mit Antikörpern gegen *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* größtenteils alle drei Proteine im selben molekularen Bereich nachweisbar (siehe Abb. 3.29, 3.30, 3.33). Deshalb wäre es denkbar, dass sie zusammen einen Komplex bilden. Es ist aber auffällig, dass der kleinste nachweisbare *atToc159*-Komplex größer ist als der von *atToc132*, während der kleinste *atToc132*-Komplex ebenfalls größer ist als der von *atToc120*. Dies bedeutet, dass offensichtlich auch Komplexe existieren, die nur *atToc120* oder nur *atToc120* und *atToc132* enthalten, aber kein *atToc159*.

Eine Untersuchung von *Arabidopsis*-Nullmutanten, in denen jeweils ein Rezeptorprotein (*atToc159*, *atToc132* oder *atToc120*) fehlt ergab, dass sich das Verteilungsmuster der Toc159-Homologen in der BN-PAGE nicht gegenüber dem vom WT unterschied (siehe

Abb. 3.29, 3.30, 3.33). Dies spricht gegen einen gemeinsamen Komplex, da ansonsten eine Verschiebung dieser Komplexe zu einer kleineren Komplexgröße in den Mutanten sichtbar wäre. Alternativ könnte das Fehlen eines Rezeptorproteins auch durch ein anderes Rezeptorprotein kompensiert worden sein. Es sind aber keine offensichtlichen Erhöhungen im Proteingehalt der jeweils anderen Rezeptoren in den Mutanten festzustellen (siehe Abb.3.26).

Gegen einen gemeinsamen Komplex sprechen ebenfalls die Coimmunpräzipitationsexperimente, bei denen mit dem Toc159A-Antikörper neben atToc159 nur sehr geringe Mengen an atToc132 und atToc120 coimmunpräzipitiert wurden, während andere Toc-Proteine in weitaus größeren Mengen coimmunpräzipitiert wurden (siehe Abb. 3.35). Umgekehrt wurden zusammen mit atToc132 nur sehr geringe Mengen an atToc159 und atToc120 coimmunpräzipitiert. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass vorwiegend Komplexe existieren, die nur einen Toc159-Homologen enthalten und eventuell wenige Komplexe, die alle enthalten. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit für die gemeinsame Coimmunpräzipitation von atToc159, atToc132 und atToc120 wäre, dass sogenannte Superkomplexe existieren, wie sie für die Komplexe der Atmungskette beobachtet wurden (Dudkina et al., 2006). Für die Toc-Proteine wurden solche Superkomplexe bisher nicht beschrieben, doch auf eine mögliche räumliche Konzentrierung der Toc-Komplexe weisen die Ergebnisse von Subramanian et al. (2001) und Schnell und Blobel (1993) hin. Ihre Untersuchungen zeigen, dass sowohl Toc75 als auch Vorstufenproteine nicht auf der gesamten Chloroplastenoberfläche gleichmäßig verteilt sind, sondern oft in distinkten Bereichen nachweisbar sind.

Das Vorhandensein von Toc-Komplexen, die jeweils nur einen Toc159-Homologen enthalten wird von Ivanova et al. (2004) bestätigt. Sie haben ähnliche Coimmunpräzipitationen durchgeführt, die darauf hinweisen, dass atToc159 gegenüber atToc132 und atToc120 strukturell unterschiedliche Komplexe bildet. In der genannten Arbeit wurden atToc132 und atToc120 sowohl zusammen als auch allein mit weiteren Toc-Proteinen präzipitiert, so dass ein Toc-Komplex, der gleichzeitig atToc132 und atToc120 enthält, möglich erschien. Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass sehr wahrscheinlich nur ein Toc159-Homologer pro Komplex enthalten ist.

4.1.2 Größe der einzelnen Toc-Komplexe

Für atToc159 sind in der BN-PAGE (siehe Abb. 3.28, 3.29, 3.30, 3.33) schwache Signale vom Trenngel ausgehend und stärkere von ca. 900 bis 700 kDa nachweisbar, wobei ein eindeutiges Hauptsignal bei ca. 800 kDa zu detektieren ist. Dieser atToc159-Hauptkomplex entspricht in seiner Größe dem von Kikuchi et al. (2006) und Chen und Li (2006) aus Erbse isolierten Toc-Komplex. Sowohl die hier beobachtete Komplexgröße als auch die von Kikuchi et al. (2006) und Chen und Li (2006) beschriebene ist eindeutig größer als die von Schleiff et al. (2003b) für Erbsen Toc-Komplexe ermittelte Größe. Der Grund dafür ist, dass Schleiff et al. (2003b) einen artifiziellen Toc-Komplex mit degradiertem Toc159 untersucht haben, während der in dieser Arbeit analysierte Komplex eindeutig intaktes atToc159 enthielt.

AtToc132 und atToc120 sind ebenfalls vom hochmolekularen Bereich bis ca. 600 kDa bzw. 550 kDa nachweisbar (siehe Abb. 3.29, 3.30, 3.33). Hier ist im Gegensatz zu atToc159 keine klare Komplexgröße zu definieren. Stattdessen gibt es einen Bereich, in dem die meisten Proteine vorliegen. Komplexe, die atToc132 enthalten akkumulieren im Bereich von ca. 600 – 800 kDa und die mit atToc120 bei ca. 550 – 800 kDa.

Für alle drei Toc-Rezeptorproteine ist jedoch eine unterschiedliche Minimalkomplexgröße zu beobachten. Sie nimmt eindeutig von atToc159 über atToc132 zu atToc120 ab und korreliert mit den apparenten Molekulargewichten der einzelnen Rezeptoren (siehe Abb. 3.7).

Es stellt sich die Frage, warum in der BN-PAGE alle drei Rezeptorproteine ebenfalls im hochmolekularen Bereich akkumulieren. Es wäre denkbar, dass, wie schon zuvor erwähnt, einige Toc-Superkomplexe solubilisiert wurden, aber dies würde nicht die recht starken Signale im hochmolekularen Bereich begründen. Eine weitere Erklärung dafür wäre, dass neben den Toc-Komplexen weitere Komplextypen existieren, die z. B. zusätzlich Tic- oder andere Komponenten enthalten. Für die Interaktion mit den Tic-Komponenten spricht, dass im hochmolekularen Bereich ebenfalls Signale für Tic40 detektierbar sind (siehe Spur 5 und 6 in Abb. 3.33). Eine Assoziation von sowohl Tic- als auch anderen Komponenten (Hsp70, Hsp93) mit dem Toc-Komplex aus Erbse wurde in der Literatur schon beschrieben (Chen und Li, 2006; Nielsen et al., 1997), so dass dies durchaus eine plausible Erklärung für die hochmolekularen Signale wäre.

4.1.3 Zusammensetzung der einzelnen Toc-Komplexe

Neben der Frage, ob die großen Rezeptoren (atToc159, atoc132 und atToc120) zusammen, oder in getrennten Komplexen vorkommen, ist es auch von Interesse, wie die kleinen Rezeptoren (atToc33 und atToc34) zugeordnet werden. Der Grund hierfür ist, dass laut der Literatur die Annahme besteht, dass atToc159 präferentiell mit atToc33 interagiert, während atToc132 und atToc120 jeweils vorwiegend mit atToc34 Komplexe bilden (Ivanova et al., 2004; Bédard und Jarvis, 2005; Kessler und Schnell, 2006).

Die Ergebnisse der Coimmunpräzipitation mit α Toc159A zeigen deutlich, dass atToc159 offensichtlich im Komplex mit atToc75, atToc33 und/oder atToc34 vorliegt. Bestätigt werden diese Daten der Coimmunpräzipitation durch die Ergebnisse der BN-PAGE. Dort ist in WT Blättern (siehe Abb. 3.33) zu sehen, dass atToc159, atToc75, atToc33 und atToc34 die größte Proteinmenge bei ca. 800 kDa aufweisen. Weitere Hinweise darauf, dass atToc159 mit atToc33 und/oder atToc34 zusammen im Komplex vorliegt, liefert der Vergleich ihrer Expressionsmuster im WT und der *atToc159*-Mutante (siehe Abb. 3.26, 3.29). So ist der Gehalt von atToc33 und atToc34 in der Mutante auf unter 50 % vom WT reduziert, obgleich die Gene in der Mutante verstärkt exprimiert werden (siehe Abb. 3.12, Tab. 3.2). Auch in der BN-PAGE der *atToc159*-Mutante ist eindeutig ein verringerter Gehalt an atToc33 und atToc34 zu beobachten (siehe Abb. 3.29). Offenbar fehlt den atToc33- und atToc34-Proteinen in der *atToc159*-Mutante atToc159 als Komplexpartner und sie können deshalb nicht in größeren Mengen akkumulieren. Weiterhin spricht für die Komplexbildung von atToc159 mit atToc33, dass in der *atToc33*-Mutante ebenfalls atToc159 in reduziertem Gehalt vorliegt (siehe Abb. 3.26, 3.30).

Aus den Ergebnissen der Coimmunpräzipitationen lässt sich des Weiteren ableiten, dass atToc159 gleichermaßen mit atToc33 als auch atToc34 Komplexe bildet, denn sowohl mit α Toc33, als auch α Toc34 wurden die selben Mengen an vorhandenem atToc159 coimmunpräzipitiert. Ebenso wurde mit dem Toc159A-Antikörper jeweils dieselbe Menge an vorhandenem atToc33 und atToc34 coimmunpräzipitiert (siehe Abb. 3.35).

Ob atToc159 gleichzeitig Komplexe mit atToc33 und atToc34 bildet oder jeweils mit nur einem Protein, konnte nicht endgültig geklärt werden. Die Ergebnisse der Coimmunpräzipitation mit α Toc33 und α Toc34 (siehe Abb. 3.35) weisen jedoch darauf hin, dass sehr wahrscheinlich nur ein Toc34-Homologer zusammen mit atToc159 Komplexe bildet, denn es wurden jeweils nur sehr geringe Mengen des jeweils anderen Homologen coimmunpräzipitiert, wobei diese Signale vermutlich als unspezifisch anzusehen sind, wie schon im Abschnitt 3.3.6 erörtert.

AtToc132 und atToc75 interagieren mit atToc34, wie anhand der Coimmunpräzipitation

mit dem Toc132A-Antikörper zu sehen ist (siehe Abb. 3.35). Bestätigt wird dieses durch die umgekehrte Coimmunpräzipitation von atToc132 mit dem Toc34-Antikörper. Mit dem Toc33-Antikörper wird ebenfalls atToc132 coimmunpräzipitiert, allerdings in geringeren Mengen als mit dem Toc34-Antikörper. Dieses deutet darauf hin, dass atToc132 bevorzugt mit atToc34 und zu geringeren Teilen auch mit atToc33 interagiert.

Für einen Komplex, der atToc120 enthält, konnten weder durch die BN-Analysen noch durch die Coimmunpräzipitation mit dem atToc120-Antikörper weitere Komponenten des Komplexes identifiziert werden. Es ist jedoch möglich, dass atToc120 Komplexe mit atToc34 bildet, denn es ist in der Coimmunpräzipitation mit α Toc34 ein schwaches Signal für atToc120 sichtbar, welches bei der Coimmunpräzipitation mit α Toc33 nicht zu sehen ist (siehe Abb. 3.35). Dieses wird unterstützt durch weitere, hier nicht gezeigte Coimmunpräzipitationen mit solubilisierten Membranen aus der *atToc132*-Mutante in denen sowohl mit α Toc34 als auch α Toc33 ein eindeutiges Signal für atToc120 zu detektieren war. Da mit α Toc34 ein stärkeres Signal zu beobachten war, ist anzunehmen, dass atToc120 bevorzugt mit atToc34 und zu geringeren Teilen auch mit atToc33 interagiert.

Die hier diskutierten Ergebnisse bezüglich der Zusammensetzung passen größtenteils zu den Beobachtungen von Ivanova et al. (2004). Auch sie konnten die Toc159-Homologen jeweils mit atToc75, atToc33 und atToc34 präzipitieren, wobei sie aus ihren Ergebnissen geschlussfolgert haben, dass atToc159 präferentiell mit atToc33 interagiert, während atToc132 und atToc120 mit atToc34 Komplexe bilden. Die vornehmliche Interaktion von atToc132 und atToc120 mit atToc34 konnte bestätigt werden, aber im Gegensatz zu ihren Ergebnissen weisen sowohl die Coimmunpräzipitationen als auch weitere Untersuchungen darauf hin, dass atToc159 zu gleichen Teilen mit atToc33 und atToc34 assoziiert. Allerdings zeigt die in dieser Arbeit als auch die von Ivanova et al. (2004) durchgeführte Analyse der Komplexzusammensetzung, dass ganz offensichtlich kein Toc159-Homologer ausschließlich Komplexe mit nur einem Toc34-Homologen bildet, sondern dass vielmehr alle Toc159-Homologen in der Lage sind sowohl Komplexe mit atToc33 als auch atToc34 zu bilden.

Die Charakterisierung der Toc-Komplexe in *Arabidopsis thaliana* zeigt, dass sich diese grundsätzlich nicht von denen aus Erbse unterscheiden. Es ist jeweils das porenbildende Toc75 und ein homologes Rezeptorprotein von Toc34 und Toc159 enthalten. Unter der Annahme, dass die für Erbse ermittelte Stöchiometrie von 1:4:4-5 zwischen Toc159, Toc75 und Toc34 stimmt (Schleiff et al., 2003b), und auch auf *Arabidopsis* anwendbar

ist, würde der atToc159-Komplex ein Molekulargewicht von 662 – 700 kDa aufweisen, je nachdem, ob 4 oder 5 atToc33 oder atToc34 enthalten wären. Diese Komplexgröße stimmt annähernd mit dem in der BN-PAGE-Analyse ermittelten Molekulargewicht von 700 – 900 kDa überein. Die leichte Verschiebung zum höheren Molekulargewicht könnte darauf zurückzuführen sein, dass weitere, hier nicht untersuchte Toc-Komponenten, wie z. B. Toc64 und Toc12 an die Komplexe gebunden sind. Für den atToc132-Komplex ergäbe sich analog eine Größe von 632 – 670 kDa und für atToc120 eine Größe von 602 – 640 kDa. Beide Größen korrelieren ebenfalls mit den beobachteten Molekulargewichten von 600 – 800 für den atToc132-Komplex und 550 – 800 für den atToc120-Komplex.

4.2 Funktion der Toc159-Rezeptorfamilie

Neben der Größe und Zusammensetzung der Komplexe wurde in dieser Arbeit untersucht, welche Funktion die Toc159-Homologen atToc159, atToc132 und atToc120 in *Arabidopsis thaliana* besitzen. Dazu wurden die Phänotypen von *Arabidopsis*-Nullmutanten für diese Gene miteinander verglichen und ihre Protein- und Transkriptgehalte ebenfalls vergleichend analysiert.

4.2.1 Hinweise auf unterschiedliche Funktionen für atToc159, atToc132 und atToc120

Die Phänotypen der Mutanten für *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* geben Hinweise auf eine unterschiedliche Funktion der Rezeptorproteine. Während *atToc159* einen albino Phänotyp aufweist und *atToc132* einen leicht gelblich gescheckten Phänotyp, ist *atToc120* äußerlich nicht vom WT zu unterscheiden (siehe Abb. 3.15, 3.18). Dieses zeigt, dass atToc159 möglicherweise gegenüber atToc132 und atToc120 eine unterschiedliche Funktion aufweist, da diese die Funktion von atToc159 in der *atToc159*-Mutante nicht, oder nur geringfügig, kompensieren können. Gleiches gilt für die *atToc132*-Mutante, auch hier ist offenbar kein anderes Rezeptorprotein in der Lage die Funktion voll zu übernehmen. Lediglich das Fehlen von atToc120 kann offensichtlich durch ein anderes homologes Protein kompensiert werden.

Die Phänotypen wären andererseits auch durch eine unterschiedlich starke Expression der Toc159-Homologen zu erklären. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass atToc159 offensichtlich in den Blättern stärker exprimiert wird als atToc132 und atToc120, wobei atToc120 die geringsten Proteinmengen im WT aufweist. Dieses ist daran zu erkennen, dass mit den Antikörpern gegen atToc159, atToc132 und atToc120 in *Arabidopsis*-Blättern die stärksten Signale für atToc159 erhalten werden, wogegen atToc120 nur schwer zu detektieren ist (siehe Abb. 3.7). Dies korreliert mit den ermittelten Transkriptgehalten für atToc159, atToc132 und atToc120 (Bauer et al., 2000; Yu und Li, 2001; Kubis et al., 2004; Ivanova et al., 2004). Es wäre also möglich, dass das Fehlen von atToc159 aufgrund seiner Häufigkeit einen stärkeren Effekt hervorruft als das Fehlen von atToc132 oder atToc120, obgleich alle Proteine möglicherweise die selbe Funktion besitzen. Dieses ist aber offenbar für atToc159 nicht der Fall, denn die *atToc159*-Mutante lässt sich weder durch atToc132, atToc120 noch atToc90 (dem letzten homologen Mitglied der Toc159-Familie) unter der Kontrolle eines starken, konstitutiven Promotors komplementieren (Ivanova et al., 2004; Kubis et al., 2004). Dies weist darauf hin, dass

atToc159 offenbar eine gegenüber atToc132 und atToc120 unterschiedliche Funktion besitzt, welches mit der Beobachtung, dass atToc159 in Komplexen ohne atToc132 und atToc120 vorliegt, sehr gut vereinbar ist.

Ein Vergleich der Aminosäuresequenzen der drei Toc159-Homologen zeigt, dass atToc159 zu atToc132 und atToc120 nur zu 37 bzw. 40% identisch ist (siehe Tab. 3.1). Dagegen weisen atToc132 und atToc120 untereinander eine Identität von 76% auf. Es ist ebenfalls zu beobachten, dass atToc159 in den Blättern viel stärker exprimiert wird als in den Wurzeln. Im Gegensatz dazu liegt von atToc132 in den Wurzeln nahezu der selbe Proteingehalt wie in den Blättern vor. Selbiges wurde für atToc120 beobachtet (siehe Abb. 3.31). Sowohl die hohe Homologie zwischen atToc132 und atToc120 als auch das selbe Expressionsmuster in den Blättern und Wurzeln weisen darauf hin, dass sie möglicherweise eine ähnliche Funktion besitzen. Weitere Hinweise darauf geben die erhöhten Transkriptgehalte für *atToc132* und *atToc120* in der jeweils anderen Nullmutante (siehe Tab. 3.2), auch wenn keine Erhöhung der Proteingehalte nachweisbar ist (siehe Abb. 3.26). Unterstützt wird diese These jedoch durch den embryo- oder keimlingsletalen Phänotyp von *atToc132/atToc120*-Doppelmutanten (Ivanova et al., 2004; Kubis et al., 2004). Während in der *atToc120*-Mutante noch ein Rezeptorprotein anwesend war, das seine Funktion übernehmen konnte, ist dieses in der *atToc132/atToc120*-Doppelmutante nicht mehr vorhanden. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Funktion von atToc120 in der *atToc120*-Mutante von atToc132 übernommen wurde. Der leicht gelblich gescheckte Phänotyp der *atToc132*-Mutante beruht möglicherweise auf der sehr geringen Expression von atToc120, so dass atToc120 allein aufgrund seiner Menge das Fehlen von atToc132 nicht kompensieren kann. AtToc132 besitzt offenbar eine ähnliche, wenn nicht gar die selbe Funktion wie atToc120.

Es ist anzunehmen, dass atToc159, atToc132 und atToc120 wie ihr Homolog aus Erbse ebenfalls als Rezeptorproteine für Vorstufenproteine dienen. Die hier beobachtete unterschiedliche Funktion von atToc159 gegenüber atToc132 und atToc120 ist demnach sehr wahrscheinlich auf unterschiedliche Substratspezifitäten der Rezeptorproteine zurückzuführen. Hinweise darauf liefern auch die Ergebnisse von Smith et al. (2004) und Ivanova et al. (2004). Sie haben in *in vitro* Bindungsanalysen eine spezifische Bindung von atToc159 an die photosynthetischen Vorstufenproteine pSSU und pFd beobachtet, die sich nicht von den nicht-photosynthetischen Vorstufenproteinen pL11 (50S ribosomales Protein L11) bzw. pE1 α (E1 α Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase) kompetieren ließ. Im Gegensatz dazu konnten sie eine spezifische Bindung von atToc132 an pE1 α detektieren.

Dies wirft die Frage auf, welche Gruppe von Vorstufenproteinen über einen atToc159-Komplex bzw. atToc132- oder atToc120-Komplex transportiert werden. In der Literatur wird angenommen, dass atToc159 für den Transport von reichlich vorhandenen photosynthetischen Proteinen zuständig ist, während atToc132 bzw. atToc120 atToc34 den Transport von nicht-photosynthetischen Proteinen, den sogenannten *housekeeping*-Proteinen, gewährleisten (Bauer et al., 2000; Kubis et al., 2004; Jarvis und Robinson, 2004; Bédard und Jarvis, 2005). Wie im nächsten Abschnitt gezeigt wird, ist atToc159 offensichtlich nicht nur am Transport von photosynthetischen Proteinen beteiligt.

4.2.2 Potentielle Substrate von atToc159

Die Funktion von atToc159 ist in grünem Gewebe offensichtlich bedeutender als in den Wurzeln, wie anhand der größeren Proteinmenge in den Blättern zu beobachten ist (Abb. 3.31). Dieses korreliert mit dem Phänotyp von *atToc159*, der eindeutig einen Defekt in der Chloroplastenbiogenese aufweist (siehe Abb. 3.15, 3.17) (Bauer et al., 2000). Beide Beobachtungen führen zur Annahme, dass atToc159 sehr wahrscheinlich als Rezeptor für photosynthetische Proteine dient. Da aber atToc159 auch in Wurzeln vorkommt, wenn auch in geringeren Mengen als in den Blättern, ist atToc159 vermutlich auch am Transport von nicht-photosynthetischen Proteinen beteiligt.

Für die Annahme, dass atToc159 als Rezeptor für photosynthetische Proteine dient, spricht, dass alle untersuchten photosynthetischen Proteine in der *atToc159*-Mutante drastisch gegenüber dem WT reduziert sind (siehe Abb. 3.20). Weitere Untersuchungen zum Gehalt von plastidären Proteinen mittels Western- und 2D-Gelanalyse in *atToc159* zeigen, dass neben den reduzierten photosynthetischen Proteinen auch einige nicht-photosynthetische Proteine in geringeren Mengen in der Mutante akkumulieren (siehe Abb. 3.21, Tab. 3.3). Darunter sind Proteine ganz unterschiedlicher Funktion. Dieses zeigt, dass atToc159 offensichtlich als Rezeptor für photosynthetische als auch nicht-photosynthetische Proteine dient. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass einzelne verringerte Proteingehalte sowohl photosynthetischer als auch nicht-photosynthetischer Proteine indirekt durch das Fehlen anderer nicht transportierter Plastidenproteine verursacht werden.

Es ist bekannt, dass die Genexpression von kernkodierten Plastidenproteinen durch den Zustand der Plastiden beeinflusst wird, indem sie Signale an den Kern senden, welche die Genexpression regulieren (Surpin et al., 2002; Fey et al., 2005; Nott et al., 2006). Es wurde untersucht, welche Gene in der *atToc159*-Mutante ein verändertes Verhalten

gegenüber dem WT zeigen, um Hinweise auf mögliche Substrate von atToc159 zu erhalten. Eine Analyse der mRNA-Gehalte von kernkodierten Plastidenproteinen in der *atToc159*-Mutante mittels eines DNA-Arrays ergab, dass der größte Teil der Gene im Vergleich zum WT stärker exprimiert wurde (54%), während 40% unveränderte und nur 6% der Gene geringere Expressionen zeigten. Dabei ist auffällig, dass die Gruppe der photosynthetischen Gene am stärksten herabreguliert wurde. Dies korreliert mit der vorherigen Beobachtung, dass die photosynthetischen Proteine nur in sehr geringen Mengen in der Mutante akkumulieren und deutet darauf hin, dass die im Import betroffenen Proteine in der *atToc159*-Mutante transkriptionell reprimiert wurden. Das ist gut an der kleinen Untereinheit der RubisCO (pSSU) zu sehen, für die auch eine spezifische Bindung mit atToc159 nachgewiesen wurde (Smith et al., 2004).

Ein zur *atToc159*-Mutante sehr ähnliches Expressionsmuster wurde von Kubis et al. (2003) im DNA-Array der *atToc33*-Mutante beobachtet. Auch dort sind viele photosynthetische Gene stark herabreguliert, von denen angenommen wird, dass es sich um Substrate von atToc33 handelt.

Vergleicht man den Anteil der herabregulierten photosynthetischen Gene, mit denen aller herabregulierten Gene im DNA-Array, dann fällt auf, dass diese nur 25% darstellen. Bei den restlichen 75% handelt es sich um kernkodierte, nicht-photosynthetische Proteine, wie z. B. der Carboanhydrase, für die ebenfalls ein verringerter Proteingehalt in der *atToc159*-Mutante nachweisbar war. Dieses kann ebenfalls als Hinweis dafür angesehen werden, dass sowohl photosynthetische als auch nicht-photosynthetische Proteine als Substrate von atToc159 in Frage kommen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass einige Gene indirekt durch das Fehlen anderer Proteine co-reprimiert werden.

Eine Gemeinsamkeit fast aller in der *atToc159*-Mutante reduzierten Proteine, die ebenfalls einen verringerten Transkriptgehalt in der Mutante aufweisen, sind ihre normalerweise hohen Transkriptgehalte im WT. Dies ist gleichermaßen in der gesamten Gruppe der herabregulierten Gene im DNA-Array zu beobachten, während die Gruppe der unveränderten und hochregulierten Gene normalerweise geringere Transkriptgehalte im WT aufweisen. Unter der Annahme, dass die stark exprimierten Gene nicht maßgeblich einer zusätzlichen posttranskriptionellen Regulation unterliegen, lässt dies vermuten, dass atToc159 als Rezeptor für stark exprimierte Proteine dient.

Diese These wird durch die Ergebnisse der 2D-Gelanalyse der *atToc159*-Mutante unterstützt, denn die Proteine, die einen verringerten Proteingehalt in der *atToc159*-Mutante aufweisen sind im WT als stark exprimierte Proteinspots zu detektieren (siehe Abb. 3.23), wobei die nicht-photosynthetischen Proteine (Spot 11 – 14) ebenso starke Signalintensitäten aufweisen wie die photosynthetischen Proteine (Spot 1 – 10).

Da selbst in der *atToc159*-Albinomutante die möglichen Substrate von *atToc159* noch in geringen Mengen akkumulieren, und in heterotropher Kultur sogar die Bildung von Thylakoiden (siehe Abb. 3.17) mit offenbar funktionsfähigen Photosystemen stattfindet, welches anhand der leichten Ergrünung der Pflanze (siehe Abb. 3.16) und einer messbaren Effizienz des PSII zu beobachten ist (persönliche Mitteilung von Dr. Gutensohn), erfolgt der Import dieser Proteine auf einem anderen Weg als über den *atToc159*-Rezeptor. Dies geschieht sehr wahrscheinlich über die anderen Rezeptoren, aber offenbar mit einer viel geringeren Effizienz, so dass ein photoautotrophes Wachstum ohne *atToc159* nicht möglich ist. Nur durch die Anzucht auf saccharosehaltigem Medium bleibt der *atToc159*-Mutante offenbar genügend Zeit, um einige, unter anderem für die Photosynthese benötigte, Proteine zu importieren.

4.2.3 Potentielle Substrate von *atToc132*

Der nahezu gleich hohe Proteingehalt von *atToc132* in den Blättern und Wurzeln (Abb. 3.31) lässt vermuten, dass *atToc132* für den Transport von Proteinen verantwortlich ist, die sowohl in Chloroplasten als auch anderen Plastiden benötigt werden.

Wie in Abschnitt 4.2.1 erörtert, besitzt *atToc132* offenbar zu *atToc159* unterschiedliche Substratspezifitäten. Dieses spiegelt sich beim Vergleich der Proteomanalyse von *atToc159* mit einer ähnlichen von Kubis et al. (2004) durchgeführten Analyse der *atToc132*-Mutante wieder. Für viele der in der *atToc159*-Mutante reduzierten Proteine ist in der *atToc132*-Mutante ein unveränderter (Peptidyl-prolyl cis-trans Isomerase, kleine Untereinheit der RubisCO) oder gar erhöhter (Ribulosephosphat-Kinase) Proteingehalt nachweisbar. Die Ergebnisse der Western-Analysen in dieser Arbeit (siehe 3.22) ergaben weiterhin, dass für einige photosynthetische Proteine und Chaperone kein veränderter Proteingehalt nachweisbar war. Dieses weist darauf hin, dass *atToc132* nicht am Transport der genannten Proteine beteiligt ist. Es ist aber nicht auszuschließen, dass *atToc120* zum Teil das Fehlen von *atToc132* in der *atToc132*-Mutante kompensiert und einige Substrate von *atToc132* in einem unverändertem Gehalt vorliegen.

Die Ergebnisse der Proteomanalyse von Kubis et al. (2004) zeigen ebenfalls, dass nur 4 der analysierten Proteine in reduzierten Mengen in der *atToc132*-Mutante vorliegen. Dabei handelt es sich um zwei Enzyme des Aminosäurestoffwechsels und zwei Isoenzyme der Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase aus dem Calvin-Zyklus. In den hier durchgeführten Western-Analysen wurden zwei weitere, wenn auch nur geringfügig reduzierte Proteine identifiziert (plastidäre Glutaminsynthetase und Hcf136). Dieses würde darauf hindeuten, dass *atToc132* sowohl am Transport von photosynthetischen als auch nicht-

photosynthetischen Proteinen beteiligt ist. Allerdings sind die Fruktose-1,6-bisphosphat Aldolase, Hcf136 und die Glutaminsynthetase ebenfalls in der *atToc159*-Mutante reduziert. Da zuvor gezeigt wurde, dass *atToc132* gegenüber *atToc159* unterschiedliche Substratspezifitäten aufweist, kann der verringerte Gehalt dieser Proteine nur in einer Mutante direkt durch das Fehlen eines Rezeptors verursacht sein. Es ist somit unklar, ob diese Proteine als Substrate von *atToc132* oder *atToc159* in Frage kommen.

Es ist ungewöhnlich, dass bei der von Kubis et al. (2004) durchgeführten Proteomanalyse nur vier gegenüber dem WT reduzierte Proteine identifiziert wurden, obgleich *atToc132* sicherlich als Rezeptor für weitere Vorstufenproteine dient. Es könnte sein, dass, wie schon zuvor erwähnt, möglicherweise *atToc120* zum Teil das Fehlen von *atToc132* kompensiert. *AtToc120* wird jedoch viel geringer exprimiert und die *atToc132*-Mutante weist einen leicht gelblich gescheckten Phänotyp auf, deshalb kann der *atToc120*-Rezeptor auf keinem Fall das Fehlen von *atToc132* gänzlich kompensieren.

Eine zweite Begründung wäre, dass die im Import betroffenen Proteine mit dieser Methode nicht detektiert werden, da sie nur gering exprimiert werden. Die von Kubis et al. (2004) durchgeführte zweidimensionale Gelelektrophorese wurde mit Fluoreszenzfarbstoff markierten Chloroplastenproteinen durchgeführt. Die eingesetzte Methode ist nicht so sensitiv wie die Silberfärbung (Tonge et al., 2001), mit der bis zu 10 ng Protein nachweisbar sind. Unter der Annahme der gleichen Sensitivität würde das bedeuten, dass Proteine, die weniger als 0,02% der eingesetzten Proteinmenge (50 μ g) ausmachen, nicht detektiert werden können. Die Sensitivität der Fluoreszenzmarkierung ist jedoch geringer, weshalb die Nachweisgrenze der Proteine noch über 0,02% der eingesetzten Proteinmenge liegt. Da die photosynthetischen Proteine, den größten Teil im Gesamtextrakt aus Chloroplasten ausmachen, ist es durchaus möglich, dass ein großer Teil der Proteine unter diese Nachweisgrenze fällt. Somit wären mögliche Veränderungen im Proteingehalt von gering exprimierten Proteinen nicht zu detektieren.

4.3 Schlussfolgerungen und Arbeitsmodell

Die hier diskutierten Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unter Hinzunahme der aktuellen Veröffentlichungen anderer Arbeitsgruppen führen zu dem in Abb. 4.1 dargestellten Arbeitsmodell der Komplexzusammensetzung und Substratspezifität der Toc159-Homologen in *Arabidopsis thaliana*.

Es enthält prinzipiell das in der Literatur beschriebene Modell, welches davon ausgeht, dass atToc159 zusammen mit atToc33 für den Transport der reichlich vorhandenen photosynthetischen Proteine verantwortlich ist, während atToc132 bzw. atToc120 zusammen mit atToc34 den Transport von nicht-photosynthetischen Proteinen gewährleisten (Kubis et al., 2004; Bédard und Jarvis, 2005; Kessler und Schnell, 2006).

Dieses Modell wurde aber erweitert, da die Zusammensetzung der Komplexe vielfältiger ist. Es stehen offenbar mehrere Toc-Komplexe für den Import von Vorstufenproteinen zur Verfügung, die sich jeweils aus einem Rezeptorprotein der Toc159-Familie, dem Translokationskanal atToc75 und den Rezeptoren atToc33 oder atToc34 zusammensetzen.

Zum anderen gibt es einige Hinweise darauf, dass atToc159 sowohl am Transport photosynthetischer als auch nicht-photosynthetischer Proteine beteiligt ist, wie erstmals in dieser Arbeit gezeigt wurde. Deshalb ist die funktionelle Einteilung der potentiellen Substrate von atToc159 gegenüber atToc132 und atToc120 in photosynthetische Proteine gegenüber nicht-photosynthetische Proteine nicht länger haltbar. Es muss eine andere Gemeinsamkeit der Substrate geben, die über einen atToc159- oder atToc132 bzw. atToc120-Komplex transportiert werden. Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass eine Einteilung in stark gegenüber schwach exprimierte Proteine zutreffender ist. Dies passt zu der in der Literatur beschriebenen These, warum zwei Importwege mit unterschiedlichen Substratspezifitäten existieren. Laut Kubis et al. (2003) verhindern die substratspezifischen Proteinimportwege, dass die weniger häufigen nicht-photosynthetischen Proteine mit den reichlich vorhandenen photosynthetischen Proteinen um einen Rezeptor konkurrieren müssen. Ihre These beruhte darauf, dass für atToc159 bisher nur photosynthetische Proteine als potentielle Substrate nachgewiesen wurden, welche wiederum bekanntermaßen in größeren Mengen vorkommen. Diese These kann nun allgemein auf reichlich vorhandene Proteine ausgedehnt werden.

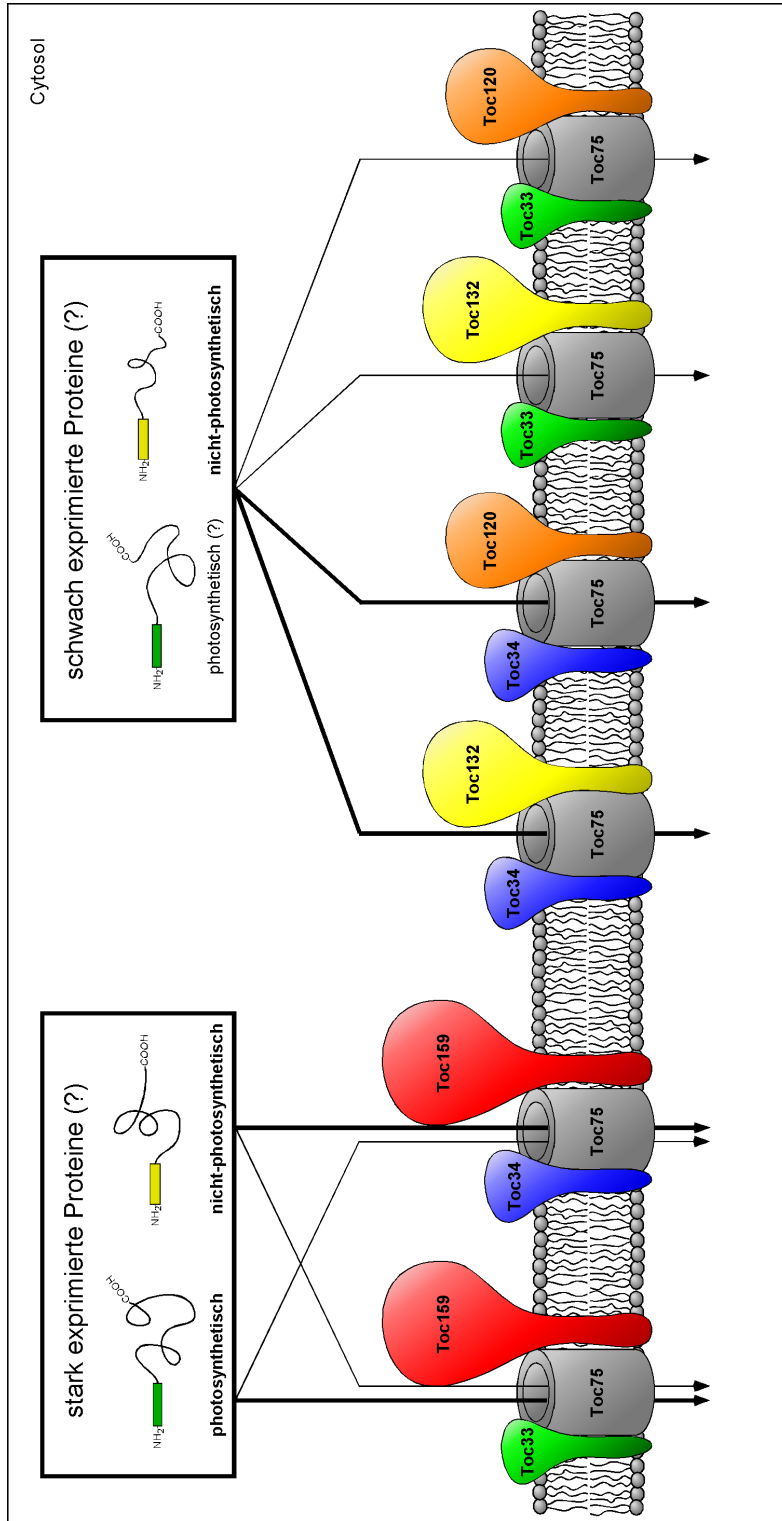


Abb. 4.1: Arbeitsmodell zur Komplexzusammensetzung und Substratspezifität der Toc159-homologen in *Arabidopsis thaliana*. In *Arabidopsis thaliana* existieren verschiedene Toc-Komplexe, die sich jeweils aus einem Rezeptorprotein der Toc159-Familie, dem Translokationskanal atToc75 und atToc33 bzw. atToc34 zusammensetzen. Diese Komplexe sind für den Import von unterschiedlichen Substratgruppen verantwortlich, wobei die Komplexe, die atToc159 enthalten wahrscheinlich am Transport von stark exprimierten Proteinen beteiligt sind, während die Komplexe mit atToc132 und atToc120 vermutlich den Transport von gering exprimierten Proteinen gewährleisten. Sowohl atToc159 und atToc33 werden am stärksten in Blättern exprimiert, weshalb der Transport von photosynthetischen Proteinen sehr wahrscheinlich vorwiegend über den atToc159/atToc75/atToc33-Komplex erfolgt.

Der Import von stark exprimierten Vorstufenproteinen erfolgt offenbar über Komplexe, die sich aus atToc159/atToc75/atToc33- bzw. atToc159/atToc75/atToc34 zusammensetzen. Da atToc159 und atToc33 stärker in Blättern exprimiert werden, ist anzunehmen, dass sie zusammen einen Komplex bilden, der hauptsächlich für den Transport von stark exprimierten photosynthetischen Proteinen verantwortlich ist. Mit atToc34, welches sowohl in Blättern als auch Wurzeln gleich stark exprimiert wird, bildet atToc159 wahrscheinlich Komplexe, die vorzugsweise den Transport von stark exprimierten nicht-photosynthetischen Proteinen gewährleisten. Die Zuordnung der kleinen Rezeptoren ist nur präferentiell, denn die Analyse der *atToc33*-Mutante als auch *in vitro* Bindungsanalysen weisen darauf hin, dass nicht ausschließlich atToc33 als Rezeptor für photosynthetische Proteine und umgekehrt atToc34 als Rezeptor für nicht-photosynthetische dient (Gutensohn et al., 2004; Jelic et al., 2003).

AtToc132 und atToc120 sind, da sie zu atToc159 unterschiedliche Substratspezifitäten aufweisen, vermutlich für den Transport von gering exprimierten Proteinen verantwortlich. Dabei handelt es sich sehr wahrscheinlich größtenteils um nicht-photosynthetische Proteine und eventuell auch einige photosynthetische Proteine. Der Transport dieser Proteine erfolgt vorwiegend über die Komplexe mit atToc34, denn atToc132 und atToc120 interagieren primär mit atToc34.

Inzwischen wurden auch in anderen höheren mono- und dikotylen Pflanzen homologe Rezeptorproteine identifiziert (Voigt et al., 2005; Gutensohn et al., 2006), so dass anzunehmen ist, dass das Vorkommen substratspezifischer Importwege generell verbreitet ist. Da offensichtlich eine Einteilung der Vorstufenproteine in verschiedene Gruppen möglich ist, hat dies zur Konsequenz, dass die Transitpeptide strukturelle Unterscheidungsmerkmale besitzen müssen, die bisher noch nicht identifiziert wurden.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die Rolle der Rezeptorkomponenten der Toc159-Familie aus *Arabidopsis thaliana* in den Proteinimportkomplexen der äußeren Hüllmembran von Plastiden genauer analysiert. Es galt zum einen zu klären, ob sie als homologe Proteine die selbe oder aber unterschiedliche Funktionen besitzen. Dazu wurden *Arabidopsis* T-DNA Insertionsmutanten für die Gene *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* isoliert und vergleichend analysiert. Zum anderen galt es die Größe und Zusammensetzung der Toc-Komplexe in *Arabidopsis* zu charakterisieren. Es wurden Antikörper gegen *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* hergestellt, um die homologen Proteine in den Komplexen, die mittels *Blue Native*-PAGE und Coimmunpräzipitationen analysiert wurden, nachweisen zu können.

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind im Folgenden zusammengefasst:

1. Es wurden erfolgreich spezifische Antikörper gegen *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* hergestellt und aufgereinigt. Mit den Antikörpern konnte gezeigt werden, dass *atToc159* ein apparentes Molekulargewicht von 230 kDa, *atToc132* eines von 200 kDa und *atToc120* eines von 170 kDa aufweist. Des Weiteren konnte anhand von löslichen- und Membranproteinfraktionen aus *Arabidopsis* nachgewiesen werden, dass die Rezeptorproteine ausschließlich in Membranen vorkommen.
- 2a. Die Daten der *Blue Native*-PAGE und Coimmunpräzipitationen weisen darauf hin, dass sehr wahrscheinlich nur ein Toc159-Homologer pro Komplex enthalten ist und kein großer Toc-Komplex mit allen Rezeptorproteinen gemeinsam existiert. Diese Komplexe weisen eine Größe von ca. 800 kDa für *atToc159*, 600 – 800 kDa für *atToc132* und 550 – 800 kDa für *atToc120* auf. Alle Toc-Komplexe bestehen aus einem Rezeptorprotein der Toc159-Familie, dem porenbildenden *atToc75* und den Rezeptorproteinen *atToc33* oder *atToc34*. *AtToc159* bildet gleichermaßen Komplexe mit *atToc33* und *atToc34*, während *atToc132* und *atToc120* bevorzugt mit *atToc34* interagieren.

- 2b. Neben der Untersuchung der Toc-Komplexe in den Blättern wurden diese auch in den Wurzeln genauer analysiert. Die Komplexe, die atToc159, atToc132 bzw. atToc120 enthalten, weisen in den Wurzeln die selbe Größe wie in den Blättern auf. Im Unterschied zu den Blättern ist hier jedoch der Komplex, der atToc159 enthält, im Vergleich zu den Komplexen von atToc132 und atToc120 nur in stark verringerten Mengen vorhanden. Dieses kann als Hinweis dafür angesehen werden, dass in den Blättern und Wurzeln zwar die selben Komplexe existieren, aber in unterschiedlichen Mengen vorkommen. Da neben atToc159 auch atToc33 in den Wurzeln nur gering exprimiert wird, ist anzunehmen, dass sie zusammen einen Komplex bilden, dessen Funktion in den Blättern bedeutender ist als in den Wurzeln.
3. Vergleichende Untersuchungen (Phänotyp, Northern, Western, 2D-Analyse, DNA-Array) von Nullmutanten für *atToc159*, *atToc132* und *atToc120* weisen darauf hin, dass atToc159 sehr wahrscheinlich für den Transport von stark exprimierten photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Proteinen verantwortlich ist. Die beiden anderen Rezeptoren atToc120 und atToc132 besitzen offensichtlich andere Substrate als atToc159, wobei es für atToc132 Hinweise gibt, dass es für den Transport von gering exprimierten Proteinen zuständig ist.

Literaturverzeichnis

- Akita, M., Nielsen, E. und Keegstra, K. (1997) Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *J Cell Biol* 136(5):983–994.
- Alonso, J. M., Stepanova, A. N., Leisse, T. J., Kim, C. J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D. K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., Gadrinab, C., Heller, C., Jeske, A., Koesema, E., Meyers, C. C., Parker, H., Prednis, L., Ansari, Y., Choy, N., Deen, H., Geralt, M., Hazari, N., Hom, E., Karnes, M., Mulholland, C., Ndubaku, R., Schmidt, I., Guzman, P., Aguilar-Henonin, L., Schmid, M., Weigel, D., Carter, D. E., Marchand, T., Risseeuw, E., Brogden, D., Zeko, A., Crosby, W. L., Berry, C. C. und Ecker, J. R. (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301 (5633):653–657.
- Baldwin, A., Wardle, A., Patel, R., Dudley, P., Park, S., Twell, D., Inoue, K. und Jarvis, P. (2005) A molecular-genetic study of the *Arabidopsis toc75* gene family. *Plant Physiol* 138(2):715–733.
- Bauer, J., Chen, K., Hiltbunner, A., Wehrli, E., Eugster, M., Schnell, D. und Kessler, F. (2000) The major protein import receptor of plastids is essential for chloroplast biogenesis. *Nature* 403(6766):203–207.
- Baulcombe, D. (2004) RNA silencing in plants. *Nature* 431(7006):356–363.
- Bechtold, N. und Pelletier, G. (1998) In planta *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol* 82: 259–266.
- Becker, D., Kemper, E., Schell, J. und Masterson, R. (1992) New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left T-DNA border. *Plant Mol Biol* 20(6):1195–1197.

- Becker, T., Hritz, J., Vogel, M., Caliebe, A., Bukau, B., Soll, J. und Schleiff, E. (2004a) Toc12, a novel subunit of the intermembrane space preprotein translocon of chloroplasts. *Mol Biol Cell* 15(11):5130–5144.
- Becker, T., Jelic, M., Vojta, A., Radunz, A., Soll, J. und Schleiff, E. (2004b) Preprotein recognition by the Toc complex. *EMBO J* 23(3):520–530.
- Bédard, J. und Jarvis, P. (2005) Recognition and envelope translocation of chloroplast preproteins. *J Exp Bot* 56(419):2287–2320.
- Berghöfer, J. (1998) Charakterisierung von Komponenten der plastidären Proteintransport-maschinerie. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Bertani, G. (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62(3):293–300.
- Birnboim, H. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7(6):1513–1523.
- Bölter, B., May, T. und Soll, J. (1998) A protein import receptor in pea chloroplasts, Toc86, is only a proteolytic fragment of a larger polypeptide. *FEBS Lett* 441(1):59–62.
- Bourne, H. R., Sanders, D. A. und McCormick, F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* 349(6305):117–127.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254.
- Bruce, B. D. (2001) The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim Biophys Acta* 1541(1-2):2–21.
- Bruce, B. (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol* 10(10):440–447.
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lübeck, J., Soll, J. und Heins, L. (1997) The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J* 16(24):7342–7350.
- Carter, C., Pan, S., Zouhar, J., Avila, E. L., Girke, T. und Raikhel, N. V. (2004) The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. *Plant Cell* 16(12):3285–3303.

- Chen, K., Chen, X. und Schnell, D. (2000) Initial binding of preproteins involving the Toc159 receptor can be bypassed during protein import into chloroplasts. *Plant Physiol* 122(3):813–822.
- Chen, K.-Y. und Li, H.-M. (2006) Precursor binding to an 880-kDa Toc complex as an early step during active import of protein into chloroplasts. *Plant J*.
- Chen, X., Smith, M. D., Fitzpatrick, L. und Schnell, D. J. (2002) In vivo analysis of the role of atTic20 in protein import into chloroplasts. *Plant Cell* 14(3):641–654.
- Chou, M.-L., Fitzpatrick, L. M., Tu, S.-L., Budziszewski, G., Potter-Lewis, S., Akita, M., Levin, J. Z., Keegstra, K. und Li, H.-M. (2003) Tic40, a membrane-anchored co-chaperone homolog in the chloroplast protein translocon. *EMBO J* 22(12):2970–2980.
- Cogoni, C. und Macino, G. (2000) Post-transcriptional gene silencing across kingdoms. *Curr Opin Genet Dev* 10(6):638–643.
- Constan, D., Patel, R., Keegstra, K. und Jarvis, P. (2004) An outer envelope membrane component of the plastid protein import apparatus plays an essential role in Arabidopsis. *Plant J* 38(1):93–106.
- Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Sunderhaus, S., Boekema, E. J. und Braun, H.-P. (2006) Respiratory chain supercomplexes in the plant mitochondrial membrane. *Trends Plant Sci* 11(5):232–240.
- Eggermont, K., Goderis, I. und Broekaert, W. (1996) High-throughput rna extraction from plant samples based on homogenisation by reciprocal shaking in the presence of a mixture of sand and glass beads. *Plant Mol Biol Rep* 14:273–279.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S. und von Heijne, G. (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300(4):1005–1016.
- Eriksson, S., Andréasson, E., Ekbom, B., Granér, G., Pontoppidan, B., Taipalensuu, J., Zhang, J., Rask, L. und Meijer, J. (2002) Complex formation of myrosinase isoenzymes in oilseed rape seeds are dependent on the presence of myrosinase-binding proteins. *Plant Physiol* 129(4):1592–1599.
- Feinberg, A. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 132(1):6–13.

- Feinberg, A. und Vogelstein, B. (1984) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* 137(1):266–267.
- Fey, V., Wagner, R., Braütigam, K., Wirtz, M., Hell, R., Dietzmann, A., Leister, D., Oelmüller, R. und Pfannschmidt, T. (2005) Retrograde plastid redox signals in the expression of nuclear genes for chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 280(7):5318–5328.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. und Mello, C. C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391(6669):806–811.
- Gray, M. W. (1989) The evolutionary origins of organelles. *Trends Genet* 5(9):294–299.
- Gray, M. W., Burger, G. und Lang, B. F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283(5407):1476–1481.
- Gutensohn, M., Schulz, B., Nicolay, P. und Flügge, U. (2000) Functional analysis of the two *Arabidopsis* homologues of Toc34, a component of the chloroplast protein import apparatus. *Plant J* 23(6):771–783.
- Gutensohn, M., Pahnke, S., Kolukisaoglu, U., Schulz, B., Schierhorn, A., Voigt, A., Hust, B., Rollwitz, I., Stöckel, J., Geimer, S., Albrecht, V., Flügge, U. I. und Klösgen, R. B. (2004) Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor atToc33 from chloroplasts. *Mol Genet Genomics* 272(4):379–396.
- Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B. und Klösgen, R. B. (2006) Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* 163(3):333–347.
- He, Z., Li, L. und Luan, S. (2004) Immunophilins and parvulins. Superfamily of peptidyl prolyl isomerases in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 134(4):1248–1267.
- Heins, L., Mehrle, A., Hemmler, R., Wagner, R., Kuchler, M., Hörmann, F., Sveshnikov, D. und Soll, J. (2002) The preprotein conducting channel at the inner envelope membrane of plastids. *EMBO J* 21(11):2616–2625.
- Hiltbrunner, A., Bauer, J., Alvarez-Huerta, M. und Kessler, F. (2001a) Protein translocation at the *Arabidopsis* outer chloroplast membrane. *Biochem Cell Biol* 79(5):629–635.

- Hiltbrunner, A., Bauer, J., Vidi, P. A., Infanger, S., Weibel, P., Hohwy, M. und Kessler, F. (2001b) Targeting of an abundant cytosolic form of the protein import receptor at Toc159 to the outer chloroplast membrane. *J Cell Biol* 154(2):309–316.
- Hinnah, S. C., Hill, K., Wagner, R., Schlicher, T. und Soll, J. (1997) Reconstitution of a chloroplast protein import channel. *EMBO J* 16(24):7351–7360.
- Hinnah, S., Wagner, R., Sveshnikova, N., Harrer, R. und Soll, J. (2002) The chloroplast protein import channel Toc75: pore properties and interaction with transit peptides. *Biophys J* 83(2):899–911.
- Hirsch, S., Muckel, E., Heemeyer, F., von Heijne, G. und Soll, J. (1994) A receptor component of the chloroplast protein translocation machinery. *Science* 266(5193):1989–1992.
- Hörmann, F., Kuchler, M., Sveshnikov, D., Oppermann, U., Li, Y. und Soll, J. (2004) Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J Biol Chem* 279(33):34756–34762.
- Husebye, H., Chadchawan, S., Winge, P., Thangstad, O. P. und Bones, A. M. (2002) Guard cell- and phloem idioblast-specific expression of thioglucoside glucohydrolase 1 (myrosinase) in Arabidopsis. *Plant Physiol* 128(4):1180–1188.
- Hust, B. und Gutensohn, M. (2006) Deletion of core components of the plastid protein import machinery causes differential arrest of embryo development in Arabidopsis thaliana. *Plant Biol (Stuttg)* 8(1):18–30.
- Inaba, T., Li, M., Alvarez-Huerta, M., Kessler, F. und Schnell, D. J. (2003) atTic110 functions as a scaffold for coordinating the stromal events of protein import into chloroplasts. *J Biol Chem* 278(40):38617–38627.
- Ivanova, Y., Smith, M., Chen, K. und Schnell, D. (2004) Members of the Toc159 import receptor family represent distinct pathways for protein targeting to plastids. *Mol Biol Cell* 15(7):3379–3392.
- Jackson-Constan, D. und Keegstra, K. (2001) Arabidopsis genes encoding components of the chloroplastic protein import apparatus. *Plant Physiol* 125(4):1567–1576.
- Jarvis, P. und Robinson, C. (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr Biol* 14(24):1064–1077.

- Jarvis, P., Chen, L., Li, H., Peto, C., Fankhauser, C. und Chory, J. (1998) An Arabidopsis mutant defective in the plastid general protein import apparatus. *Science* 282(5386): 100–103.
- Jelic, M., Soll, J. und Schleiff, E. (2003) Two Toc34 homologues with different properties. *Biochemistry* 42(19):5906–5916.
- Keegstra, K. und Froehlich, J. E. (1999) Protein import into chloroplasts. *Curr Opin Plant Biol* 2(6):471–476.
- Keegstra, K., Olsen, J., I und Theg, M., S (1989) Chloroplastic precursors and their transport across the envelope membranes. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40:471–501.
- Kessler, F. und Schnell, D. (2004) Chloroplast protein import: solve the GTPase riddle for entry. *Trends Cell Biol* 14(7):334–338.
- Kessler, F., Blobel, G., Patel, H. und Schnell, D. (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science* 266(5187): 1035–1039.
- Kessler, F. und Schnell, D. J. (2006) The Function and Diversity of Plastid Protein Import Pathways: A Multilane GTPase Highway into Plastids. *Traffic* 7(3):248–257.
- Kikuchi, S., Hirohashi, T. und Nakai, M. (2006) Characterization of the preprotein translocon at the outer envelope membrane of chloroplasts by blue native page. *Plant Cell Physiol.*
- Koncz, C. und Schell, J. (1986) The promoter of *tl-dna* gene 5 controls the tissue-specific expression of chimaeric genes carried by a novel type of agrobacterium binary vector. *Molecular and General Genetics* 204:383–396.
- Kouranov, A. und Schnell, D. (1997) Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J Cell Biol* 139 (7):1677–1685.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B. und Schnell, D. (1998) Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J Cell Biol* 143(4):991–1002.

- Kovacheva, S., Bédard, J., Patel, R., Dudley, P., Twell, D., Ríos, G., Koncz, C. und Jarvis, P. (2005) In vivo studies on the roles of Tic110, Tic40 and Hsp93 during chloroplast protein import. *Plant J* 41(3):412–428.
- Kubis, S., Baldwin, A., Patel, R., Razzaq, A., Dupree, P., Lilley, K., Kurth, J., Leister, D. und Jarvis, P. (2003) The Arabidopsis *ppi1* mutant is specifically defective in the expression, chloroplast import, and accumulation of photosynthetic proteins. *Plant Cell* 15(8):1859–1871.
- Kubis, S., Patel, R., Combe, J., Bédard, J., Kovacheva, S., Lilley, K., Biehl, A., Leister, D., Ríos, G., Koncz, C. und Jarvis, P. (2004) Functional specialization amongst the Arabidopsis Toc159 family of chloroplast protein import receptors. *Plant Cell* 16(8):2059–2077.
- Küchler, M., Decker, S., Hörmann, F., Soll, J. und Heins, L. (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J* 21(22):6136–6145.
- Kurth, J., Varotto, C., Pesaresi, P., Biehl, A., Richly, E., Salamini, F. und Leister, D. (2002) Gene-sequence-tag expression analyses of 1,800 genes related to chloroplast functions. *Planta* 215(1):101–109.
- Laemmli, U. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259):680–685.
- Lübeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E. und Keegstra, K. (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J* 15(16):4230–4238.
- Lichtenthaler, H. und Sprey, B. (1966) Über die osmiophilen globulären einschlüsse der chloroplasten. *Z Naturforschg* 21b:690–697.
- Livak, K. J. und Schmittgen, T. D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25(4):402–408.
- Logan, D. C., Domergue, O., de la Serve, B. T. und Rossignol, M. (1997) A new family of plasma membrane polypeptides differentially regulated during plant development. *Biochem Mol Biol Int* 43(5):1051–1062.

- Ma, Y., Kouranov, A., LaSala, S. und Schnell, D. (1996) Two components of the chloroplast protein import apparatus, IAP86 and IAP75, interact with the transit sequence during the recognition and translocation of precursor proteins at the outer envelope. *J Cell Biol* 134(2):315–327.
- Martin und Herrmann (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* 118(1):9–17.
- Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M. und Penny, D. (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(19):12246–12251.
- May, T. und Soll, J. (2000) 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *Plant Cell* 12(1):53–64.
- McFadden, G. I. (1999) Endosymbiosis and evolution of the plant cell. *Curr Opin Plant Biol* 2(6):513–519.
- Meurer, J., Plücker, H., Kowallik, K. V. und Westhoff, P. (1998) A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 17(18):5286–5297.
- Miroux, B. und Walker, J. (1996) Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. *J Mol Biol* 260(3):289–298.
- Molik, S. (2005) Das plastidäre Rieske Fe/S-Protein: Analyse des Transport und Assemblierungsprozesses. Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg.
- Mullis, K. und Faloona, F. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155:335–350.
- Nakrieko, K., Mould, R. und Smith, A. (2004) Fidelity of targeting to chloroplasts is not affected by removal of the phosphorylation site from the transit peptide. *Eur J Biochem* 271(3):509–516.
- Nielsen, E., Akita, M., Davila-Aponte, J. und Keegstra, K. (1997) Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *EMBO J* 16(5):935–946.

- Nott, A., Jung, H.-S., Koussevitzky, S. und Chory, J. (2006) Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annu Rev Plant Biol* 57:739–759.
- Olsen, L. J. und Keegstra, K. (1992) The binding of precursor proteins to chloroplasts requires nucleoside triphosphates in the intermembrane space. *J Biol Chem* 267(1): 433–439.
- Osmark, P., Boyle, B. und Brisson, N. (1998) Sequential and structural homology between intracellular pathogenesis-related proteins and a group of latex proteins. *Plant Mol Biol* 38(6):1243–1246.
- Pain, D. und Blobel, G. (1987) Protein import into chloroplasts requires a chloroplast ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(10):3288–3292.
- Peltier, J. B., Ytterberg, J., Liberles, D. A., Roepstorff, P. und van Wijk, K. J. (2001) Identification of a 350-kDa ClpP protease complex with 10 different Clp isoforms in chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 276(19):16318–16327.
- Perry, S. und Keegstra, K. (1994) Envelope membrane proteins that interact with chloroplastic precursor proteins. *Plant Cell* 6(1):93–105.
- Qbadou, S., Becker, T., Bionda, T., Reger, K., Ruprecht, M., Soll, J. und Schleiff, E. (2007) Toc64 - A Preprotein-receptor at the Outer Membrane with Bipartite Function. *J Mol Biol.*
- Richly, E. und Leister, D. (2004) An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene* 329:11–16.
- Richly, E., Dietzmann, A., Biehl, A., Kurth, J., Laloi, C., Apel, K., Salamini, F. und Leister, D. (2003) Covariations in the nuclear chloroplast transcriptome reveal a regulatory master-switch. *EMBO Rep* 4(5):491–498.
- Richter, S. und Lamppa, G. (2002) Determinants for removal and degradation of transit peptides of chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* 277(46):43888–43894.
- Rosso, M., Li, Y., Strizhov, N., Reiss, B., Dekker, K. und Weisshaar, B. (2003) An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Mol Biol* 53(1-2):247–259.

- Sambrook, J., Fritsch, E. und Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199(2):223–231.
- Schägger, H., Cramer, W. und von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal Biochem* 217(2):220–230.
- Schattat, M., Klösgen, R. und Marques, J. (2004) A Novel Vector for Efficient Gene Silencing in Plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 22:146–153.
- Schimper, A. (1883) Über die entwicklung der chlorophyllkörner und farbkörper. *Bot. Zeitung* 41:105–114, 121–131, 137–146, 153–162.
- Schleiff, E., Soll, J., Sveshnikova, N., Tien, R., Wright, S., Dabney-Smith, C., Subramanian, C. und Bruce, B. (2002) Structural and guanosine triphosphate/diphosphate requirements for transit peptide recognition by the cytosolic domain of the chloroplast outer envelope receptor, Toc34. *Biochemistry* 41(6):1934–1946.
- Schleiff, E., Jelic, M. und Soll, J. (2003a) A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(8):4604–4609.
- Schleiff, E., Soll, J., Kuchler, M., Kühlbrandt, W. und Harrer, R. (2003b) Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *J Cell Biol* 160(4):541–551.
- Schnell, D. J., Blobel, G., Keegstra, K., Kessler, F., Ko, K. und Soll, J. (1997) A consensus nomenclature for the protein-import components of the chloroplast envelope. *Trends in Cell Biology* 7:303–304.
- Schnell, D. und Blobel, G. (1993) Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites. *J Cell Biol* 120(1):103–115.
- Schnell, D., Kessler, F. und Blobel, G. (1994) Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* 266(5187):1007–1012.

- Seedorf, M., Waagemann, K. und Soll, J. (1995) A constituent of the chloroplast import complex represents a new type of GTP-binding protein. *Plant J* 7(3):401–411.
- Smith, M., Rounds, C., Wang, F., Chen, K., Afithile, M. und Schnell, D. (2004) atToc159 is a selective transit peptide receptor for the import of nucleus-encoded chloroplast proteins. *J Cell Biol* 165(3):323–334.
- Sohrt, K. und Soll, J. (2000) Toc64, a new component of the protein translocon of chloroplasts. *J Cell Biol* 148(6):1213–1221.
- Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98(3):503–517.
- Studier, F. W. und Moffatt, B. A. (1986) Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189(1):113–130.
- Subramanian, C., Ivey, R. und Bruce, B. D. (2001) Cytometric analysis of an epitope-tagged transit peptide bound to the chloroplast translocation apparatus. *Plant J* 25(3):349–363.
- Sugiura, M. (1995) The chloroplast genome. *Essays Biochem* 30:49–57.
- Sun, Y., Forouhar, F., Li Hm, H., Tu, S., Yeh, Y., Kao, S., Shr, H., Chou, C., Chen, C. und Hsiao, C. (2002) Crystal structure of pea Toc34, a novel GTPase of the chloroplast protein translocon. *Nat Struct Biol* 9(2):95–100.
- Surpin, M., Larkin, R. M. und Chory, J. (2002) Signal transduction between the chloroplast and the nucleus. *Plant Cell* 14 Suppl:S327–S338.
- Sveshnikova, N., Grimm, R., Soll, J. und Schleiff, E. (2000a) Topology studies of the chloroplast protein import channel Toc75. *Biol Chem* 381(8):687–693.
- Sveshnikova, N., Soll, J. und Schleiff, E. (2000b) Toc34 is a preprotein receptor regulated by GTP and phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(9):4973–4978.
- Theg, S. M., Bauerle, C., Olsen, L. J., Selman, B. R. und Keegstra, K. (1989) Internal ATP is the only energy requirement for the translocation of precursor proteins across chloroplastic membranes. *J Biol Chem* 264(12):6730–6736.

- Tonge, R., Shaw, J., Middleton, B., Rowlinson, R., Rayner, S., Young, J., Pognan, F., Hawkins, E., Currie, I. und Davison, M. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1(3):377–396.
- Tranel, P., Froehlich, J., Goyal, A. und Keegstra, K. (1995) A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. *EMBO J* 14(11):2436–2446.
- Überlacker, B., Klinge, B. und Werr, W. (1996) Ectopic expression of the maize homeobox genes *ZmHox1a* or *ZmHox1b* causes pleiotropic alterations in the vegetative and floral development of transgenic tobacco. *Plant Cell* 8(3):349–362.
- Voigt, A., Jakob, M., Klösgen, R. B. und Gutensohn, M. (2005) At least two Toc34 protein import receptors with different specificities are also present in spinach chloroplasts. *FEBS Lett* 579(6):1343–1349.
- Vojta, A., Alavi, M., Becker, T., Hörmann, F., Kuchler, M., Soll, J., Thomson, R. und Schleiff, E. (2004) The protein translocon of the plastid envelopes. *J Biol Chem* 279(20):21401–21405.
- Waegemann, K. und Soll, J. (1996) Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* 271(11):6545–6554.
- Waegemann, K. und Soll, J. (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* 1:149–158.
- Weibel, P., Hiltbrunner, A., Brand, L. und Kessler, F. (2003) Dimerization of Toc-GTPases at the chloroplast protein import machinery. *J Biol Chem* 278(39):37321–37329.
- Wessel, D. und Flügel, U. (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem* 138(1):141–143.
- Wu, C., Seibert, F. S. und Ko, K. (1994) Identification of chloroplast envelope proteins in close physical proximity to a partially translocated chimeric precursor protein. *J Biol Chem* 269(51):32264–32271.
- Young, M., Keegstra, K. und Froehlich, J. (1999) GTP promotes the formation of early-import intermediates but is not required during the translocation step of protein import into chloroplasts. *Plant Physiol* 121(1):237–244.

Yu, T. und Li, H. (2001) Chloroplast protein translocon components atToc159 and atToc33 are not essential for chloroplast biogenesis in guard cells and root cells. *Plant Physiol* 127(1):90–96.

Zhang, X.-P. und Glaser, E. (2002) Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci* 7(1):14–21.

Publikationsliste

Gutensohn, M., Pahnke, S., Kolukisaoglu, U., Schulz, B., Schierhorn, A., Voigt, A., Hust, B., Rollwitz, I., Stöckel, J., Geimer, S., Albrecht, V., Flügge, U. I. und Klösgen, R. B. (2004) Characterization of a T-DNA insertion mutant for the protein import receptor atToc33 from chloroplasts. *Mol Genet Genomics* 272(4):379–396

Gutensohn, M., Fan, E., Frielingsdorf, S., Hanner, P., Hou, B., Hust, B. und Klösgen, R. B. (2006) Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts. *J Plant Physiol* 163(3):333–347

Hust, B. und Gutensohn, M. (2006) Deletion of core components of the plastid protein import machinery causes differential arrest of embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biol (Stuttg)* 8(1):18–30

Hust, B., Biehl, A., Schattat, M., Schierhorn, A., Hause, G., Schulz, B., Leister, D., Klösgen, R. B. und Gutensohn, M. Knockout of the protein import receptor *attoc159* in *Arabidopsis* affects accumulation of abundant chloroplast proteins and can be partially bypassed by an alternative import pathway. *In Vorbereitung*

Hust, B., Jakob, M., Klösgen, R. B. und Gutensohn, M. Analysis of the subunit composition of *toc* protein import complexes from plastids in *Arabidopsis thaliana* reveals distinct complex subtypes. *In Vorbereitung*

Erklärung

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

Halle (Saale),

Bianca Hust

Danksagung

Diese Arbeit wurde am Institut für Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Ralf Bernd Klösgen angefertigt. Ihm danke ich recht herzlich für sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die hilfreichen Diskussionen.

Ein besonderer dank geht an Dr. Michael Gutensohn für die Betreuung dieser Arbeit und seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft. Ihm danke ich auch für die aufbauenden Worte in Zeiten, in denen nichts so recht klappen wollte.

Dr. Mario Jakob danke ich für seine fachliche Hilfe bei allen Problemen rund um die Proteinbiochemie, ganz besonders bei der Reinigung von Antikörpern! Ihm und Stefan sei auch für die kritische Durchsicht dieses Manuskripts gedankt.

Ein weiterer Dank geht an Dr. J. Fröhlich (USA) für die zur Verfügung gestellten Antikörper gegen Tic- und Toc-Komponenten und Dr. B. Hirel (Frankreich) für die Entwicklung von Western Blots mit Antikörpern gegen die Glutamin-Synthetase.

Bei Alexander Biehl und Dario Leister bedanke ich mich für die Kooperation zur Durchführung des DNA-Arrays.

Herrn Dr. G. Hause sei für die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der *atToc159*-Mutante und Frau Dr. A. Schierhorn für die massenspektrometrische Analyse der 2D-Proteinspots gedankt.

Bei allen jetzigen und ehemaligen Mitgliedern der AG Klösgen möchte ich mich ganz herzlich für die sehr gute Arbeitsatmosphäre, den hilfreichen Tipps und Diskussionen und nicht zu vergessen den gemeinsamen außeruniversitären Aktivitäten bedanken ;)

Nicht zuletzt bedanke ich mich ganz besonders bei meinen Eltern, dass Sie mir mein Studium ermöglicht haben, und bei meinen Freunden und Christoph für die vielseitige Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit!

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Bianca Hust
Anschrift: Rainstr.8, 06114 Halle/Saale
Geburtsdatum: 27.02.1977
Geburtsort: Oldenburg, Niedersachsen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1984 – 1987 Grundschule Ganspe
1987 – 1989 Orientierungsstufe Berne
1989 – 1993 Realschule Berne
Abschluß Mittlere Reife
1993 – 1996 Gymnasium Brake (Unterweser)
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

ab 1996 Studium der Biologie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
11/2000 Diplomprüfungen in Botanik, Biochemie und Mikrobiologie
01/2001 – 12/2001 Diplomarbeit, Titel: „Charakterisierung seneszenzabhängig exprimierter Gene der Gerste (*Hordeum vulgare*) mit möglicher Funktion für den Abbau von Galaktolipiden“
02/2002 Abschluß: Diplom-Biologin
seit 06/2002 Arbeiten zur vorliegenden Dissertation am Institut für Pflanzenphysiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter der Leitung von Prof. Dr. R. B. Klösgen