

**Untersuchungen zur Kompartimentierung der  
Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren in  
Höheren Pflanzen**

**Von dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover  
zur Erlangung des Grades  
einer Doktorin der Naturwissenschaften**

**Dr. rer. nat.**

**genehmigte Dissertation**

**von**

**Dipl.-Biol. Nicole Hausmann**

**geboren am 28.07.1970 in Langenhagen**

**2003**

REFERENTIN: PRIV.-DOZ. DR. J. PAPENBROCK

KORREFERENT: PROF. DR. H. LEHMANN

TAG DER PROMOTION: 28.JANUAR 2004

---

## Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Forschungsprojekts sollten Untersuchungen zur Kompartimentierung der Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren in Höheren Pflanzen durchgeführt werden. Hauptsächlich sollten die Folgen einer Beeinträchtigung der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Zentren (Fe/S-Zentren) näher charakterisiert werden. Hierfür wurde mit dem *Arabidopsis*-Wildtyp C24 und der *starik*-Mutante gearbeitet. Bei *starik* handelt es sich um eine Knock-out-Mutante eines mitochondrialen ABC-Transporterproteins (Sta1), das vermutlich Fe/S-Zentren aus den Mitochondrien in das Cytosol befördert. Ein homologes Protein zu Sta1 wurde beim Menschen identifiziert, hier interagiert das Protein mit der ubiquitär vorkommenden Ferrochelatase. Die Ferrochelatase ist ein Schlüsselenzym der Tetrapyrrolobiosynthese, wobei noch nicht eindeutig gezeigt werden konnte, ob das Enzym ausschließlich in den Chloroplasten oder auch in den Mitochondrien lokalisiert ist. Aus diesem Grund wurde eine Tabak-Mutante in die Untersuchungen einbezogen, deren Hämbiosynthese beeinträchtigt ist. Hierbei handelt es sich um die Ferrochelatase-antisense-Linie E82. Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war es, differentiell exprimierte Proteine der Mutanten aufzuspüren und diese dann in physiologischen Kontext der Mutation zu stellen. So sollten die abweichenden Phänotypen der eingesetzten transgenen Pflanzen auf Proteinebene näher charakterisiert werden. Um die Auswirkungen einer beeinträchtigten Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren in *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* untersuchen zu können, erwies es sich als notwendig, neue Methoden zu etablieren.

Ein, wenn nicht das Hauptaugenmerk dieser Arbeit musste auf die Etablierung neuer Methoden in diesem Labor gelegt werden. Die Methodenentwicklung erstreckte sich über einen weiten Bereich und beinhaltete von der Materialgewinnung (Organellen) über die Proteinextraktion, die zweidimensionale Proteinauftrennung bis hin zur anschließenden Proteinvisualisierung ein breites methodisches Spektrum. So wurden zunächst Methoden zur Isolierung intakter Chloroplasten und Mitochondrien aus beiden Pflanzenspezies modifiziert, optimiert und letztlich etabliert. Vor allem die Isolierung intakter und reiner Mitochondrien aus Pflanzen erwies sich als außerordentlich problematisch. Da die Ausbeute an Mitochondrien aus Pflanzen sehr gering ausfiel, wurden Suspensionskulturen von C24 und *starik* angelegt. Die Proteomanalyse von subzellulären Fraktionen wurde über zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese durchgeführt. Die Proteome der aus C24- und *starik*-Suspensionskulturen isolierten Mitochondrien wiesen keine signifikanten Unterschiede auf, was eventuell auf die noch undifferenzierten, etiolierten Zellen zurückzuführen ist.

In diesem Labor wurde bis dahin keine 2D-Gelelektrophorese durchgeführt, jedoch ist es im Rahmen dieser Arbeit gelungen, auch diese Methode zu etablieren und auf Zuverlässigkeit zu prüfen. Leider erwies sich die Methode als ungeeignet, Aussagen bezüglich der näheren Charakterisierung abweichender Phänotypen der eingesetzten Mutanten zu machen.

**Schlüsselwörter: Arabidopsis thaliana / Organellen / Proteomanalyse**

---

## Abstract

This study was aimed at localizing the compartments where iron-containing co-factors are biosynthesised in higher plants. Investigations were carried out in the plants dysfunctional in iron homeostasis.

Main objective was to characterize the consequences due to the impairment of iron-sulfur (Fe/S) cluster homogenises. In this context the chosen plants were *Arabidopsis thaliana* wild-type (ecotype C24) and the *starik*-mutant. *starik* is a T-DNA-insertion mutant of the mitochondrial ABC-transporter protein (Sta1) that is presumed to transport Fe/S-cluster synthesised in mitochondria to the cytosol. A homologue of Sta1 has been identified in *Homo sapiens*, which interacts with the Fe/S-cluster of human ferrochelatase. In tobacco, ferrochelatase is a key enzyme in tetrapyrrole biosynthesis. But till date the localization remains an open question whether it is directed to chloroplast and mitochondria or only in chloroplast. Because of this fact a tobacco ferrochelatase-antisense-mutant has been included in the study, which is deficient in heme biosynthesis. Major goal of this investigation was to identify the target proteins and assign their function in the physiological context of the mutation. For the analysis of the defective biosynthesis of iron-containing co-factors, it was a pre-requisite to establish a working method. Method development included isolation of mitochondria and chloroplasts, protein extraction from these organelles, two-dimensional (2D) protein separation and finally to visualize the localization of proteins. The isolation of chloroplasts and mitochondria was modified from published protocols for *Arabidopsis* and tobacco, optimised and established. The isolation of a pure mitochondrial fraction from green plants is very difficult and not reproducible. Due to very low mitochondrial content and contaminations with chloroplasts, it was decided to switch to *Arabidopsis* C24 and *starik* cell cultures. Proteomic analysis of both C24 and *starik* was done by 2D-gel electrophoresis. There were no significant differences between the proteome of *Arabidopsis* C24 and *starik* which could be explained due to the fact that cell cultures were used and those were etiolated. Furthermore the analysis of intact chloroplasts and total extracts from *Arabidopsis* and tobacco did not lead to any results, which could explain the necrotic and chlorotic phenotypes of the mutants. During this study it was possible to establish several new methods in the laboratory, but due to the problems of the reproducibility of the methods, it was impossible to come to any conclusions about different protein expression in wild-types and mutants.

**Key-words:** *Arabidopsis thaliana* / Organelles / Proteomanalysis

---

**Verzeichnis der Abkürzungen**

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
aa	Aminosäuren
AAS	Atomabsorbtionspektroskopie
ACA	Aminocaprinsäure
AK	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	Natriumbicinchoninat
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
BN	Blau-nativ
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CHAPS	3[(3-Cholomidopropyl)Dimethyl-Amino]-1-Propansulfonat
Coomassie	Coomassie Brillant Blau R-250
Cp	chloroplastidär
Cys	Cystein
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EtBr	Ethidiumbromid
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
HSP	Hitze-Schock-Protein
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IPG	Immobilisierter pH-Gradient
IPTG	Isopropyl-1-thio-β-D-galactosid
kDa	Kilodalton
LC-MS/MS	Liquid chromatography - MS/MS
M	molar
MALDI/TOF	matrix assisted laser desorption/ionization/time of flight
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektroskopie
mt	mitochondrial
MW	Molekulargewicht

---

NADH	Nicotinamid-adenin-Dinukleotid
NBT	Nitrotetrazoliumblausulfat
nm	Nanometer
NTA	Nitriltriessigsäure
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
pI	Isoelektrischer Punkt
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP-40	Polyvinylpyrrolidon
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
RubisCO	Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N,N Tetramethyl-ethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid

# INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
ABSTRACT	II
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	III
<b>1 EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>2 MATERIAL &amp; METHODEN</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Verwendete Materialien</b>	<b>7</b>
2.1.1 Liste der verwendeten Chemikalien und anderer Produkte	7
2.1.2 Liste der verwendeten Geräte	9
<b>2.2 Eingesetzte Versuchsorganismen</b>	<b>10</b>
2.2.1 Verwendete Pflanzen	10
2.2.2 Verwendete Suspensionskulturen	10
2.2.3 <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) zur heterologen Expression des Sta1-Proteins	10
<b>2.3 Anzucht der Versuchsorganismen</b>	<b>10</b>
2.3.1 Sterile Aussaat von <i>Arabidopsis thaliana</i> -Samen	10
2.3.2 Sterile Aussaat von <i>Nicotiana tabacum</i> -Samen	11
2.3.3 Anzuchtbedingungen von <i>Arabidopsis thaliana</i> -, <i>Pisum sativum</i> - & <i>Nicotiana tabacum</i> -Pflanzen	11
2.3.4 Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> in einer Suspensionskultur	12
<b>2.4 Mitochondrienisolierung aus Pflanzenmaterial und Zellkulturen</b>	<b>12</b>
2.4.1 Präparation von Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen nach DAY ET AL. (1985); modifiziert	13
2.4.2 Präparation von Mitochondrien aus <i>Pisum sativum</i> -Pflanzen nach DAY ET AL. (1985); modifiziert	14
2.4.3 Präparation von Mitochondrien aus <i>Nicotiana tabacum</i> -Pflanzen nach CHAUMONT ET AL. (1994)	15
2.4.4 Präparation von Mitochondrien aus <i>Nicotiana tabacum</i> -Pflanzen nach NEUBURGER ET AL. (1982); modifiziert	16

2.4.5 Präparation von Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -Zellkulturen nach KRUFT ET AL. (2001)	16
<b>2.5 Methoden zur Beurteilung der Reinheit mitochondrialer Fraktionen</b>	<b>17</b>
2.5.1 Chlorophyll-Messung nach ARNON (1949)	17
2.5.2 Fumarase-Messung nach BERKEMEYER ET AL. (1998); modifiziert	18
2.5.3 Messung des Sauerstoffverbrauchs isolierter Mitochondrien nach DAY ET AL. (1985); modifiziert	18
<b>2.6 Chloroplastenisolierung aus <i>Arabidopsis</i> und Beurteilung ihrer Intaktheit</b>	<b>19</b>
2.6.1 Chloroplastenisolierung nach JENSEN & BASSHAM (1966); modifiziert	19
2.6.2 Intaktheitsüberprüfung der isolierten Chloroplasten nach LEEGOOD & MALKIN (1986)	20
<b>2.7 Methoden zur Proteinbestimmung</b>	<b>20</b>
<b>2.8 Auftrennung von Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese</b>	<b>21</b>
2.8.1 Blau-native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) nach SCHÄGGER & VON JAGOW (1991)	21
2.8.2 Herstellung, Beladung und Lauf der ersten Dimension einer BN-PAGE	22
2.8.3 Tricin-SDS-PAGE als zweite Dimension einer BN-PAGE	23
2.8.4 Probenaufbereitung für eine Proteinauftrennung mittels Tricin-SDS- PAGE	23
2.8.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine	24
2.8.6 Tricin-SDS-PAGE nach SCHÄGGER & VON JAGOW (1987); modifiziert	25
<b>2.9 Methoden zur Anfärbung von Proteinen in Gelen</b>	<b>26</b>
2.9.1 Silberfärbung von Proteingelen nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988); modifiziert	26
2.9.2 Coomassie-Colloidal-Färbung von Proteingelen nach NEUHOFF ET AL. (1985) und nach Roti-Blue	27
<b>2.10 Methoden zur Herstellung von Proteinextrakten verschiedener Herkunft</b>	<b>27</b>
2.10.1 Denaturierende Proteinisolierung aus pflanzlichem Gesamtextrakt	27
2.10.2 Denaturierende Proteinisolierung aus Chloroplasten	28
2.10.3 Denaturierende Proteinisolierung aus Mitochondrien	28

2.10.4 Native Proteinisolierung aus Pflanzengesamtextrakt	28
<b>2.11 Weitere Elektrophoretische Trennverfahren</b>	<b>29</b>
2.11.1 DNA-Auftrennung in Agarose-Gelen	29
2.11.2 Auftrennung von Proteingesamtexttrakten über eindimensionale SDS-PAGE	29
<b>2.12 Durchführung von Western Blot-Analysen</b>	<b>30</b>
2.12.1 Transfer von Proteinen	31
2.12.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen und deren Quantifizierung	31
<b>2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien</b>	<b>32</b>
<b>2.14 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA</b>	<b>32</b>
<b>2.15 Klonierungstechniken</b>	<b>33</b>
2.15.1 Amplifizierung von cDNA über PCR	33
2.15.2 Ligation des PCR-Produktes in den Klonierungsvektor pGEM-T	34
2.15.3 Ligation in den Expressionsvektor pQE-30	34
2.15.4 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> -Zellen	34
2.15.5 Transformation in <i>E. coli</i> -Zellen	35
2.15.6 Heterologe Proteinexpression in <i>E. coli</i>	35
2.15.7 Proteinreinigung über $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitäts-Chromatographie	36
<b>2.16 Bestimmung von Metabolitgehalten in C24 und <i>starik</i></b>	<b>37</b>
2.16.1 Bestimmung von Chlorophyll- und Carotinoidgehalten nach LICHTENTHALER (1987)	37
2.16.2 Elementanalysen über Atomabsorbtionsspektroskopie (AAS)	38
<b>3 ERGEBNISSE</b>	<b>39</b>
<b>3.1 Beschreibung der eingesetzten Versuchsorganismen</b>	<b>39</b>
3.1.1 Pflanzen von <i>Arabidopsis thaliana</i> , Wildtyp C24 und <i>starik</i> -Mutante	40
3.1.2 Suspensionskulturen von <i>Arabidopsis thaliana</i> , C24 und der <i>starik</i> -Mutante im Vergleich	40
3.1.3 Pflanzen von <i>Nicotiana tabacum</i> , Wildtyp SNN, und der transgenen Ferrochelatase-antisense-Linie 82 im Vergleich	41

<b>3.2 Analyse von Mitochondrien aus grünem Gewebe</b>	<b>42</b>
3.2.1 Isolierung von Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i> -, <i>Pisum sativum</i> - und <i>Nicotiana tabacum</i> -Pflanzen	43
3.2.2 Biochemische und physiologische Verfahren zur Analyse von gereinigten Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe	44
3.2.3 Gelelektrophoretische Verfahren zur Analyse von Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe	46
3.2.4 Modifikation der Methode von DAY ET AL. (1985) und Optimierung der Pflanzenanzucht	50
<b>3.3 Auftrennung von Mitochondrien über zweidimensionale Gelelektrophorese</b>	<b>51</b>
3.3.1 Ausgangsmaterial für die Etablierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese von Mitochondrien	52
3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration isolierter mitochondrialer Fraktionen	53
<b>3.4 Vergleich des mitochondrialen Proteoms von C24 und <i>starik</i></b>	<b>55</b>
<b>3.5 Analyse des mitochondrialen Proteoms von <i>Arabidopsis thaliana</i>-         Suspensionskulturen</b>	<b>59</b>
<b>3.6 Vergleichende Analyse chloroplastidärer Proteome von Wildtyp- und transgenen         Pflanzen</b>	<b>62</b>
3.6.1 Optimierung zur Chloroplastenisolierung aus <i>Arabidopsis thaliana</i> - Pflanzen	62
3.6.2 Zweidimensionale Auftrennung löslicher Proteinfractionen von Chloroplasten aus <i>Arabidopsis</i>	62
3.6.3 Zweidimensionale Auftrennung membrangebundener Proteinfractionen von Chloroplasten aus <i>Arabidopsis</i>	63
3.6.4 Isolierung und vergleichende Proteomanalyse von <i>Arabidopsis thaliana</i> , Wildtyp C24, und der <i>starik</i> -Mutante	65
3.6.5 Isolierung und vergleichende Proteomanalyse von <i>Nicotiana tabacum</i> , Wildtyp SNN, und der Ferrochelataase-antisense-Linie E82	67
<b>3.7 Zweidimensionale Auftrennung von Proteingesamtextrakten</b>	<b>68</b>
3.7.1 Zweidimensionale Auftrennung von Proteingesamtextrakten C24	68

3.7.2 Wiederholte Auftrennung desselben Proteingestamtextraktes von C24	70
<b>3.8 Western Blot-Analyse mit verschiedenen Antikörpern</b>	<b>71</b>
3.8.1 Western Blot-Analyse mit den Antikörpern gegen Nfs1p, NifS und IscS	72
3.8.2 Western Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen hABC7	73
<b>3.9 Western Blot-Analysen nach zweidimensionaler Proteinauftrennung</b>	<b>75</b>
<b>3.10 Charakterisierung des Sta1-Proteins</b>	<b>77</b>
3.10.1 Expression und Reinigung des Sta1-Proteins	78
<b>3.11 Physiologische Charakterisierung der von C24 und <i>starik</i></b>	<b>79</b>
<b>4 DISKUSSION</b>	<b>81</b>
4.1 Die 2D-Gelelektrophorese	81
4.2 Die Analyse mitochondrialer Proteine	84
4.3 Die Analyse von Chloroplasten	87
4.4 2D-Auftrennung pflanzlicher Gesamtextrakte	88
4.5 2D-Gelelektrophorese – The road to Mandalay?	89
4.6 Untersuchungen zur Fe/S-Zentren-Biosynthese	90
4.7 Nachbetrachtung, Bewertung und Ausblick	93
<b>ANHANG</b>	<b>96</b>
<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>100</b>
<b>PUBLIKATIONEN</b>	<b>112</b>
<b>DANKE!</b>	<b>113</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Hypothetisches Modell für die Fe/S-Biosynthese in Höheren Pflanzen	2
Abbildung 2: <i>Arabidopsis thaliana</i> -Pflanzen, Wildtyp C24 und <i>starik</i> -Mutante	40
Abbildung 3: Etiolierte Suspensionskulturen von C24 und <i>starik</i>	41
Abbildung 4: <i>Nicotiana tabacum</i> -Pflanzen, SNN und E82	42
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Dichte von Zellkompartimenten	43
Abbildung 6: Schematische Darstellung organellarer Proteinkomplexe	47
Abbildung 7: Dokumentation der Reinheit isolierter Mitochondrien aus Erbse und Tabak	48
Abbildung 8: Dokumentation der Reinheit isolierter Mitochondrien aus <i>Arabidopsis</i>	49
Abbildung 9: Identisch entwickelte C24- und <i>starik</i> -Pflanzen vor der Ernte	51
Abbildung 10: 2D-Auftrennung mit verschiedenen IPG-Streifen	53
Abbildung 11: 2D-Auftrennung mit unterschiedlicher Proteinkonzentration	54
Abbildung 12: 2D-Auftrennung mitochondrialer Proteine von C24- und <i>starik</i> -Pflanzen	56
Abbildung 13: 2D BN/SDS-PAGE mitochondrialer Proteine von C24- und <i>starik</i> -Pflanzen	58
Abbildung 14: Percoll-Stufengradient zur Aufreinigung von Mitochondrien	59
Abbildung 15: 2D-Auftrennung von Mitochondrien aus Pflanzen und Suspensionskulturen	60
Abbildung 16: Mitochondrienaufreinigung von C24 und <i>starik</i> aus Suspensionskulturen	61
Abbildung 17: 2D-Auftrennung löslicher chloroplastidärer Proteine von C24 und <i>starik</i>	63
Abbildung 18: 2D-Auftrennung chloroplastidärer Membranproteine von C24 und <i>starik</i>	64
Abbildung 19: 2D-Auftrennung chloroplastidärer Proteine von C24 und <i>starik</i>	65
Abbildung 20: Präperative 2D-Auftrennung chloroplastidärer Proteine von C24 und <i>starik</i>	66
Abbildung 21: 2D-Auftrennung chloroplastidärer Proteine von SNN und E82	68
Abbildung 22: 2D-Auftrennung von C24-Gesamtextrakten	69
Abbildung 23: 2D-Auftrennung von C24-Gesamtextrakten einer Pflanze im Doppelansatz	70
Abbildung 24: Western Blot mit den AK gegen Nfs1p, NifS, IscS	72
Abbildung 25: Western Blot mit dem AK gegen hABC7	74
Abbildung 26: Weitere Western Blots mit dem AK gegen hABC7	74
Abbildung 27: 2D-Western Blots mit den AK gegen Nfs1p, IscS, hABC7	76
Abbildung 28: Schematische Darstellung des Sta1-Proteins	77
Abbildung 29: 1D-SDS-PAGE-Analyse von <i>E. coli</i> -Zellen, die das Sta1-Protein exprimieren	78
Abbildung 30: Chlorophyll- und Carotinoidgehalte von C24 und <i>starik</i>	79

## TABELLENVERZEICHNIS

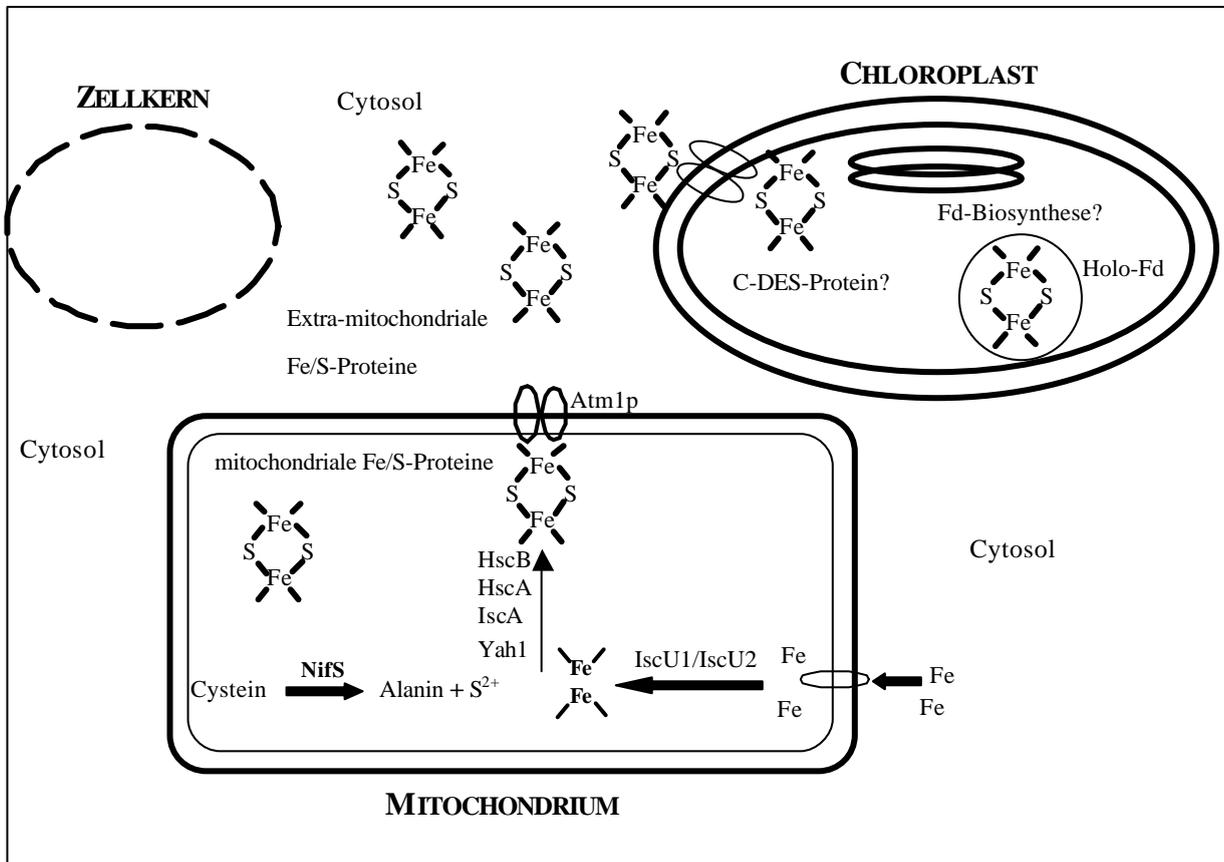
Tabelle 1: Liste der verwendeten Geräte	9
Tabelle 2: Pipettierschema für ein Gradientengel	22
Tabelle 3: Pipettierschema für ein 12 %iges Polyacrylamidgel	25
Tabelle 4: Pipettierschema für vier Mini-Trenngele	30
Tabelle 5: Pipettierschema für vier Mini-Sammelgele	30
Tabelle 6: Biochemisch/physiologische Analyse isolierter Mitochondrien	44
Tabelle 7: Modifikationen zur Mitochondrienisolierung	50
Tabelle 8: Übersicht der eingesetzten Antikörper	71
Tabelle 9: Elementaranalysen von C24 und <i>starik</i> mittels Atomabsorbtionsspektrometrie	80
Tabelle 10: Ergebnisse der MS löslicher chloroplastidärer Proteine	96
Tabelle 11: Ergebnisse der MS chloroplastidärer Membranproteine	97

# 1 Einleitung

In dieser Arbeit sollten Untersuchungen zur Kompartimentierung der Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren in Höheren Pflanzen durchgeführt werden. Vor allem die Folgen einer Beeinträchtigung der Biosynthese von Eisen-Schwefel-Zentren (Fe/S-Zentren) sollten charakterisiert werden. In allen Kompartimenten einer Zelle kommen zahlreiche Proteine vor, die Fe/S-Zentren oder Hämgruppen als prosthetische Gruppen enthalten. Diese Proteine sind an einer Reihe von metabolischen Prozessen beteiligt und dienen unter anderem als Elektronenüberträger zahlreicher Redoxreaktionen (CAMMACK 1992, JOHNSON 1998, IMSANDE 1999, PAPENBROCK ET AL. 2001).

In Untersuchungen an dem Bodenbakterium *Azotobacter vinelandii* wurde ein Gencluster charakterisiert, das für alle notwendigen Proteine des Enzymkomplexes der Nitrogenase und der darin enthaltenen Fe/S-Zentren codiert (JACOBSEN ET AL. 1989). Diese Gene werden als *NIF*-Gene (*nif*: nitrogen fixation) bezeichnet (CANNON ET AL. 1977, DEAN ET AL. 1993, PETERS ET AL. 1995). In *Azotobacter vinelandii* konnte ein zusätzliches Gencluster charakterisiert werden, das mehrere zu den *NIF*-Genen homologe Sequenzen enthält. Diese sogenannten *ISC*-Gene (*isc*: iron sulfur cluster) codieren offenbar ausschließlich für Proteine, die an der Synthese von Fe/S-Zentren beteiligt sind (ZHENG ET AL. 1993). Zu Beginn der Biosynthese von Fe/S-Zentren wird reduzierter Schwefel von Desulphydrasen (z.B. NifS) bereitgestellt (ZHENG ET AL. 1998). Während das *nif*-Operon spezifisch für die Biogenese der Nitrogenase in Stickstoff-fixierenden Organismen verantwortlich ist, hat das *isc*-Operon eine generelle Rolle bei Bildung und Reparatur von Fe/S-Proteinen in der Zelle. Das *isc*-Operon liefert demnach die Grundausrüstung für die Synthese von Fe/S-Zentren. Homologien zum *isc*-Operon von *A. vinelandii* wurden in der eukaryotischen Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* näher charakterisiert und es konnte gezeigt werden, dass die Synthese von Fe/S-Zentren offenbar ausschließlich in Mitochondrien stattfindet (KISPALET AL. 1999, MÜHLENHOFF & LILL 2000). Weitere homologe Gene wurden sowohl in Prokaryoten als auch im Genom der Maus und des Menschen identifiziert (LAND & ROUAULT 1998, NAKAI ET AL. 1998, KISPALET AL. 1999). Der prokaryotische Syntheseweg ist somit mit dem eukaryotischen teilweise homolog. Auf dieser Grundlage basierend wurde das in Abbildung 1 dargestellte Modell aufgestellt. Es beschreibt eine ausschließliche Synthese von Fe/S-Zentren in pflanzlichen Mitochondrien und einen anschließenden Transfer der Fe/S-Zentren in andere

Zellkompartimente, z.B. in die Chloroplasten. Dies hätte zur Folge, dass der Chloroplast nicht in der Lage wäre, die von ihm benötigten Fe/S-Zentren selbst zu synthetisieren und folglich von den Mitochondrien gespeist werden müsste.



**Abb. 1:** Hypothetisches Modell für die Fe/S-Zentrenbiosynthese in Höheren Pflanzen (PAPENBROCK unveröffentlicht, Stand September 2000). C-DES (Cysteindesulphydrase), NifS (mitochondriale Cysteindesulphydrase), IscU1&2 (Eisenbindende Proteine), HscB (Chaperone des Hsp40/DNAJ Typs), HscA (Chaperone des Hsp70/DNAJ Typs), Yah1 (Reduktion von Schwefel und/oder Eisen), IscA (Funktion ungeklärt), Fd (Ferredoxin).

In Chloroplasten kommen zahlreiche Proteine vor, die Fe/S-Zentren als prosthetische Gruppen enthalten. Plastiden besitzen demzufolge einen immens hohen Bedarf an Fe/S-Zentren, z.B. für Ferredoxin. Von TAKAHASHI ET AL. (1986 & 1991) wurden biochemische *in vitro* Untersuchungen an isolierten Chloroplasten aus Spinat durchgeführt, die einen eigenständigen Biosyntheseweg von Fe/S-Zentren in Plastiden wahrscheinlich machen. In diesen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass zumindest das Fe/S-Zentrum von Ferredoxin in Chloroplasten gebildet werden kann. Biochemisch und molekularbiologisch durchgeführte Untersuchungen an dem Cyanobakterium *Synechocystis* stützen diese Hypothese

(LEIBRECHT & KESSLER 1997, LANG & KESSLER 1999, JASCHKOWITZ & SEIDLER 2000). In *Synechocystis* existieren Proteine, die an der Maturation von Fe/S-Zentren beteiligt sind. Diese Proteine zeigen Homologien zu den in Hefe nachgewiesenen Proteinen der Fe/S-Zentren-Biosynthese. So konnte ein homologes Protein zu NifS identifiziert werden. Dieses C-DES-Protein (Abb. 1) in *Synechocystis* fungiert ebenfalls als Cysteindesulphydrase. *Synechocystis* gilt als ein prokaryontisches Chloroplastenmodell Höherer Pflanzen. Die phylogenetische Verwandtschaft zwischen Cyanobakterien und Chloroplasten ist lange bekannt und endosymbiontisch zu begründen (FAY & VAN BAALEN 1987). Zu Beginn der Arbeit (September 2000) war nicht geklärt, welche Proteine in Höheren Pflanzen an der Synthese der Fe/S-Zentren beteiligt sind und in welchen Kompartimenten die Synthese stattfindet.

Aus Untersuchungen an Hefe war bekannt, dass Fe/S-Zentren aus den Mitochondrien in das Cytosol exportiert werden (HIGGINS 1992, BAUER ET AL. 1999). In der inneren Membran von Hefemitochondrien wurde das Atm1p-Protein identifiziert (LEIGHTON & SCHATZ 1995), das vermutlich die Funktion eines Exporterproteins übernimmt (LILL ET AL. 1999). Atm1p gehört zu einer großen Proteinfamilie von ATP-abhängigen Transmembranproteinen und stellt einen "ABC-Halbtransporter" dar. Ein homologes Protein zu Atm1p aus Hefe ist in *Arabidopsis thaliana* bekannt. Dort codiert das *STA1*-Gen für das mitochondriale ABC-Transporterprotein Sta1 (KUSHNIR ET AL. 2001). In der *Arabidopsis starik*-Mutante ist das *STA1*-Gen durch eine T-DNA-Insertion ausgeschaltet (KUSHNIR ET AL. 2001). Makroskopisch unterscheidet sich *starik* vom Wildtyp C24 durch Zwergenwachstum und einen chlorotischen Phänotyp, für den bisher noch keine Erklärung gegeben werden konnte. Ein weiteres homologes Protein zu Atm1p und Sta1 wurde beim Menschen identifiziert (BEKRI ET AL. 2000). Dieses hABC7-Protein interagiert nach neuesten Untersuchungen mit dem Fe/S-Zentrum der menschlichen Ferrochelatase (TAKETANI ET AL. 2003). Aus diesem Grund wurde Anfang 2003 eine Tabak-Mutante in die Untersuchungen einbezogen, deren Hämbiosynthese beeinträchtigt ist. Diese Ferrochelatase-antisense-Linie E82 resultiert aus *Nicotiana tabacum* der Sorte Samsun NN (SNN). Die transgenen Tabakpflanzen unterscheiden sich vom Wildtyp SNN durch einen nekrotischen Phänotyp und wurden von PAPENBROCK ET AL. (2001) näher untersucht. Bei der Ferrochelatase handelt es sich um ein ubiquitär vorkommendes Enzym, das zweiwertiges Eisen in Protoporphyrin IX chelatiert. Protoporphyrin IX ist das letzte gemeinsame Intermediat der Chlorophyll- und Hämbiosynthese.

Die Ferrochelatase ist ein Schlüsselenzym der Tetrapyrrolobiosynthese, wobei noch nicht eindeutig gezeigt werden konnte, ob das Enzym ausschließlich in den Chloroplasten oder auch in den Mitochondrien lokalisiert ist. Die pflanzliche Tetrapyrrolobiosynthese stellt ein komplexes Netzwerk zwischen Zellkern, Chloroplasten und Mitochondrien dar. Anhand der *Arabidopsis thaliana*-Mutante *starik* und der *Nicotiana tabacum*-Mutante E82 sollte geklärt werden, wie sich Beeinträchtigungen der Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren auf Proteinebene auswirken, besonders da eine genetische Anormalität allein nicht zwingend phänotypische Unterschiede erklärt. In dieser Arbeit wurden erstmals primär physiologische Versuchsansätze für die *in vivo*-Analysen einer unterschiedlichen Proteinexpression in dem System "Pflanze" gewählt. Hierzu war es notwendig, Methoden zur Isolierung intakter Chloroplasten und Mitochondrien aus Tabak- und *Arabidopsis*-Pflanzen zu entwickeln.

Jedoch werden immer wieder allgemeine Schwierigkeiten bei der Mitochondrienisolierung aus Pflanzen beschrieben (SINGH ET AL. 2000, MILLAR ET AL 2001A). Pflanzen besitzen, im Gegensatz zu nicht autotrophen eukaryotischen Zellen, Plastiden unterschiedlicher Größe und Dichte. Dazu zählen Amyloplasten, Chromoplasten, Leukoplasten, undifferenzierte Proplastiden und Chloroplasten. In allen photosynthetisch aktiven Pflanzengeweben dominieren die Chloroplasten. In einer Spinat-Mesophyllzelle bestehen 16 % des Gesamtvolumens aus Chloroplasten, während Mitochondrien lediglich 0,5 % ausmachen (HELDT 1999). Daraus resultiert ein äußerst ungünstiges Organellenverhältnis für eine Isolation von Mitochondrien aus Blattmaterial. Zudem weisen Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen eine nahezu identische Dichte auf und haben somit ähnliche Sedimentationseigenschaften (LOTTSPREICH & ZORBAS 1998). Bei der Isolierung eines Organellentypus können folglich Kontaminationen mit anderen Zellkompartimenten kaum verhindert werden. Die Mehrzahl der in der Literatur beschriebenen Methoden behandelt die Isolation von Organellen aus Erbse oder Spinat. Demnach mussten für die Isolierung von Organellen aus *Arabidopsis*- und Tabak-Pflanzen die bestehenden Methoden modifiziert, optimiert und etabliert werden.

Seit Dezember 2000 gilt die vollständige Genom-Analyse von *Arabidopsis thaliana* als abgeschlossen. Dies kann jedoch nur als erster Schritt gelten, Verständnis von der Umsetzung der genetischen Information in ein Genprodukt, meist ein Protein, und der Funktion des Genproduktes zu erlangen. Die Gesamtheit aller Proteine, die abhängig von zahlreichen beeinflussenden Faktoren von einem Genom exprimiert werden, wird als Proteom bezeichnet (WILKINS ET AL. 1997). Während das Genom statisch ist, unterliegt das Proteom ständigen

Veränderungen. So weisen Proteinexpressionsmuster in Abhängigkeit von physiologischem Zweck, Differenzierungsstatus und Umweltfaktoren gravierende Unterschiede auf (LOTTSPREICH 1999). Die Proteomanalyse ist somit eine Momentaufnahme des jeweiligen Jetztzustandes des Stoffwechsels (PENG & GYGI 2001). Die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese stellt bei der angewandten Proteomanalyse eine Schlüsseltechnologie dar, mit der Proteinkomplexe als einzelne Polypeptide dargestellt werden können. Die Technologie der 2D-Gelelektrophorese wurde erstmals 1975 beschrieben (KLOSE 1975, O'FARRELL 1975, SCHEELE ET AL. 1975). Ihr liegt das Prinzip einer mehrdimensionalen, elektrophoretischen Trennung zugrunde. Die Trennung der Proteine erfolgt in zwei voneinander unabhängigen Polyacrylamid-Gelelektrophoresesystemen, die unterschiedliche Eigenschaften der Proteine für ihre Separation ausnutzen. Das Auflösungsvermögen der 2D-Gelelektrophorese ist durch diese beiden Trennmethode ausgesprochen groß und kann mehr als 10.000 Proteinspots pro Gel betragen (KLOSE & KOBALZ 1995).

In der ersten Dimension werden die Proteinextrakte nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) aufgetrennt. Hierfür wurden zunächst Träger-Ampholyte verwendet, doch erst durch die Einführung immobilisierter pH-Gradienten (IPG) konnte die Handhabung der Methode deutlich verbessert werden (BJELLQVIST ET AL. 1982, FICHMANN 1999, MATSUI ET AL. 1999B). In der zweiten Dimension werden die Proteine dann nach ihrem Molekulargewicht über SDS-PAGE aufgetrennt (GÖRGET AL. 1985). Vor dem Übergang von der ersten auf die zweite Dimension erfolgt die sogenannte Equilibrierung (BERKELMANN & STENSTEDT 1998, RABILLOUD 2000). Danach müssen alle Proteine vollständig und homogen in die zweite Dimension transferiert werden, um die Reproduzierbarkeit der Methode zu sichern (GÖRGET AL. 1987). Die aufgetrennten Proteine werden im Anschluss mittels verschiedener Färbetechniken visualisiert. Die Weiterentwicklungen der Massenspektroskopie und der Bioinformatik Mitte der neunziger Jahre ermöglichten dann eine weitere Analyse der visualisierten Proteinspots (WILM ET AL. 1996, WILKINS ET AL. 1997). Durch die Fortschritte der letzten Jahre hat die Proteomanalyse immer mehr Bedeutung auf den Gebieten der Medizin, der Mikro- sowie der Pflanzenbiologie gewonnen. Sie wird eingesetzt zur Charakterisierung von Mutationen und auch bei der Suche nach stressinduzierten Proteinen (THIELLEMENT ET AL. 1999).

Jedoch beinhaltet die Methode einige Hindernisse. So gestaltet sich die Festlegung von Koordinaten in einem 2D-Gel problematisch. Wie bereits beschrieben, handelt es sich bei dem Proteom eines Organismus um ein dynamisches System, seine Abbildung mittels 2D-Gel jedoch ist statisch. Eine definitive Bindung determinierter Proteine an bestimmte pH-

und/oder MW-Werte würde der Dynamik nicht gerecht und sogar die Brauchbarkeit der gesamten Methodik in Frage stellen. Dennoch müssen Proteinspots, die möglichst in allen Proben kontinuierlich nachzuweisen und über das Gel verteilt sind, als sogenannte „Landmarks“ definiert werden. Bei Kenntnis ihrer eigenen pH-Werte und ihrer molekularen Größe dienen sie der Zuordnung anderer Spots.

Ein Hauptanliegen dieser Arbeit war es, differentiell exprimierte Proteine der Mutanten von *Arabidopsis thaliana* und Tabak aufzuspüren und diese dann in einen physiologischen Kontext zur Mutation zu stellen. Hierzu musste zunächst die Methodik der 2D-Gelelektrophorese etabliert werden.

Ein, wenn nicht das Hauptaugenmerk dieser Arbeit lag demzufolge auf der Etablierung neuer Methoden in diesem Labor. Die Methodenentwicklung erstreckte sich über einen weiten Bereich und beinhaltete von der Materialgewinnung über die Proteinextraktion, die zweidimensionale Proteinauftrennung bis hin zur anschließenden Proteinvisualisierung ein breites methodisches Spektrum. Erst nach Klärung der Frage, ob die eingesetzten Methoden adäquat sind, kann die Frage der Kompartimentierung der Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren geklärt werden. Folgende Fragen kristallisierten sich hierbei heraus:

- Ist es möglich, Organellen reproduzierbar aus grünem Gewebe zu isolieren?
- Ist es möglich, die Proteome von Chloroplasten und Mitochondrien mittels 2D-Gelelektrophorese aufzutrennen?
- Wie ist die reproduzierbare Durchführbarkeit der zweidimensionalen Gelelektrophorese zu bewerten?
- Können in Höheren Pflanzen mit den angewandten Methoden homologe Proteine zu dem Hefe- und *Synechocystis*-Modell detektiert werden?
- Ist es möglich, den abweichenden Phänotyp transgener Pflanzen mittels proteomanalytischer Methoden zu erklären?

## 2 Material & Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Liste der verwendeten Chemikalien und anderer Produkte

Alle Medien, Puffer, Stamm- und Arbeitslösungen wurden mit bidestilliertem Wasser (H<sub>2</sub>O) angesetzt.

- ?? **Amersham Biociences** (Großbritannien): Percoll
- ?? **AppliChem** (Darmstadt): Acrylamid (30 %ige und 49 %ige Stammlösung), Ammoniumsulfat, 3[(3-Cholomidopropyl)Dimethyl-Amino]-1-Propansulfonat (CHAPS), Chloroform, Coomassie Brillant Blue G250, Dimethylsulfoxid (DMSO), D-Mannit, Essigsäure, Formamid, Glucose, Glycin, Kanamycin (Kan), MOPS, Natriumchlorid, Nitrotetrazoliumblausulfat (NBT), PMSF, Ponceau S, SDS, Sorbitol, Tris
- ?? **BioRad** (USA): Gold, IPG Strips pH 3-10 und 4-7, Mineralöl
- ?? **Carl Roth GmbH CO** (Karlsruhe): 5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat (BCIP), 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid (X-Gal), Agarose, Ammoniumnitrat, Ammoniumpersulfat (APS), Ampicillin (Amp), Bovines Serum Albumin (BSA), Dithiothreitol (DTT), Formaldehyd, HEPES, Isopropyl-1-thio- $\beta$ -D-galactosid (IPTG), Kaliumchlorid, Kaliumnitrat, Magnesiumsulfat, Myo-Inosit, Natriumcarbonat, Nitrocellulosemembran für Proteine, Polyvinylpyrrolidon (PVP K-25), Roti Blue, RotiA-Blot (Anodenpuffer), RotiK-Blot (Kathodenpuffer), Thioharnstoff
- ?? **Fluka** (Neu-Ulm): 1,2,4-Dichlorphenoxyessigsäure, Aminocaprinsäure (ACA), Borsäure, Jodacetamid, L-Cystein, Natriumbicinchoninat (BCA), Natriumpyrophosphat, Natriumthiosulfat, *ortho*-Phosphorsäure (85%), Pyridoxolhydrochlorid
- ?? **Gibco BRL** (Karlsruhe): Agar, Restriktionsenzyme
- ?? **Heirler** (Radolfzell): Magermilchpulver

- 
- ?? **J.T. Baker** (B.-V.-Deventer, NL): Glycerin, Harnstoff, Isopropanol, Kaliumacetat, Methanol, Natronlauge, Saccharose, Salzsäure
- ?? **MBI Fermentas** (St. Leon-Rot): 1-kb-Leiter
- ?? **Merck** (Darmstadt): Calciumchlorid, Chloroform, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Kaliumjodid, Kobaltchlorid, Kupfersulfat, Magnesiumchlorid, Mangan(II)-chlorid, Natriumcarbonat, Natriumhydrogencarbonat, Natriumhydroxid, Natriummolybdat, Nicotinsäure, Perchlorsäure, Phosphorsäure, Silbernitrat, Sulfosalicylsäure, Thiaminiumdichlorid, Tween-20, Zinksulfat
- ?? **MWG-Biotech** (Ebersberg): Primer
- ?? **Peqlab Biotechnologie GmbH** (Erlangen): T4-DNA-Ligase
- ?? **Promega** (Mannheim): pGEM-T-Vektor, T4-DNA-Ligase
- ?? **Quiagen GmbH** (Hilden): pQE-30-Vektor, QIAquick Gel Extraction Kit
- ?? **Riedel-de-Häen** (Seelze): Bromphenolblau (BPB), Kaliumdihydrogenphosphat, Kaliumphosphat, Trichloressigsäure (TCA)
- ?? **Roche Diagnostics GmbH** (Mannheim): N-Dodecylmaltosid, Protease Inhibitor Cocktail
- ?? **Schleicher & Schuell** (Dassel): Nytran Plus positiv geladene Polyamidmembran
- ?? **Serva** (Heidelberg): Anti-rabbit IgG (whole molecule), Alkaline Phosphatase-Konjugat, BaktoTrypton, Ethidiumbromid, Hefeextrakt, Lauroylsarcosin, Morpholinoethansulfonsäure (MES), Natriumhydrogenphosphat, RNase A
- ?? **Sigma** (USA): Bis-Tris, Natriumtartrat, N,N,N,N Tetramethyl-ethyleneamine (TEMED), Polyvinylpyrrolidon (PVP K-40), Tricin

## 2.1.2 Liste der verwendeten Geräte

**Tabelle 1:** Liste der verwendeten Geräte

Aqua dest.-Anlage	Fistream cyclon
Autoklav	Varioklav H+P
Beleuchtung der Klimakammern	TLD 58W/33 / Philips
Brutschrank	Memmert
Elektroblotgerät	Roth
Elektrophoreseapparaturen	Mincell EC 370M Electrophoretic Gel System
Gießkammer für Polyacrylamid Gele	Gießkammer HSI / S. Franziskus PROTEAN II xi Cell/ BioRad
Homogenisator (Mixer)	Braun
Inkubationsschrank für Suspensionskulturen	INFORSHT
Magnetrührer mit Heizplatte	MR 3001 K / Heidolph
PCR-Gerät	PCR-Cycler / Peqlab
pH-Meter	Maxi-M1 Janke & Kunkel / IKA Werk
Photometer	UVICON XS / Bio-Tek Instruments
Schüttelinkubator	Flachbrettschüttler / Infors AG
Schüttler	Certomat R / B. Braun
Spannungsgeber	Höfer, Biometra-Mini-PP, 2301 Marcodrive1 / LKB Bromma, POWERPAC 1000 / BioRad
Sterilbank	CEAG Envirco
Thermoblock	Digi-Block JR / Laboratory Devices Inc., USA
Ultra-Turrax	Modell T25 Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland
UV-Leuchttisch	UV-Tisch / Schütt
Vortexer	MS2, Minishaker IKA Werk
Waagen	L610D / Sartorius Laboratory, 770/Kern
Wasserbäder	GFL 1092 und 1086 / Schütt
Zentrifugen	Biofuge pico / Heraeus Sepatech, Ultrazentrifuge Beckman L7-55, BR4i / Juoan, RC-5B Refridgerated Superspeed Centrifuge / Sorvall

## 2.2 Eingesetzte Versuchsorganismen

### 2.2.1 Verwendete Pflanzen

- *Arabidopsis thaliana* Wildtyp C24
- *starik*-Mutante, resultiert aus C24
- *Nicotiana tabacum* var. Samsun NN (SNN)
- *Nicotiana tabacum* Ferrochelataase-antisense-Linie E82, resultiert aus SNN
- *Pisum sativum* var. Schöne Rheinländerin

### 2.2.2 Verwendete Suspensionskulturen

- *Arabidopsis thaliana* C24 und *starik*

### 2.2.3 *Escherichia coli* (*E. coli*) zur heterologen Expression des Sta1-Proteins

Um das Sta1-Protein heterolog zu exprimieren, erfolgte eine Hitzeschocktransformation der entsprechenden Plasmid-DNA in *E. coli*. Hierfür wurde der *E. coli*-Stamm XL1-blue eingesetzt.

## 2.3 Anzucht der Versuchsorganismen

### 2.3.1 Sterile Aussaat von *Arabidopsis thaliana*-Samen

In ein Eppendorfgefäß wurden 10 mg der Samen und 1 ml 70 %iges Ethanol gegeben und anschließend 5-10 Minuten überkopf durchmischt. Das Ethanol wurde abgegossen und die

Samen mit 1 ml Hypochloritlösung (1:1 mit H<sub>2</sub>O verdünnt) für 10 Minuten überkopf durchmischt. Die Hypochloritlösung wurde mittels einer Pipette entnommen und die Samen gründlich mit H<sub>2</sub>O gereinigt. Die sterilen Samen wurden nochmals in H<sub>2</sub>O aufgenommen und mit einem Drigalskispatel auf dem entsprechenden Medium verteilt.

### 2.3.2 Sterile Aussaat von *Nicotiana tabacum*-Samen

Bei der Aussaat von *Nicotiana tabacum*-Samen wurde ähnlich verfahren wie bei *Arabidopsis thaliana*-Samen, jedoch wurden hier 40 mg Samen eingesetzt und die Sterilisationszeit mit 70 %igem Ethanol auf drei Minuten verkürzt. Auch die Sterilisation mit Hypochlorit betrug hier lediglich fünf Minuten.

### 2.3.3 Anzuchtbedingungen von *Arabidopsis thaliana*-, *Pisum sativum*- & *Nicotiana tabacum*-Pflanzen

Die Samen von *Arabidopsis thaliana* Heynh. Wildtyp C24 stammen ursprünglich aus dem *Arabidopsis* stock center der Ohio State University. Die Pflanzen wurden für zwei bis drei Wochen unter Langtag-Bedingungen (16 Stunden Licht/8 Stunden Dunkelheit) bei 23°C/21°C im Gewächshaus auf Erde oder auf dem Substrat TKS1 (Floragard, Deutschland) gezogen. Wenn nötig, wurde für 16 Stunden am Tag zusätzliche beleuchtet, um einen konstanten Quantenfluss von 300  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  zu gewährleisten.

Die *starik*-Mutante resultiert aus dem Wildtyp C24 von *Arabidopsis thaliana* und wurde freundlicherweise von Dr. S. Kushnir, Universität Gent (Belgien), zur Verfügung gestellt (KUSHNIR ET AL. 2001). *Pisum sativum* var. Schöne Rheinländerin wurde unter identischen Bedingungen für 18 Tage gezogen. *Nicotiana tabacum* var. Samsun wuchs unter den beschriebenen Bedingungen drei Wochen auf dem Substrat TKS1. Die Ferrochelatase (FeCh)-antisense-Linie E82 wurde steril auf MURASHIGE & SKOOG (1962) (MS)-Platten ausgesät und durch Zugabe von Kanamycin selektiert (PAPENBROCK ET AL. 2001). Die drei Wochen alten Pflanzen wurden anschließend im Gewächshaus unter den beschriebenen Bedingungen angezogen.

### 2.3.4 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* in einer Suspensionskultur

*Arabidopsis thaliana* (C24 & starik) wurden steril auf MS-Platten mit Kanamycin ausgesät. Den zwei bis drei Wochen alten Pflanzen wurden Blätter und Wurzeln entfernt und das Hypokotyl auf MS-Platten inkubiert. Es erfolgte die Kallusinduktion, so dass undifferenzierte Zellen gebildet wurden und bei der Präparation von Mitochondrien keine Gewebeunterschiede beachtet werden mussten. Schließlich wurden Suspensionskulturen nach MAY & LEAVER (1993) angezogen. Die Kultivierung fand bei einer Temperatur von 23,5°C statt. Um die Entwicklung reifer Chloroplasten, die sich präparativ nur schlecht von den Mitochondrien trennen lassen, zu unterbinden, wurden die Kulturen im Dunkeln angezogen. Ein gleichmäßiger Sauerstoffeintrag in das Medium wurde durch konstantes Schütteln (90 Umdrehungen pro Minute) gewährleistet.

Das verwendete MS-Medium war ein Vollmedium und ermöglichte optimales Wachstum. 150 ml des autoklavierten Mediums wurden in einen 500 ml Erlenmeyerkolben überführt und mit 2 g Zellen angeimpft. Nach sieben Tagen Inkubation unter den oben genannten Bedingungen wurden die Kulturen für die Mitochondrien-Präparation nach KRUFT ET AL. (2001) verwendet.

**MS-Medium:** 20,6 mM  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 3 mM  $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 1,5 mM  $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 18,8 mM  $\text{KNO}_3$ , 0,97 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 58 mM Saccharose, 550 mM Myo-Inosit, 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,19  $\mu\text{M}$   $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ , 0,1  $\mu\text{M}$   $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ , 102  $\mu\text{M}$  EDTA, 0,1 mM  $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ , 1  $\mu\text{M}$   $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ , 5  $\mu\text{M}$  KJ, 30  $\mu\text{M}$   $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ , 4  $\mu\text{M}$  Nicotinsäure, 2,26  $\mu\text{M}$  Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D), 1,88  $\mu\text{M}$  Pyridoxolhydrochlorid, 0,29  $\mu\text{M}$  Thiaminiumdichlorid, 100  $\mu\text{M}$   $\text{FeSO}_4$ , pH 5,7

## 2.4 Mitochondrienisolierung aus Pflanzenmaterial und Zellkulturen

Zur Minimierung von Proteaseaktivitäten wurden alle eingesetzten Lösungen und Geräte vorgekühlt. Die gesamten Präparationen, einschließlich der Zentrifugationsschritte, erfolgten bei 4°C oder auf Eis. Den Puffern wurden die Proteaseinhibitoren EDTA (inhibiert Metalloproteasen) und/oder PMSF (inhibiert Serinproteasen) zugesetzt.

### 2.4.1 Präparation von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen nach DAY ET AL. (1985); modifiziert

Die oberirdischen Pflanzenorgane wurden drei Stunden nach Einschalten der Zusatzbelichtung geerntet, indem sie mit einer großen Rasierklinge (10 cm x 1 cm) abgetrennt wurden. Das Frischgewicht wurde bestimmt und anschließend in 5 ml Medium I pro g Frischgewicht aufgenommen und in einem Mixer (Braun) zerkleinert. Die Pflanzenteile wurden bei höchster Stufe fünfmal zwei Sekunden homogenisiert und durch Nylongaze mit einer Porenweite von 40 µm gefiltert. Das Filtrat wurde für 10 Minuten bei 2.000xg in einem GSA-Rotor (Sorvall) zentrifugiert, um Zelltrümmer von den Mitochondrien zu trennen. Der Überstand wurde 20 Minuten bei 12.000xg zentrifugiert. Das bei dieser Zentrifugation entstehende mitochondrienhaltige Pellet wurde in 50-100 ml Medium I resuspendiert und in einem Dounce-Homogenisator durchmischt. Es folgte eine weitere Zentrifugation von fünf Minuten bei 1.500xg im SS34-Rotor (Beckmann). Der Überstand wurde erneut für 20 Minuten bei 12.000xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2-12 ml Medium II resuspendiert und nochmals homogenisiert. Je 2 ml der Mitochondriensuspension wurden auf 32 ml Medium III aufgetragen, das einen linearen PVP-25- Gradienten von 0-10 % [w/v] enthielt. Während der 45-minütigen Zentrifugation bei 70.000xg im SW28-Rotor (Beckmann) baute sich ein linearer Dichtegradient auf. Die Mitochondrien bildeten eine gelblich-weiße Bande nahe des Röhrchenbodens und wurden mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Um das Percoll zu entfernen, wurden die Mitochondrien 1:5 mit Medium II (ohne BSA) verdünnt und zweimal bei 15.000xg für 10 Minuten gewaschen (SS34-Rotor).

**Medium I:** 0,3 M Mannit, 25 mM Natriumpyrophosphat, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1 mM EDTA, 0,2 % BSA, 0,5 % PVP-40, 4 mM L-Cystein, pH 7,6

**Medium II:** 0,3 M Mannit, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2 mM Glycin, pH 7,2, 0,1 % BSA

**Medium III:** 0,3 M Saccharose, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2, 0,1 % [w/v] BSA, 28 % Percoll

## 2.4.2 Präparation von Mitochondrien aus *Pisum sativum*-Pflanzen nach DAY ET AL. (1985); modifiziert

300 g Erbsenblätter wurden in einem Mixer in 300 ml Aufschlusspuffer zerkleinert, durch vier Lagen Mull und dann durch eine Nylongaze mit 50 µm Porenweite filtriert. Anschließend wurde das Filtrat bei 2.000xg für 10 Minuten zentrifugiert (GSA-Rotor) und so von einem Grossteil der Chloroplasten befreit. Der Überstand wurde für 20 Minuten bei 12.000xg im GSA-Rotor zentrifugiert. Das bei dieser Zentrifugation entstehende mitochondrienhaltige Pellet wurde in 100 ml Resuspensionspuffer resuspendiert und dann bei 1.500xg für fünf Minuten zentrifugiert, wobei die Thylakoide pelletieren. Der Überstand wurde für 20 Minuten bei 12.000xg zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wurde in 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Je 1,5 ml der Mitochondriensuspension wurden auf 32 ml einer Gradientenlösung aufgetragen, die einen linearen PVP-25-Gradienten von 0 - 10 % [w/v] enthielt. Während der 45-minütigen Zentrifugation bei 40.000xg (SW28-Rotor) baute sich ein linearer Dichtegradient auf. Die Mitochondrien bildeten eine gelblich-weiße Bande nahe des Röhrchenbodens und wurden mit einer Pasteurpipette abgesaugt. Um das Percoll zu entfernen, wurden die Mitochondrien 1:5 mit Resuspensionspuffer verdünnt und zweimal bei 15.000xg für 20 Minuten gewaschen (SS34-Rotor). Aus 300 g Erbsenblättern konnten ca. 10 mg mitochondriales Protein isoliert werden.

**Aufschlusspuffer:** 0,3 M Mannitol, 25 mM Pyrophosphat, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,6, 1 mM EDTA, 0,2 % [w/v] BSA, 0,5 % [w/v] PVP-40, 4 mM L-Cystein

**Resuspensionspuffer:** 0,3 M Mannitol, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7,2, 2mM Glycin, 0,1 % [w/v] BSA

**Gradientenlösung:** 0,3 M Saccharose, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7,2, 0,1 % [w/v] BSA, 28 % [v/v] Percoll

### 2.4.3 Präparation von Mitochondrien aus *Nicotiana tabacum*-Pflanzen nach CHAUMONT ET AL. (1994)

8 bis 10 g Tabakblätter wurden mittels eines Ultra-Turrax in 35 ml Aufschlusspuffer zerkleinert. Nach Filtrationen durch zwei Lagen Mull und eine Nylongaze mit 50 µm Porengröße wurde 1 ml des Homogenates abgenommen und für fünf Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, um so einen cytosolischen Überstand und ein organelles Pellet zu erhalten. Das restliche Homogenat wurde 30 Sekunden bei 4.500xg in einem SS34-Rotor (Sorvall) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 2 ml Suspensionspuffer aufgenommen. Je 1 ml dieser Suspension wurde auf einen zweistufigen Percoll-Gradienten I aufgetragen und 10 Minuten bei 14.400xg in einem SW40-Rotor (Beckmann) zentrifugiert. Die Interphase enthielt die Chloroplasten, während sich die Mitochondrien im Überstand befanden. Aus diesem mitochondrienreichen Überstand wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation für 12 Minuten bei 27.000xg im SS34-Rotor pelletiert. Das Pellet wurde in 2 ml Suspensionspuffer aufgenommen, auf einen weiteren zweistufigen Percoll-Gradienten II aufgetragen und 30 Minuten bei 78.500xg zentrifugiert (SW40-Rotor). Die mitochondrienreiche Interphase wurde mit einer Pasteur-Pipette abgesaugt und in Suspensionspuffer ohne BSA für fünf Minuten bei 15.000xg in einer Eppendorf-Zentrifuge gewaschen.

**Aufschlusspuffer:** 0,33 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,2 % [w/v] BSA, 0,4 % [v/v] β-Mercaptoethanol

**Suspensionspuffer:** 0,4 M Mannitol, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,2 % [w/v] BSA, pH 7,2

**Percoll-Gradient I:** 4 ml einer 80 %igen Percoll-Lösung und 5 ml einer 40 %igen Percoll-Lösung in 250 mM Saccharose, 0,2 % [w/v] BSA

**Percoll-Gradient II:** 3 ml 45 %ige Percoll-Lösung und 4,5 ml 21 %ige Percoll-Lösung in 250 mM Saccharose, 0,2 % [w/v] BSA

#### **2.4.4 Präparation von Mitochondrien aus *Nicotiana tabacum*-Pflanzen nach NEUBURGER ET AL. (1982); modifiziert**

100 g Tabakblätter wurden nach Entfernen der Mittelrippe in einem Mixer in 6 ml Homogenisationspuffer pro g Frischgewicht aufgenommen und im Mixer zweimal bei niedrigster Geschwindigkeit für fünf Sekunden und einmal bei höchster Geschwindigkeit für drei Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde durch Nylongaze mit einer Porenweite von 70 µm und ein weiteres Mal durch Nylongaze mit einer Porengröße von 40 µm gefiltert und das Filtrat anschließend für 20 Minuten bei 1.000xg im GSA-Rotor (Sorvall) zentrifugiert. Der Überstand wurde für 20 Minuten bei 14.333xg im GSA-Rotor zentrifugiert und das Pellet danach in 10 ml Waschpuffer resuspendiert. Die Suspension wurde dreimal im Dounce-Homogenisator durchmischt und mit Waschpuffer auf 100 ml aufgefüllt. Es folgte eine weitere Zentrifugation von 20 Minuten bei 1.000xg im GSA-Rotor. Der Überstand wurde 20 Minuten bei 14.333xg zentrifugiert und das Pellet in 5 ml Waschpuffer aufgenommen, dreimal im Dounce-Homogenisator durchmischt und auf ein entsprechendes Endvolumen von 3 ml pro Dichtegradient eingestellt. Es folgte eine Zentrifugation im SS34-Rotor für eine Stunde bei 40.000xg. Die mitochondrienreiche Phase befand sich im unteren Teil des Röhrchens und wurde abgenommen. Die isolierten Mitochondrien wurden 1:10 mit Waschpuffer ohne BSA verdünnt und für 20 Minuten und 14.333xg zentrifugiert.

**Homogenisationspuffer:** 30 mM Natriumpyrophosphat, 300 mM Saccharose, 2 mM EDTA, 0,3 % BSA, 0,8 % PVP-25, 3 mM L-Cystein, 5 mM Glycin, 2 mM Mercaptoethanol, pH 7,5

**Waschpuffer:** 10 mM Kaliumphosphat, 300 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 0,1 % BSA

**Dichtegradient:** 10 mM Kaliumphosphat, 300 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 0,1 % BSA, 30 % Percoll, 10 % PVP-40

#### **2.4.5 Präparation von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*-Zellkulturen nach KRUFTE ET AL. (2001)**

Die Zellen der Suspensionskulturen wurden vom Nährmedium über ein Sieb getrennt, das Frischgewicht bestimmt, in 2 ml Aufschlusspuffer pro g Frischgewicht aufgenommen und in

einen Mixer überführt. Durch dreimaliges Homogenisieren für jeweils 15 Sekunden wurden die Zellen zerkleinert und das Homogenat durch Mull gefiltert. In zwei Waschschrritten für fünf Minuten bei 2.700xg im GSA-Rotor wurden die groben Zellbruchstücke abzentrifugiert und anschließend die Mitochondrien durch eine 10-minütige Zentrifugation bei 17.000xg pelletiert. Das mitochondrienhaltige Pellet wurde in Waschpuffer mit einem Pinsel resuspendiert und durch zweimaliges Betätigen des Dounce-Homogenisators durchmischt. Je 3 ml der Suspension wurden auf einen dreistufigen Dichtegradienten aufgetragen und für 45 Minuten bei 70.000xg im SW28-Rotor zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden an der 23 % / 40 %-Interphase mit einer Pasteurpipette entnommen und durch zweimaliges Zentrifugieren in Resuspensionspuffer für 10 Minuten bei 14.500xg in einem SS34-Rotor vom Percoll befreit und pelletiert.

**Aufschlusspuffer:** 450 mM Saccharose, 1,5 mM EDTA, 0,2 % [w/v] BSA, 0,2 % [w/v] PVP-40, 10 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 15 mM MOPS/KOH, pH 7,4

**Waschpuffer:** 300 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM MOPS/ KOH, pH 7,2

**Dichtegradient:** 10 ml einer 18 %igen über 10 ml einer 23 %igen und 10 ml einer 40 %igen Percoll-Lösung in 0,3 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,2

**Resuspensionspuffer:** 0,4 M Mannitol, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM Tricin/KOH, pH 7,2

## **2.5 Methoden zur Beurteilung der Reinheit mitochondrialer Fraktionen**

### **2.5.1 Chlorophyll-Messung nach ARNON (1949)**

Eine Methode, Verunreinigungen mitochondrialer Fraktionen mit Chloroplasten oder Chloroplastenfragmenten festzustellen, besteht darin, die Fraktionen auf Chlorophyll zu untersuchen. In diesem Fall wurden 20 µl der Mitochondriensuspension mit 1 ml 80 %igem Aceton vermischt und zwei Minuten in einer Eppendorftischzentrifuge bei 14.000rpm

zentrifugiert. Anschließend wurde die Extinktion (E) des Überstands bei 662 nm und 645 nm gemessen und wie folgt berechnet:

$$[? \text{ Chlorophyll}] = (20,2 * E_{645\text{nm}} + 8,02 * E_{662\text{nm}}) * 0,051$$

### **2.5.2 Fumarase-Messung nach BERKEMEYER ET AL. (1998); modifiziert**

Um die Reinheit der isolierten Mitochondrien zu überprüfen, wurde die Aktivität eines speziellen Markerenzym gemessen. Die mitochondriale Fumarase wurde photometrisch nach BERKEMEYER ET AL. (1998) bestimmt. Bei einem Gesamtvolumen von 3 ml enthielt der Reaktionspuffer 300  $\mu\text{M}$   $\text{KH}_2\text{PO}_4$  und 150  $\mu\text{M}$  L-Malat und einen pH 7,4. Die Temperatur ist konstant bei 25°C. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 20  $\mu\text{l}$  einer Suspension isolierter Mitochondrien gestartet. Die Fumarat-Produktion wurde durch Messen der Absorption bei 240 nm im Photometer überwacht.

### **2.5.3 Messung des Sauerstoffverbrauchs isolierter Mitochondrien nach DAY ET AL. (1985); modifiziert**

Der respiratorische Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien wurde mit einer Clark-Elektrode bei 25°C gemessen. Nach DAY ET AL. (1985) wird die Sauerstoffkonzentration in Luft-gesättigtem Wasser als 240  $\mu\text{M}$  angenommen. Die Elektrode wurde bei allen Experimenten mit 3 ml Reaktionsmedium und 50  $\mu\text{l}$  isolierten Mitochondrien gefüllt. Im ersten Test wurden Mitochondrien anhand ihres Sauerstoffverbrauchs detektiert. Dazu wurden dem Reaktionsmedium und den Mitochondrien 1 mM ADP zugesetzt, bevor die Stimulation der Respiration der Mitochondrien durch Zugabe von Succinat (Endkonzentration: 10 mM) gemessen wurde. Die Intaktheit der Mitochondrien wurde gemäss NEUBURGER ET AL. (1982) überprüft, indem der oben beschriebenen Reaktionsmischung reduziertes Cytochrom c zugegeben und dessen stimulierender Effekt auf die Atmung der Mitochondrien gemessen wurde. Um die Verunreinigung mit Peroxisomen zu überprüfen, wurde der Glycolat-Oxidase-abhängige Sauerstoffverbrauch gemessen. Dazu wurden der Reaktionsmischung in der Clark-

Elektrode zuerst 0,3 mM KCN und dann Glycolat (Endkonzentration: 10 mM) zugegeben (DAY ET AL. 1985).

**Reaktionsmedium:** 0,3 M Mannitol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/pH 7,2 und 0,1 % [w/v] BSA

## 2.6 Chloroplastenisolierung aus *Arabidopsis* und Beurteilung ihrer Intaktheit

### 2.6.1 Chloroplastenisolierung nach JENSEN & BASSHAM (1966); modifiziert

Wie auch bei der Isolierung von Mitochondrien wurden zur Minimierung von Proteaseaktivitäten alle eingesetzten Lösungen und Geräte vorgekühlt. Die gesamten Präparationen, einschließlich der Zentrifugationsschritte, erfolgten bei 4°C oder auf Eis. Geerntet wurde auch hier drei Stunden nach Einschalten der Zusatzbelichtung, indem die oberirdischen Pflanzenorgane mit einer großen Rasierklinge (10 cm x 1 cm) abgetrennt wurden. Das Frischgewicht wurde bestimmt, in 8 ml Isolationsmedium pro g Frischgewicht aufgenommen und in einem Mixer zerkleinert. Das Pflanzenmaterial wurde bei höchster Stufe achtmal eine Sekunde homogenisiert und anschließend durch Nylongaze mit einer Porenweite von 40 µm gefiltert. Das Filtrat wurde für eine Minute bei 1.500xg zentrifugiert. Das bei dieser Zentrifugation entstehende chloroplastenreiche Pellet wurde in 100-200 ml Suspensionsmedium resuspendiert und erneut für eine Minute bei 1.500xg zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das Gewicht des Chloroplastenpellets wurde ermittelt und in 3 ml Suspensionsmedium aufgenommen.

**Isolationsmedium:** 330 mM Sorbitol, 50 mM MES/KOH, pH 6,5, 10 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM NaCl, 0,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 4 mM L-Cystein, 2 mM EDTA

**Suspensionsmedium:** 330 mM Sorbitol, 50 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 10 mM Tris, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 20 mM NaCl, 5 mM Ascorbat, 2 mM NaNO<sub>3</sub>, 2 mM EDTA

## 2.6.2 Intaktheitsüberprüfung der isolierten Chloroplasten nach LEEGOOD & MALKIN (1986)

Die Intaktheitsüberprüfung der isolierten Chloroplasten verlief über die Messung der Elektronentransportrate ihrer Membransysteme. Hierzu wurde ein Aliquot von 100 µl der isolierten Chloroplastensuspension entnommen und mit 1 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$  und 900 µl Suspensionsmedium (2.6.1) versetzt. Eine Kontrolle wurde wie folgt angesetzt: 100 µl der Chloroplastensuspension, 900 µl  $H_2O$  und 1 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ . Durch die Zugabe des  $H_2O$  wurden die Chloroplasten zu 100 % zerstört und stellten so eine Negativkontrolle dar. Die Proben wurden fünf Minuten stark belichtet, wobei der Elektronentransport über die Membranen induziert wurde und eine Reduktion des dreiwertigen Kaliumhexacyanoferrats stattfand. Um diese Reaktion zu stoppen, wurde unmittelbar nach der Belichtungszeit 100 µl 3 M  $HClO_4$  zu jeder Probe dazugegeben. Die Eppendorfgefäße wurden für zwei Minuten bei 16.000 xg zentrifugiert und die Extinktionen der Überstände bei einer Wellenlänge von 420 nm gemessen. Daraus ergab sich folgende Berechnung für die Bestimmung der Intaktheit von isolierten Chloroplasten:

Extinktion der isolierten Chloroplasten =  $E_C$

Extinktion der Negativkontrolle =  $E_N = 100 \%$

Berechnung der zerstörten Chloroplasten in % :  $x = E_C * 100 / E_N$

Der so errechnete Wert muss von 100 subtrahiert werden und man erhält den Intaktheitsgrad der Chloroplasten in %.

## 2.7 Methoden zur Proteinbestimmung

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden die Methoden von BRADFORD (1976) und LOWRY ET AL. (1951) angewandt. Als besonders geeignet erwies sich die BCA-Methode (BCA=bicinchonic acid) nach STOSCHECK (1990) für die Analyse von Proben mit hohem Membranproteinanteil. Die Lipide in den Membranfragmenten, die bei anderen Proteinbestimmungen zu nicht-linearen Messergebnissen führten, störten bei der BCA-Methode nicht. In alkalischen Lösungen wird in Gegenwart von Proteinen (Mischungsverhältnis 20:1)  $Cu^{2+}$  zu  $Cu^+$  reduziert.  $Cu^+$  bildet mit BCA einen violett gefärbten

Komplex, der in alkalischen Medien stabiler ist als der Folin-Komplex des LOWRY-Tests, weshalb der Test weniger störanfällig als der LOWRY-Test ist. Das Arbeiten in alkalischer Lösung erleichtert den Nachweis von Membranproteinen, die im BRADFORD-Test (saure Bedingungen) in der Regel nicht in Lösung gehen. Der Messbereich reicht von 0,2 bis 50 µg Protein. Dieses Indikator-Reagenz setzt sich aus 100 Volumenteilen Lösung I und zwei Volumenteilen Lösung II zusammen. 1 ml des Indikator-Reagenz wurde mit 20 µl Probe gemischt, 30 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert und nach dem Abkühlen der Proben innerhalb einer Stunde im Photometer, bei einer Wellenlänge von 562 nm bestimmt.

**Lösung I:** 25,75 mM Na-Bicinchoninat (BCA), 188 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 M NaHCO<sub>3</sub>, 5,67 mM Na-Tartrat/NaOH, pH 11,25

**Lösung II:** 160 mM CuSO<sub>4</sub> x 5 H<sub>2</sub>O-Lösung

## **2.8 Auftrennung von Proteinen mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese**

### **2.8.1 Blau-native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) nach SCHÄGGER & VON JAGOW (1991)**

Die blau-native Gelelektrophorese wurde zur zweidimensionalen Auftrennung mitochondrialer Proteinkomplexe angewandt. Diese Methode ermöglicht eine native Auftrennung von Proteinkomplexen im Bereich von ca. 6,5 kDa bis 56 kDa. Neben einem Acrylamidgradienten wurde auch ein Glyceringradient genutzt, um Diffusion der Acrylamidmoleküle zwischen dem Giessen und der vollständigen Polymerisation möglichst gering zu halten.

## 2.8.2 Herstellung, Beladung und Lauf der ersten Dimension einer BN-PAGE

Die Auftrennung mitochondrialer Proteine wurde in einem Gel, bestehend aus einem Trenn- und einem Sammelgel, in einer Dicke von 1,5 mm durchgeführt. Bei dem Trenngel handelte es sich um ein Gradientengel mit einer Polyacrylamid-Konzentration von 4,5-16 %, das mit Hilfe eines Gradientenmischers bei 4°C gegossen wurde. Alle verwendeten Utensilien und Lösungen (außer Glycerin) wurden ebenfalls auf 4°C vorgekühlt.

Zunächst wurde eine Schlauchfüllung bidestilliertes Wasser zwischen die zwei Platten des Gelgießstandes gepumpt. Es folgte eine Unterschichtung mit 2,5 ml 4,5 %iger Polyacrylamidlösung, dann wurden die beiden Kammern des Gradientenmischers verbunden, so dass sich durch Vermischen der beiden Gellösungen die Acrylamidkonzentration sukzessive erhöhte. Nach Polymerisierung der Trennphase wurde das Sammelgel mit Taschen für 10 Proben gegossen.

Die Organellen wurden bei 4°C aufgetaut und für fünf Minuten bei 15.300xg und 4°C zentrifugiert, um sie so zu pelletieren. Das Pellet wurde zunächst in 75 µl Aminocaprinsäure (ACA 750) aufgenommen und reduspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 15 µl 10 %-n-Dodecylmaltosid. Die Kombination aus Salzlösung und Detergenz diente der Solubilisierung der organellaren Proteinkomplexe. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 15.300xg zentrifugiert, um die unlöslichen Bestandteile zu pelletieren, die dann verworfen wurden. Der Überstand wurde in Eppendorfgefäße überführt, in die zuvor je 25 µl Bromphenolblau (BPB) pipettiert wurde. Das Einwandern der Proben erfolgt für 45 Minuten bei konstanten 100 V, die weitere Auftrennung bei konstanten 15 mA in einem Zeitraum von 11 Stunden. Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der einzelnen Komplexe in ihre Untereinheiten unter denaturierenden Bedingungen mittels Tricin-SDS-PAGE.

**Tabelle 2:** Pipettierschema für ein Gradientengel im Gradientenmischer

	Vordere Kammer 4,5 %	Hintere Kammer 16 %
H <sub>2</sub> O	15,6 ml	6,0 ml
6x Gelpuffer (1,5 M ACA, 150 mM Bis-Tris/HCl, pH 7,0)	3,5 ml	3,0 ml
Acrylamid [49,5 %]	1,9 ml	6,0 ml
Glycerin [100 %]	---	3,5 ml
APS [10 %]	95 µl	61 µl
TEMED	9,5 µl	6,1 µl

### 2.8.3 Tricin-SDS-PAGE als zweite Dimension einer BN-PAGE

Als Gelapparatur dient das Protean II-Modell. Die Geldimensionen betragen 20 x 16 x 0,1 cm. Aus der ersten Dimension eines Blau-nativen Gels wurden die einzelnen Gelspuren ausgeschnitten und für 45 Minuten in Denaturierungslösung inkubiert. Da  $\beta$ -Mercaptoethanol die Polymerisation von Polyacrylamid stark hemmt, müssen die Gelstreifen gründlich mit H<sub>2</sub>O gespült werden, bevor sie auf einer Glasscheibe der Gelgießeinrichtung in Höhe der sonst vorhandenen Geltaschen quer zur Laufrichtung des Gels platziert werden. Trenn- und Spacergel wurden am Gelstreifen vorbei in die Apparatur gegossen. Nach deren Polymerisation wurde der Gelstreifen in das Probengel gegossen, so dass er knapp überschichtet war. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA und maximal 500 V für 16,5 Stunden bei Raumtemperatur.

**Denaturierungslösung:** 1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1 % SDS

**Probengel:** Polyacrylamid, T = 10 % / C = 3 %, 500 mM ACA, 10 % Glycerin, 0,1 % SDS, 50 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4°C

### 2.8.4 Probenaufbereitung für eine Proteinauftrennung mittels Tricin-SDS-PAGE

Je nach Bestimmungszweck wurden zwischen 5-100  $\mu$ l der Organellensuspension für 15 Minuten bei 18.000xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde daraufhin in derselben Menge Lysispuffer zunächst ohne Zusatz des DTT aufgenommen und für 30 Minuten unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde lediglich ein Aliquot für die Proteinbestimmung nach STOSCHECK (1990) entnommen, wobei zur restlichen Probe 1  $\mu$ l der zuvor angesetzten 2,5 M DTT Lösung gegeben wurde. Es folgte eine Inkubation von 30 Minuten auf dem Schüttler. Anschließend wurde die Suspension für 20 Minuten bei 18.000xg zentrifugiert. Das Lysat wurde im Verhältnis 1:6 mit Rehydrierungspuffer vermengt. Das Gesamtvolumen darf nicht mehr als 300  $\mu$ l betragen und eine Salzkonzentration von 40 mM nicht überschreiten. Das Gemisch aus definierter Probenmenge und Rehydrierungspuffer wurde luftblasenfrei in den Fokussierungs-Träger pipettiert und der IPG-Streifen mit der Gelseite nach unten

aufgelegt. Um Evaporation und eine Harnstoffausfällung der Probe bzw. des Gels während der isoelektrischen Fokussierung (IEF) zu vermeiden, wurden die IPG-Streifen mit 800 µl Mineralöl überschichtet. Der Fokussierungs-Träger wurde auf der PROTEAN-IEF-Cell positioniert und folgendes Programm für die IEF gewählt. Nach 12 Stunden aktiver Rehydrierung (50 mA und 20°C) folgte die Fokussierung in drei Schritten: 20 Minuten bei 250 V, anschließend ein Gradient von 2,5 Stunden (250-1.000 V). Die Fokussierung ist abgeschlossen, wenn 40.000 V nach vier Stunden erreicht sind. Die gesamte IEF dauert in etwa 20 Stunden (12 Stunden Rehydrierung und ca. 8 Stunden Fokussierung).

**Lysispuffer**: 8,0 M Harnstoff, CHAPS 4% [v/v], 40 mM Tris pH 8,8, 50 mM DTT, 0,1 mM PMSF

**Rehydrierungspuffer**: 8,0 M Harnstoff, 2,0 % [v/v] CHAPS, Bromphenolblau, 20 mM DTT, 0,5 % [v/v] immobilierter pH-Gradient (IPG) Puffer

### **2.8.5 Isoelektrische Fokussierung (IEF) der Proteine**

Die Proteine wurden während der Fokussierung nach ihren isoelektrischen Punkt (pI) in dem immobilen pH-Gradienten (IPG) aufgetrennt. Die IPG-Streifen wurden nach abgeschlossener Fokussierung gründlich mit doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O gespült und dann in einen Einweg-Träger überführt. Es schließt sich eine Equilibrierung der IPG-Streifen an. Hierzu wurden sie jeweils 15 Minuten in Equilibrierungslösung I und Equilibrierungslösung II geschüttelt. Den Equilibrierungslösungen I und II wurden DTT und Jodacetamid unmittelbar vor Gebrauch zugegeben. Anschließend wurden die Streifen für zwei Minuten mit Gelpuffer gespült, auf die zweite Dimension gebracht und mittels einer Agarose-Überschichtungslösung auf dem Gel fixiert. Der Gellauf selbst fand bei konstanter Stromstärke von 30 mA statt und dauerte ca. 20 Stunden. Dabei darf die Spannung ein Maximum von 500 V nicht überschreiten.

**Equilibrierungslösung I:** 50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 6M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 1 % [w/v] DTT und etwas Bromphenolblau

**Equilibrierungslösung II:** 50 mM Tris/HCl, pH 8,8, 6 M Harnstoff, 30 % Glycerin, 2 % SDS, 260 mM Iodacetamid und etwas Bromphenolblau

**Gelpuffer:** 3 M Tris/HCl, pH 8,45, 3% SDS

**Agarose-Überschichtungslösung:** 5 % Agarose in Gelpuffer mit wenig Bromphenolblau

### 2.8.6 Tricin-SDS-PAGE nach SCHÄGGER & VON JAGOW (1987); modifiziert

Bei dieser Elektrophoresetechnik werden die vorher auf dem IPG-Streifen fokussierten Proteine unter denaturierenden Bedingungen nach ihrer Größe in einem Tricin-SDS-Gel separiert. Das in der Regel homogen vernetzte Tricin-SDS-Gel wird mit dem Puffersystem nach LAEMMLI (1970) ohne Sammelgel hergestellt. Die Gießkassette wird nicht vollständig mit der Gellösung gefüllt, sondern nur bis ca. 2 mm unterhalb der Kante der kleineren Glasplatte, so dass der IPG-Streifen noch bequem aufgelegt werden kann. Das Gel wurde nach dem Giessen mit Überschichtungslösung bedeckt. Unmittelbar vor Gebrauch der Gele wurde diese Lösung abgossen und der equilibrierte IPG-Streifen auf das Gel gelegt.

**Überschichtungslösung:** 1 M Tris/HCl, pH 8,45, 0,1 % SDS

**Tabelle 3:** Pipettierschema für ein 12,0 %iges Polyacrylamidgel

Acrylamid [49,5%]	10,9 ml
ddH <sub>2</sub> O	13,1 ml
Gelpuffer (3 M Tris/HCl, pH 8,45, 3% SDS)	15,0 ml
Glycerin [87%]	6,0 ml
APS	150,0 µl
TEMED	15,0 µl

## 2.9 Methoden zur Anfärbung von Proteinen in Gelen

In dieser Arbeit wurden drei Methoden zur Anfärbung von Proteinen in Gelen angewandt, eine Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988), eine Coomassie-Färbung nach NEUHOFF ET AL. (1985) und eine kommerziell erhältliche Coomassie-Färbung der Firma Roth (nach Angaben des Herstellers). Die Färbung von Proteingelen mit Silbernitrat hat im Vergleich zu den Coomassie-Färbungen eine höhere Sensitivität. Mit der Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) können Proteinspots bis zu 0,5 ng-Protein detektiert werden, wohingegen mit den Coomassie-Färbungen lediglich eine Sensitivität von 15-20 ng-Protein erreicht wurde. Diese Coomassie-Färbungen eignen sich insbesondere für die Färbung von Gelen für präparative Zwecke, so z.B. für Gele, aus denen Proteinspots ausgeschnitten und massenspektrometrisch identifiziert werden sollen.

### 2.9.1 Silberfärbung von Proteingelen nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988); modifiziert

Zur Durchführung einer Silberfärbung wurde ein Gel mit den Dimensionen 20 x 20 cm zunächst zwei Stunden in 150 ml Fixierlösung geschwenkt, dann weitere zwei Stunden in 150 ml Inkubationslösung. Es folgten drei Waschstufen von je 20 Minuten in H<sub>2</sub>O. Die Bindung des Silbers an die Proteine erfolgte während einer 30 minütigen Inkubation in Silbernitratlösung. Das überschüssige Silbernitrat wurde durch gründliches Spülen (30 Sekunden) mit H<sub>2</sub>O entfernt. Dann wurde das Gel solange im Entwickler inkubiert, bis das Proteinmuster erkennbar war. Die Entwicklung wurde durch Schwenken in Stopplösung (0,05 M EDTA) beendet. Bei der Silberfärbung handelt es sich um keine Endpunktfärbung.

**Fixierlösung:** 50 % Methanol und 10 % Essigsäure

**Inkubationslösung:** 30 % Ethanol, 0,8 M Natriumacetat, 0,2 % [w/v] Natriumthiosulfat, 0,5 % Glutaraldehyd

**Silbernitratlösung:** 0,1 % [w/v] Silbernitrat und 0,01 % Formaldehyd

**Entwickler:** 2,5 % [w/v] Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 0,1 % Formaldehyd, pH 10,9 mit NaHCO<sub>3</sub>-Pulver eingestellt

## 2.9.2 Coomassie-Colloidal-Färbung von Proteingelen nach NEUHOFF ET AL. (1985) und nach Roti-Blue

Zur Durchführung der Coomassie-Colloidal-Färbung nach NEUHOFF ET AL. (1985) wurden am Vortag der Färbung 150 ml Färbelösung aus 98 % [v/v] Lösung A und 2 % [v/v] Lösung B angesetzt und über Nacht durchmischt. Das Gel mit den Dimensionen 20 x 20 cm wurde für eine Stunde in einer Fixierungslösung I geschwenkt und dann über Nacht in 80 % Färbelösung und 20 % Methanol gefärbt. Danach wurde das Gel mit viel H<sub>2</sub>O entfärbt. Bei starker Hintergrund-Färbung kann zum Entfärben auch 20 % Methanol verwendet werden.

Zur Coomassie-Colloidal-Färbung nach Roti-Blue wurde ein 20 x 20 cm großes Gel für eine Stunde in 100 ml Fixierungslösung II geschwenkt und dann über Nacht in 100 ml der Roti-Blue Färbelösung inkubiert, worauf es mehrmals mit H<sub>2</sub>O entfärbt wurde.

**Lösung A:** 2 % [w/v] *ortho*-Phosphorsäure (85 % H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), 10 % [w/v] Ammoniumsulfat

**Lösung B:** 5 % [w/v] Coomassie Blue G250

**Fixierungslösung I:** 40 % Ethanol, 10 % Essigsäure

**Fixierungslösung II:** 79 ml H<sub>2</sub>O, 1 ml 85 %ige *ortho*-Phosphorsäure, 20 ml Methanol

**Roti-Blue Färbelösung:** 60 ml H<sub>2</sub>O, 20 ml Methanol, 20 ml Roti-Blue 5x Konzentrat

## 2.10 Methoden zur Herstellung von Proteinextrakten verschiedener Herkunft

### 2.10.1 Denaturierende Proteinisolierung aus pflanzlichem Gesamtextrakt

Für die Isolierung von Proteinen aus Pflanzenmaterial unter denaturierenden Bedingungen wurden in einem Eppendorfgemäß 500 µl Proteinextraktionspuffer vorgelegt und 100 mg des in Flüssigstickstoff gemörserten Pflanzenmaterials eingewogen. Die Proben wurden gründlich durchmischt und für 20 Minuten bei 90°C im Heizblock inkubiert. Nach einer Zentrifugation von fünf Minuten bei 16.000xg wurde der Überstand in ein neues Eppendorfgemäß überführt und bei -20°C gelagert.

**Proteinextraktionspuffer:** 56 mM DTT, 2 mM EDTA, 56 mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 12 % Saccharose, 2 % SDS

### **2.10.2 Denaturierende Proteinisolierung aus Chloroplasten**

Das Gewicht des wie unter 2.6.1 beschrieben hergestellten Chloroplastenpellets wurde bestimmt und mit Proteinextraktionspuffer (2.10.1) im Verhältnis 1 mg/100 µl versetzt und resuspendiert. Die Suspension wurde 20 Minuten bei 65°C im Wasserbad homogenisiert und anschließend für fünf Minuten gekocht. Nach einer Zentrifugation von 10 Minuten bei 9.500xg wurden 8 µl (10 µg Protein) des Überstands auf eine eindimensionale SDS-PAGE (LAEMMLI 1970) aufgetragen.

### **2.10.3 Denaturierende Proteinisolierung aus Mitochondrien**

Das gewonnene Mitochondrienpellet wurde mit Proteinextraktionspuffer (2.10.1) im Verhältnis 1 mg/100 µl versetzt und resuspendiert. Die Resuspension wurde 20 Minuten bei 65°C im Wasserbad homogenisiert, anschließend für fünf Minuten gekocht und dann 10 Minuten bei 16.000xg zentrifugiert. 7 µl (10 µg Protein) des Überstandes wurden auf eine eindimensionale SDS-PAGE (LAEMMLI 1970) aufgetragen.

### **2.10.4 Native Proteinisolierung aus Pflanzengesamtextrakt**

Für die Isolierung von Proteinen aus Pflanzenmaterial unter nativen Bedingungen wurden in einem Eppendorfgefäß 988 µl Proteinextraktionspuffer vorgelegt und dann 300 mg des in Flüssigstickstoff gemörserten Pflanzenmaterials eingewogen. Die Proben wurden gründlich durchmischt und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Alle fünf Minuten wurde der Inhalt der Gefäße gründlich durchmischt. Die Zelltrümmer wurden bei 22.000xg für 20 Minuten bei 4°C abzentrifugiert. Die Proteinbestimmung des Überstandes erfolgte nach BRADFORD (1976). Es

folgte eine Proteinfällung durch Zugabe von 80 %igem Aceton über Nacht. Die Proben wurden dann bei 20.000xg und 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und das Pellet getrocknet. Der isolierte Gesamtextrakt wurde mittels 2D-Gelelektrophorese (2.8.4) aufgetrennt.

**Proteinextraktionspuffer:** 50 mM Tris/HCl, pH 7,5- Puffer, 2 µl 1 M DTT/ml, 10 µl/ml Proteinase-Inhibitor

## 2.11 Weitere Elektrophoretische Trennverfahren

### 2.11.1 DNA-Auftrennung in Agarose-Gelen

Die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten erfolgte in 1 %igen TAE-Agarose-Gelen (g/ml). Die Agarose wurde in einmal TAE-Puffer durch Erwärmung in der Mikrowelle gelöst. Vor dem Giessen der Gele wurde 1 µl Ethidiumbromidlösung pro 50 ml Gel hinzugefügt. Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben mit sechsmal DNA-Ladepuffer versetzt. Zur Bestimmung der Fragmentgröße wurde zusätzlich zu den Proben eine 1 kb-Leiter als Standard-Marker aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in mit 1x TAE als Laufpuffer gefüllten Kammern. Nach dem Gellauf wurde das Gel auf einen UV-Tisch überführt und Fragmentgröße der DNA mittels bp-Marker ermittelt. Die so identifizierte DNA-Bande wurde mit einem Gelreinigungs-Kit nach Angaben des Herstellers aus dem Agarosegel eluiert.

**TAE-Puffer:** 40 mM Tris-Acetat, pH 8, 1 mM EDTA

**DNA-Ladepuffer:** 50 % Glycerin, 7,5 mM EDTA, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanol

**Ethidiumbromidlösung:** 1 % Ethidiumbromid (EtBr) in H<sub>2</sub>O

### 2.11.2 Auftrennung von Proteingestamtextrakten über eindimensionale SDS-PAGE

Zur Auftrennung von Proteinlösungen unter denaturierenden Bedingungen wurde eine Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) in Gegenwart von Natriumdodecylsulfat (SDS) durchgeführt. Die Herstellung der Polyacrylamidgele erfolgte in Anlehnung an das Protokoll von LAEMMLI (1970) und ist in Tabelle 4 und Tabelle 5 zusammengefasst.

**Tabelle 4:** Pipettierschema für vier Mini-Trenngele.

	12,5 % denaturierendes Trenngel
Polyacrylamid [30 %]	10,5 ml
8 fach Trenngelpuffer (3 M Tris/HCl, pH8,8 und 0,267 % TEMED)	3,12 ml
SDS [20 %]	125 µl
H <sub>2</sub> O	11,3 ml
APS [10 %]	250 µl

**Tabelle 5:** Pipettierschema für vier Mini-Sammelgele.

	3,75 % denaturierendes Sammelgel
Polyacrylamid [30 %]	1,25 ml
8 fach Sammelgelpuffer (1 M Tris/HCl, pH6,8 und 0,267 % TEMED)	1,25 ml
SDS [20 %]	50 µl
H <sub>2</sub> O	7,45 ml
APS [10 %]	150 µl

Proteinproben, die eindimensional aufgetrennt werden sollten, wurden im Heizblock für 15 Minuten bei 95°C denaturiert und dann mit einer Hamilton-Spritze auf die Gele aufgetragen. Eine Spur wurde mit 5 µl Protein-Molekulargewichts-Marker beladen. Der Lauf erfolgte bei 10 mA pro Gel im Sammelgel und bei 20 mA pro Gel im Trenngel und dauerte 90 Minuten. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine auf Nitrocellulosemembranen transferiert oder im Gel mit Coomassie-Blau angefärbt. Für die Coomassie-Färbung wurde das Gel für 30 Minuten in 50 ml Färbelösung unter schwenken angefärbt. Um die einzelnen Proteinbanden sichtbar zu machen, wurde das Gel über Nacht mit 50 ml Entfärbelösung inkubiert.

**Färbelösung:** 40 % Methanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % Coomassie-Blau R-250

**Entfärbelösung:** 40 % Methanol und 10 % Essigsäure

## 2.12 Durchführung von Western Blot-Analysen

### 2.12.1 Transfer von Proteinen

Nach abgeschlossener SDS-PAGE wurden die Proteine in einer semi-dry Elektroden-transferapparatur auf Nitrocellulosemembranen übertragen und für die nachfolgende Immundetektion immobilisiert. Bei diesem Verfahren des ElektrobloTTings nach SAMBROOK ET AL. (1989) wurden in Puffer getränkte Filterpapiere, Gel und Membran horizontal zwischen Plattenelektroden aus Graphit gelagert. Auf die Anodenplatte wurden fünf Lagen mit Anodenpuffer (1xRotiA-Blot-Lösung) getränktes Whatmanpapier, die angefeuchtete Membran, das Gel und fünf Lagen mit Kathodenpuffer (1xRotiK-Blot-Lösung) getränktes Whatmanpapier luftblasenfrei geschichtet. Nach Befestigung der Kathodenplatte erfolgte der Transfer innerhalb von 120 Minuten bei einer Stromstärke von 1 mA pro cm<sup>2</sup> Gelfläche. Die Qualität des Transfers wurde im Anschluss durch Anfärbung der Proteinbanden in Ponceau-Lösung überprüft. Vor dem immunologischen Nachweis wurde die Membran durch Schwenken in H<sub>2</sub>O wieder entfärbt.

**Ponceau-Lösung:** 2 % Ponceau S in 30 % TCA, 30 % Sulfosalicylsäure

### 2.12.2 Immunologischer Nachweis von Proteinen und deren Quantifizierung

Um unspezifische Bindungen von Antikörpern an die Membran zu verhindern, wurde die Membran bei Raumtemperatur für 30 Minuten in Blockierungslösung geschüttelt. Als primärer Antikörper wurde ein in Kaninchen erzeugter spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Membran wurde für eine Stunde mit der Antikörperlösung (AK verdünnt mit Blockierungslösung) inkubiert. Zur Entfernung nicht gebundener Antikörper wurde die Membran viermal sieben Minuten mit einmal TBS-Puffer gewaschen.

Anschließend erfolgte die einstündige Inkubation mit dem sekundären Antikörper (anti-Kaninchen-AK), konjugiert mit alkalischer Phosphatase, 1:1.000 mit Blockierungslösung verdünnt. Die Membran wurde erneut viermal sieben Minuten mit einmal TBS-Puffer gewaschen. Nach kurzem Equilibrieren der Membran in TMN-Puffer wurde die Bildung des Farbniederschlags durch Zugabe von 10 ml TMN-Puffer mit 200 µl 50x NBT/BCIP

gestartet. Die Farbreaktion erfolgte ohne Schütteln im Dunkeln und wurde durch Spülen der Membran mit H<sub>2</sub>O beendet.

**Blockierungslösung:** 1 % Milchpulver, 0,1 % Tween 20, 1x TBS-Puffer

**TBS-Puffer:** 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, 150 mM NaCl

**TMN-Puffer:** 100 mM Tris HCl, pH 9,5, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl

## 2.13 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Für die Anzucht von Bakterienkulturen für Plasmid-Mini-Präparationen wurden 3 ml Luria-Bertani-Medium (LB-Medium) inklusive des entsprechenden Antibiotikums mit geringen Mengen einer Glycerinkultur oder mit einer Einzelkolonie von einer LB-Platte angeimpft. Die Kulturen wurden über Nacht bei 37°C auf dem Flachbrettschüttler inkubiert (180 rpm). 1,5 ml einer Über-Nacht-Kultur wurden in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und für 10 Minuten bei 1.500xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Aufschluss der Bakterienzellen erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse (SAMBROOK ET AL. 1989). Dazu wurden die Bakterienpellets zunächst in 0,3 ml Puffer I resuspendiert. Nach Zugabe von 0,3 ml Puffer II wurden die Proben fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Ansätze wurden mit 0,3 ml Puffer III versetzt und für 20 Minuten auf Eis gehalten. Bei der anschließenden Zentrifugation von 15 Minuten bei 4°C und 16.000xg blieb die Plasmid-DNA im Überstand, der in ein frisches Eppendorfgefäß überführt wurde. Die Fällung der Plasmid-DNA erfolgte mit 0,56 ml Isopropanol [0,7 v/v]. Nach erneuter Zentrifugation für 15 Minuten bei 4°C und 16.000xg wurde das Sediment mit 100 µl 70 %igem Ethanol gewaschen, um mitgefällte Salze zu entfernen. Nach einer weiteren Zentrifugation unter denselben Bedingungen wurde das Pellet einige Minuten an der Luft getrocknet und schließlich in 50 µl sterilem H<sub>2</sub>O aufgenommen.

**LB-Medium:** 10 g/L Bakto-Trypton, 5 g/L Hefeextrakt, 10 g/L NaCl, pH 7,0

**Puffer I:** 50 mM Tris HCl pH 8,0, 10 mM EDTA, 100 µg/ml RNase

**Puffer II:** 200 mM NaOH, 1 % Natriumdodecylsulfat

**Puffer III:** 3 M Kaliumacetat, pH 5,5

## 2.14 Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA

Grundlage der Restriktionsanalyse ist die Aktivität von Restriktionsenzymen, die sich an spezifische Erkennungssequenzen doppelsträngiger DNA-Moleküle binden und die DNA-Stränge spalten. Die entstehenden Restriktionsfragmente haben eine durch die Lage der Schnittstellen definierte Länge. Durch Auftrennung der Fragmente im Agarose-Gel ergibt sich ein spezifisches Bandenmuster.

Die zu analysierende Plasmid-DNA wurde in einem Restriktionsansatz mit den gewählten Restriktionsenzymen für *Bam*HI und *Kpn*I inkubiert. Zu 5 µl Plasmid-DNA wurden 0,5 µl von jedem Restriktionsenzym gegeben. Alle Restriktionsansätze enthielten darüber hinaus 2 µl 10 x Restriktionspuffer und wurden mit H<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Ansätze wurden im Wasserbad bei 37°C für mindestens eine Stunde pro Restriktionsenzym inkubiert.

## 2.15 Klonierungstechniken

### 2.15.1 Amplifizierung von cDNA über PCR

Für die Amplifizierung der für das Sta1-Protein codierenden cDNA wurden Primer 86 mit einer Restriktionsschnittstelle für *Bam*HI und Primer 87 mit einer Restriktionsschnittstelle für *Kpn*I eingesetzt. Als Template diente Klon 148 mit dem codierenden Insert für das Sta1-Protein. Die PCR wurde unter Standardbedingungen mit RED<sub>taq</sub>-Polymerase nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die PCR-Bedingungen für die Amplifizierung der cDNA codierend für die lösliche Domäne des Sta1-Proteins waren wie folgt: 45 Sekunden bei 45°C, 60 Sekunden bei 72°C und nochmals 45 Sekunden bei 94°C. Dieser Zyklus wurde insgesamt 28 Mal durchlaufen. Der PCR-Ansatz wurde zur Überprüfung in einem 1 %igen Agarose-Gel aufgetrennt.

**Primer 86:** 5'-CGG ATC CTT CCA GTT GCT AGA-3'

**Primer 87:** 5'-CGG GTA CCG ATA AGG TTA AAC TAT CG-3'

### **2.15.2 Ligation des PCR-Produktes in den Klonierungsvektor pGEM-T**

Die über PCR amplifizierte DNA-Sequenz wurde in den pGEM-T-Vektor kloniert. Entsprechend den Angaben des Herstellers wurden 5 µl 2 x Ligationspuffer, 1 µl Vektor, 1 µl T4-DNA-Ligase sowie 1-3 µl des PCR-Ansatzes bzw. des aus dem Gel eluierten PCR-Produktes in einem Gesamtvolumen von 10 µl gemischt. Die Ansätze wurden über Nacht bei 4°C inkubiert. Der pGEM-T-Vektor trägt ein Ampicillin-Resistenzgen. Der Erfolg der Transformation wurde durch Blau/Weiß-Screening überprüft.

### **2.15.3 Ligation in den Expressionsvektor pQE-30**

Für die Ligation wurden der pQE-30-Vektor und die das Insert enthaltende Plasmid-DNA zunächst mit denselben Restriktionsenzymen geschnitten. Der Verdau mit Restriktionsenzymen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Ein Ligationsansatz enthält 2 µl 10 x Puffer, 0,4 µl 50 mM ATP, 0,4 µl 50 mM DTT, 1 µl T4-DNA-Ligase, den Vektor sowie das Insert in einem Gesamtvolumen von 20 µl. Insert und Vektor wurden in einem molarem Verhältnis von etwa 1:3 bis 3:1 eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über zwei Tage bei 4°C.

### **2.15.4 Herstellung kompetenter *E. coli*-Zellen**

Für die Herstellung kompetenter Zellen mit der Calciumchlorid-Methode nach TANG ET AL. (1994) wurden aus einer Glycerinkultur des *E. coli*-Stamms XL1-Blue 10 ml LB-Medium (2.13) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf dem Schüttler inkubiert (180 rpm). Mit den Über-Nacht-Kulturen wurden 100 ml LB-Medium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben angeimpft. Nachdem die Kultur bis zu einer OD<sub>600</sub> von etwa 0,7 gewachsen war, wurde sie 10 Minuten auf Eis abgekühlt und dann 10 Minuten bei 4.500xg und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 25 ml 0,1 M MgCl<sub>2</sub> resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 4.500xg und 4°C wurden die kompetenten Zellen in 4,3 ml 0,1 M CaCl<sub>2</sub> und 0,7 ml

Glycerin aufgenommen. Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff gefroren und bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert

### **2.15.5 Transformation in *E. coli*-Zellen**

Für die Transformation des *E. coli*-Stamms XL1-Blue nach der Hitzeschockmethode wurde der gesamte Ligationsansatz zu  $200\ \mu\text{l}$  kompetenten Zellen gegeben und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Im Wasserbad wurde der Ansatz 90 Sekunden bei  $42^{\circ}\text{C}$  erwärmt und dann zwei bis drei Minuten auf Eis gehalten. Nach Zugabe von  $950\ \mu\text{l}$  vorgewärmtem SOC-Medium wurde der Ansatz 60 Minuten bei  $37^{\circ}\text{C}$  geschüttelt.  $100\ \mu\text{l}$  und  $200\ \mu\text{l}$  des Transformationsansatzes wurden auf LB-Platten (2.13) mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Falle der Transformation mit dem Vektor pGEM-T enthielten die Agarplatten zusätzlich  $0,5\ \text{mM}$  IPTG und  $80\ \mu\text{g/ml}$  X-Gal (Substrat der  $\beta$ -Galactosidase). Ausgehend von Einzelkolonien wurden  $3\ \text{ml}$  Über-Nacht-Kulturen angeimpft. Aus  $1,5\ \text{ml}$  dieser Kulturen wurde am nächsten Tag die Plasmid-DNA isoliert (2.13) und für eine Restriktionsanalyse (2.14) verwendet. Im Falle der erfolgreichen Ligation und Transformation wurden jeweils aus  $500\ \mu\text{l}$  der entsprechenden Über-Nacht-Kultur und aus  $500\ \mu\text{l}$  sterilem Glycerin Dauerkulturen angelegt. Diese wurden bei  $-70^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die Richtigkeit der Sequenz des offenen Leserahmens (ORF: Open Reading Frame) wurde durch Sequenzierung kontrolliert.

**SOC-Medium**:  $20\ \text{g/L}$  Bacto Trypton,  $5\ \text{g/L}$  Hefeextrakt,  $0,5\ \text{g/L}$  NaCl,  $2,5\ \text{mM}$  KCl,  $10\ \text{mM}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $20\ \text{mM}$  Glucose, pH 7,5

### **2.15.6 Heterologe Proteinexpression in *E. coli***

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Sta1-Protein wurde in dem *E. coli*-Stamm XL1-Blue zur Überexpression gebracht. Für die Induktion wurden  $3\ \text{ml}$  LB-Medium (2.13) mit Ampicillin in ein steriles Reagenzglas gefüllt, mit einer Impföse aus der entsprechenden Glycerinkultur angeimpft und über Nacht bei  $37^{\circ}\text{C}$  auf dem Schüttler ( $180\ \text{rpm}$ ) inkubiert.

Aus dieser Über-Nacht-Kultur wurden 50 ml LB mit Ampicillin, gefüllt in einen 100 ml Erlenmeyer-Kolben, angeimpft. Für ein größeres Induktionsvolumen wurde eine entsprechend größere Anzahl von 3 ml Über-Nacht-Kulturen vorbereitet. Das Wachstum der Schüttelkulturen bei 37°C wurde über die Messung der OD am Photometer verfolgt. Diese Messung bei 600 nm erfolgte gegen das LB-Medium als Blindwert. Sobald die Kulturen eine OD<sub>600</sub> von 0,6-0,8 erreicht hatten, wurde der T7-Promotor durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Kurz vor der Zugabe von IPTG (0 Stunden) sowie nach ein, zwei und drei Stunden wurden von jeder Kultur 1 ml-Aliquots entnommen. Das Wachstum der Kulturen wurde weiterhin anhand der OD<sub>600</sub> überprüft. Nach dreistündiger Induktion wurden die Bakterienkulturen für 10 Minuten bei 2.000xg und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen und die Bakterienpellets bis zur Proteinreinigung bei -20°C gelagert.

Die nach 0, 1, 2 und 3 Stunden entnommenen 1 ml-Proben wurden in der Standardtischzentrifuge für 10 Minuten bei 6.000xg zentrifugiert und die Sedimente in 150 µl 2 x SDS-PAGE-Puffer resuspendiert. Jeweils 15 µl dieser Proben wurden auf ein 12,5 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine im Gel mit Coomassie-Färbelösung (2.11.2) und anschließend mit Entfärberlösung (2.11.2) behandelt.

**2 x SDS-PAGE-Puffer:** 6 % β-Mercaptoethanol, 6 % SDS, 0,6 % BPB, 20 % Glycerin

### 2.15.7 Proteinreinigung über Ni<sup>2+</sup>-Affinitäts-Chromatographie

Das rekombinante Sta1-Protein wurde mit N-terminalem 6xHis-Tag in *E. coli*-Zellen exprimiert und anschließend über Ni<sup>2+</sup>-Affinitäts-Chromatographie gereinigt. Als Säulenmaterial wurde Nickel-NTA Agarose eingesetzt. An das Grundgerüst aus Sepharose CL-6B ist Nitriltriessigsäure (NTA) kovalent gebunden. Als Metall-chelatierende Gruppe kann NTA mit Nickel beladen werden.

Für die Reinigung des His-Tag-Proteins unter denaturierenden Bedingungen wurde das Zellsediment aus 50 ml-Induktionskultur in Lysispuffer A resuspendiert und bei RT eine Stunde über Kopf geschüttelt. Das Lysat wurde 15 Minuten bei 4°C und 10.000xg zentrifugiert und der Überstand auf die equilibrierte Säule (mit 5 ml Lysispuffer A) gegeben. Das Säulenmaterial inklusive Lysat wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert und zwischendurch gemischt, bevor der Überstand eluiert wurde. Das Säulenmaterial wurde anschließend

zweimal mit je 5 ml Lysispuffer B gewaschen. Danach wurde das Protein zweimal mit je 500 µl Lysispuffer B (pH 6,5) in ein Röhrchen eluiert und schließlich fünfmal mit jeweils 500 µl Lysispuffer B (pH 4,5) in einzelne Röhrchen eluiert. Zur Überprüfung des Reinigungsergebnisses wurde auch hier eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Proteinkonzentration wurde nach STOSCHECK (1990) bestimmt.

**Lysispuffer A:** 6 M Guanidiniumhydrochlorid, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0

**Lysispuffer B:** 8 M Harnstoff, 0,1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0,01 M Tris/HCl, pH 8,0

## 2.16 Bestimmung von Metabolitgehalten in C24 und *starik*

### 2.16.1 Bestimmung von Chlorophyll- und Carotinoidgehalten nach LICHTENTHALER (1987)

100 mg unter Stickstoff gemörseretes Blattmaterial von C24 und *starik* wurden in 800 µl 80 % Aceton (-20°C) eingewogen. Der Ansatz wurde für 10 Minuten auf Eis inkubiert und mehrmals gut durchmischt. Das Eppendorfgefäß wurde anschließend für fünf Minuten bei 6.000xg zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Dieses Procedere wurde dreimal mit 400 µl 80 %igem Aceton wiederholt, ein Aliquot des Überstandes entnommen und 1:100 mit 80 %igem Aceton verdünnt. Am Photometer wurde dann die Extinktion bei vier verschiedenen Wellenlängen gemessen: 663,2 nm, 646,8 nm, 470 nm und 750 nm. Von den Extinktionswerten bei 663,2 nm, 646,8 nm und 470 nm wurde der Extinktionswert bei 750 nm subtrahiert und folgende Berechnung durchgeführt:

$$\text{Chlorophyll a} = 12,25 \times A_{663,2} - 2,79 \times A_{646,8}$$

$$\text{Chlorophyll b} = 21,50 \times A_{646,8} - 5,10 \times A_{663,2}$$

$$\text{Chlorophyll a + b} = 7,51 \times A_{663,2} + 18,71 \times A_{646,8}$$

$$\text{Carotinoide} = \frac{1000 \times A_{470} - 1,91 \times \text{Chl.a} - 95,15 \times \text{Chl.b}}{225}$$

### **2.16.2 Elementanalysen über Atomabsorbtionsspektroskopie (AAS)**

Die Elementanalyse wurde freundlicherweise von Dr. M. Hawkesford (Agriculture & Environment Division, IACR Rothamsted, Harpenden, U.K.) durchgeführt. Hierzu wurden isolierte Mitochondrien aus etiolierten Suspensionskulturen, Chloroplasten und pflanzliche Gesamtextrakte von C24 und *starik* untersucht und sind in Tabelle 9 zusammengefasst.

## 3 Ergebnisse

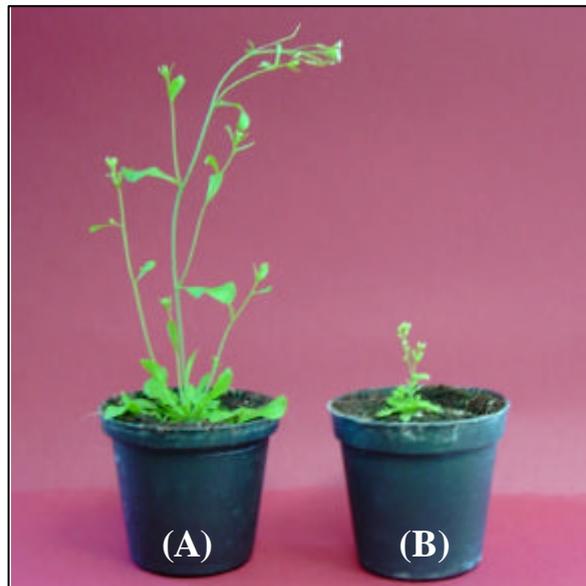
In allen Zellkompartimenten kommen zahlreiche Proteine vor, die Eisen-Schwefel-Zentren (Fe/S-Zentren) oder Hämgruppen als prosthetische Gruppen enthalten. Ziel dieser Arbeit war, die Folgen von Beeinträchtigungen in der Biosynthese von eisenhaltigen Kofaktoren in Höheren Pflanzen zu untersuchen. Hierzu wurde einerseits die *Arabidopsis thaliana*-Mutante *starik* mit dem Wildtyp C24, andererseits die *Nicotiana tabacum* Ferrochelatase-antisense-Linie E82 mit dem Wildtyp SNN vergleichend analysiert. In *starik* sollten die Auswirkungen eines beeinträchtigten mitochondrialen Fe/S-Transporterproteins untersucht werden. Mittels der Tabak-Mutante E82 sollten die Auswirkungen einer Beeinträchtigung in der Hämsynthese näher charakterisiert werden. Zu diesem Zweck wurden die Organellen aus Wildtyp und Mutante der beiden Pflanzenspezies isoliert und über Proteomanalysen vergleichend untersucht. Einer umfassenden physiologischen Darstellung der organellaren Proteine, die an der Fe/S-Zentren-Biosynthese und der Hämsynthese beteiligt sind, liegt eine optimierte Isolation der Zellkompartimente zugrunde. Es wurden verschiedene Methoden zur Isolation von Mitochondrien und Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* und *Nicotiana tabacum* angewandt, modifiziert und etabliert. Um subzelluläre Fraktionen auf Proteomebene zu analysieren, wurde die Methode der zweidimensionalen Gelelektrophorese in diesem Labor eingeführt. Entscheidend bei dieser Methode ist eine optimale Probenaufbereitung. Zum einen dürfen keine Proteine verloren gehen, zum anderen müssen Biomoleküle entfernt werden, die bei der isoelektrischen Fokussierung der Proteine zu störenden Effekten führen. Sehr aufwendig gestalteten sich Arbeiten zur Etablierung reproduzierbarer Methoden zur Isolierung und Aufbereitung von Organellen sowie zu deren Proteomanalyse.

### 3.1 Beschreibung der eingesetzten Versuchsorganismen

Bei der *starik*-Mutante handelt es sich um eine T-DNA-Insertionsmutante eines mitochondrialen Membranproteins aus der Familie der ABC-Transporterproteine (KUSHNIR ET AL. 2001). Parallel wurden etiolierte Suspensionskulturen von C24 und der *starik*-Mutante analysiert. Außerdem wurden *Nicotiana tabacum*-Pflanzen (SNN) und eine Ferrochelatase-antisense-Linie E82 untersucht. Desweiteren wurde für die Isolation von Mitochondrien mit *Pisum sativum*-Pflanzen gearbeitet.

### 3.1.1 Pflanzen von *Arabidopsis thaliana*, Wildtyp C24 und *starik*-Mutante

Abbildung 2 zeigt zwei *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen gleichen Alters. Auf der linken Bildhälfte ist C24 (Abb. 2A), auf der rechten Bildhälfte die *starik*-Mutante (Abb. 2B) gezeigt. Die Pflanzen sind fünf Wochen alt und die Blüte ist bei beiden erreicht. Der Wildtyp ist erheblich größer als die Mutante und der Blütenstand wesentlich ausgeprägter. Aus diesem Bild wird ersichtlich, dass *starik* nicht nur durch Zwergenwachstum, sondern auch durch einen chlorotischen Phänotyp gekennzeichnet ist (siehe auch Abb. 30).

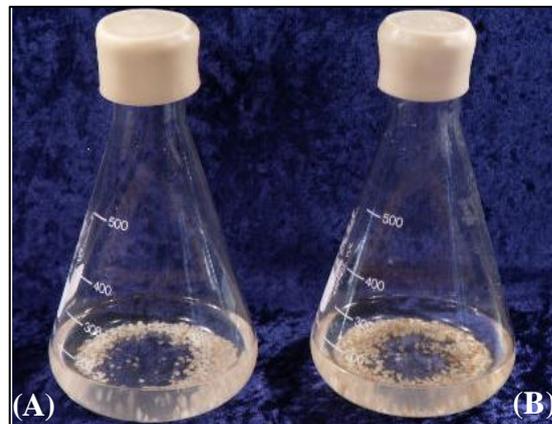


**Abb. 2:** Gezeigt sind gleich alte *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen des Wildtyps C24 (A) und der *starik*-Mutante (B).

### 3.1.2 Suspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana*, C24 und der *starik*-Mutante im Vergleich

Abbildung 3 zeigt etiolierte Suspensionskulturen von C24 (Abb. 3A) und *starik* (Abb. 3B). Die Kulturen sind gleich alt, identisch angelegt und herangezogen worden (2.3). Die

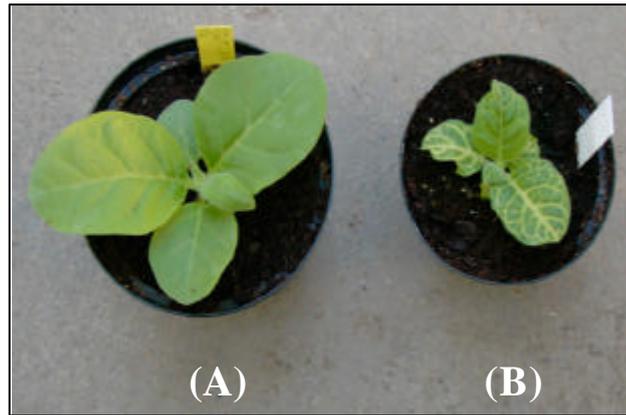
Abbildung ist eine Dokumentation des Entwicklungszustands zum Zeitpunkt der Isolation von Mitochondrien aus Suspensionskulturen von C24 und der *starik*-Mutante. Es sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Zellen von C24 und *starik* erkennbar.



**Abb. 3:** Gezeigt sind gleich alte etiierte Suspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp C24 (A) und der *starik*-Mutante (B).

### 3.1.3 Pflanzen von *Nicotiana tabacum*, Wildtyp SNN, und der transgenen Ferrochelatase-antisense-Linie 82 im Vergleich

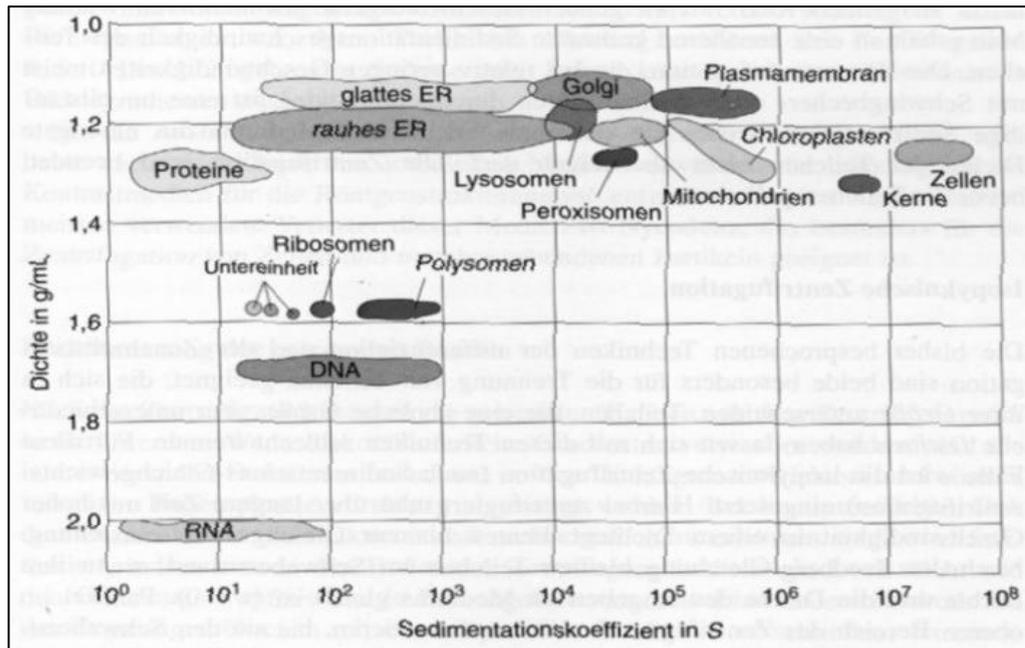
Abbildung 4 zeigt die Tabakpflanzen des Wildtyps SNN (Abb. 4A) und die transgene Ferrochelatase-antisense-Linie E82 (Abb. 4B) im Vergleich. Die Anzahl der Blätter ist bei beiden Pflanzen identisch. Die Blätter von SNN sind von durchgehender Grünfärbung, während die Blätter der transgenen Pflanze entlang der Mittelrippe und den Blattadern deutliche Chlorosen zeigen, wodurch die Blattoberfläche unregelmäßiger erscheint. Die Blätter von SNN sind wesentlich homogener und größer ausgebildet als bei E82. Eine detaillierte physiologische Charakterisierung der transgenen Ferrochelatase-antisense-Pflanzen ist bereits vorgenommen worden (PAPENBROCK ET AL. 2001).



**Abb. 4:** Gezeigt sind *Nicotiana tabacum*-Pflanzen SNN (A) und die transgene Ferrochelatase-antisense-Linie E82 (B). Die transgene Pflanze ist ca. 3 Wochen älter als die Wildtyp-Pflanze.

### 3.2 Analyse von Mitochondrien aus grünem Gewebe

In grünen Pflanzenzellen kommen zahlreiche Zellbestandteile vor, die teilweise eine ähnliche Größe, Dichte sowie Sedimentationseigenschaften im Vergleich zu typischen Pflanzenmitochondrien aufweisen (Abb. 5). Die Form, Größe und Dichte der Chloroplasten ist bei verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich (KIRK & TILNEY-BASSETT 1978, PYKE 1999). Die Dichte der Chloroplasten variiert in Abhängigkeit vom Licht. Darüber hinaus können in Pflanzenzellen neben den Chloroplasten noch weitere Plastidentypen mit physikalischen Eigenschaften, die ebenfalls denen der Mitochondrien ähneln, vorkommen. Die Methode zur Isolierung von Pflanzenmitochondrien muss an die jeweilige Pflanzenspezies und ihren physiologischen Zustand angepasst werden. Da für die Durchführung von Proteomanalysen von Mitochondrien diese in hoher Reinheit vorliegen müssen, wurde in diesem Forschungsprojekt neben Mitochondrien aus pflanzlichem Gewebe auch etioliertes Pflanzengewebe aus *Arabidopsis*-Suspensionskulturen als Ausgangsmaterial für die Isolationen eingesetzt. In diesem Teil der vorliegenden Dissertation wurden verschiedene publizierte Protokolle zur Mitochondrienisolierung aus unterschiedlichen Pflanzen getestet. Die Reinheit der Organellen wurde mit biochemischen, physiologischen und gelelektrophoretischen Verfahren untersucht (HAUSMANN ET AL. 2003A).



**Abb. 5:** Die Abbildung zeigt die Verteilung verschiedener Zellbestandteile bezüglich ihrer Dichte und ihres Sedimentationskoeffizienten (LOTTSPREICH & ZORBAS 1998).

### 3.2.1 Isolierung von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*-, *Pisum sativum*- und *Nicotiana tabacum*-Pflanzen

In der Literatur sind zahlreiche Methoden beschrieben, wie Mitochondrien aus grünem Pflanzengewebe isoliert werden können. Diese sind jedoch fast alle von wenigen „Grundmethoden“ abgeleitet. Alle diese Methoden beruhen auf einer Kombination von differentiellen Zentrifugationen und Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugationen (DOUCE ET AL. 1987; zusammengefasst in MILLAR ET AL. 2001A). Von DAY ET AL. (1985) wurde eine Methode zur Isolierung von Mitochondrien aus Erbsen entwickelt, die oft zitiert und auch für die Isolierung von Mitochondrien aus anderen Pflanzenspezies verwendet wird. Dabei wird ein linearer PVP-25-Gradient, der mit einem selbstaufbauenden linearen Percollgradienten kombiniert ist, verwendet (2.4.2). CHAUMONT ET AL. (1994) gelang die Isolation von Mitochondrien aus Tabak, indem zwei aufeinanderfolgende Percoll-Stufengradienten eingesetzt wurden (2.4.3). Ein kontinuierlicher Percollgradient wurde von BERKEMEYER ET AL. (1998) genutzt, um Mitochondrien aus *Arabidopsis*-Blättern zu isolieren.

### 3.2.2 Biochemische und physiologische Verfahren zur Analyse von gereinigten Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe

Die Reinheit von Organellenpräparationen kann durch die Vermessung der Aktivität von Leitenzymen für unterschiedliche Kompartimente der Zelle durchgeführt werden. Die Intaktheit von Mitochondrien kann durch physiologische Messungen mit einer Sauerstoffelektrode bestimmt werden. Hierbei werden die isolierten Mitochondrien mit Substraten versorgt und die respiratorische Sauerstoffbilanz gemessen.

Alle Methoden zur Isolation von Mitochondrien aus Erbse, Tabak und *Arabidopsis* wurden mindestens sechsmal wiederholt. Die physiologischen Messergebnisse in Tabelle 6 sind aus je zwei typischen Isolationen gemittelt. Zunächst wurde nach der Isolation der Mitochondrien der Proteingehalt bestimmt. Dafür wurde die Proteinbestimmung nach STOSCHECK (1990) gewählt. Mit dieser Methode können auch Proteingehalte bestimmt werden, wenn die Proben viele Membranfragmente enthalten. Membranlipide, die bei anderen Proteinbestimmungen (BRADFORD 1976, LOWRY ET AL. 1951) zu nicht-linearen Messergebnissen führen, stören bei dieser Methode nicht.

Um plastidäre Kontaminationen der Mitochondriensuspension festzustellen, wurde der Chlorophyllgehalt der Suspension bestimmt. Hierfür wurde die von ARNON (1949) beschriebene Methode verwendet (2.5.1).

**Tabelle 6:** Biochemische und physiologische Charakterisierung von Mitochondriensuspensionen, die aus grünem Pflanzengewebe isoliert wurden.

Pflanze	Methode	Frischgewicht	Protein <sup>a</sup> Ausbeute	Chlorophyll zu Protein Verhältnis	O <sub>2</sub> -Bilanz			Fumarase
					Succinat	Reduziertes Cytochrom c	Glycolat	gebildetes Malat
		[g]	[mg]	[µg mg <sup>-1</sup> ]	[nmol (min mg Protein) <sup>-1</sup> ]			
<i>Pisum sativum</i>	DAY ET AL. (1985)	130	0,975	1,0	804,5	144,5	0,00	83,5
<i>Nicotiana tabacum</i>	CHAUMONT ET AL. (1994)	8	0,170	10,2	0,00	1453,0	0,00	nicht bestimmt
<i>Arabidopsis thaliana</i>	DAY ET AL. (1985)	92	0,375	8,7	1039,0	1352,0	422,6	11,7
	KRUF ET AL. (2001)	75	0,142	0,0	685,0	388,0	208,5	2,9

a: Nach STOSCHECK (1990)

Tabelle 6 fasst die physiologischen Untersuchungen an den isolierten Mitochondriensuspensionen zusammen. Der Chlorophyllgehalt der nach DAY ET AL. (1985) aus Erbse isolierten Organellen war gering. Der hohe Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Succinat als auch die sehr geringe Sauerstoffproduktion bei Stimulation mit reduziertem Cytochrom c zeigt, dass die mitochondrialen Membranen nicht zerstört wurden und die Atmungskette funktionierte.

Die Annahme der Intaktheit der isolierten Mitochondrien wird zusätzlich von der hohen Fumarase-Aktivität unterstützt. Es war kein Glycolat-Oxidase abhängiger Sauerstoffverbrauch festzustellen, was zeigt, dass die untersuchte Fraktion peroxisomenfrei war.

Die Mitochondrien-Isolate aus Tabak enthalten zwar keine aktiven Peroxisomen, es liegt aber eine chloroplastidäre Kontamination von ca. 10 % vor. Die sehr hohe Atmungsaktivität nach Zugabe von reduziertem Cytochrom c macht deutlich, dass die mitochondrialen Membranen bei der Präparation zerstört wurden. Demzufolge konnte auch mit der Zugabe von Succinat ihre Atmungskette nicht stimuliert werden. Mit der von CHAUMONT ET AL. (1994) beschriebenen Methode konnten hiernach nur Bruchstücke von Mitochondrien isoliert werden.

*Arabidopsis thaliana* dient in dieser Dissertation als Modell-Pflanze. Deshalb wurden verschiedene Methoden zur Mitochondrienisolation an ihr getestet, nämlich die von BERKEMEYER ET AL. (1998) und KRUFTE ET AL. (2001) entwickelten Methoden zur Isolierung von *Arabidopsis*-Mitochondrien und die ursprünglich für Erbsen-Mitochondrien publizierte Methode nach DAY ET AL. (1985). Das Protokoll von BERKEMEYER ET AL. (1998) erwies sich jedoch als völlig ungeeignet (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Ergebnisse zeigen, dass die nach KRUFTE ET AL. (2001) isolierten Mitochondrien größtenteils intakt sind, da reduziertes Cytochrom c ihre Atmungskette nur wenig anregt. Andererseits wurde im Fumarase-Test nur sehr wenig Malat gebildet. Die nach DAY ET AL. (1985) isolierten Mitochondrien bildeten viermal soviel Malat. Die Verunreinigungen der Mitochondrien mit Chloroplasten und Peroxisomen bei der Methode von KRUFTE ET AL. (2001) sind gering, Chlorophyll kann hier gar nicht nachgewiesen werden. Die Proteinausbeute erwies sich allerdings als sehr niedrig, so dass weitere physiologische Untersuchungen nur bedingt möglich waren.

Die Methode nach DAY ET AL. (1985) lieferte eine erheblich höhere Proteinausbeute. Auch der hohe Sauerstoffverbrauch nach Succinat-Zugabe zeigt, dass eine große Menge an *Arabidopsis*-Mitochondrien isoliert werden konnte. Andererseits deutet die hohe

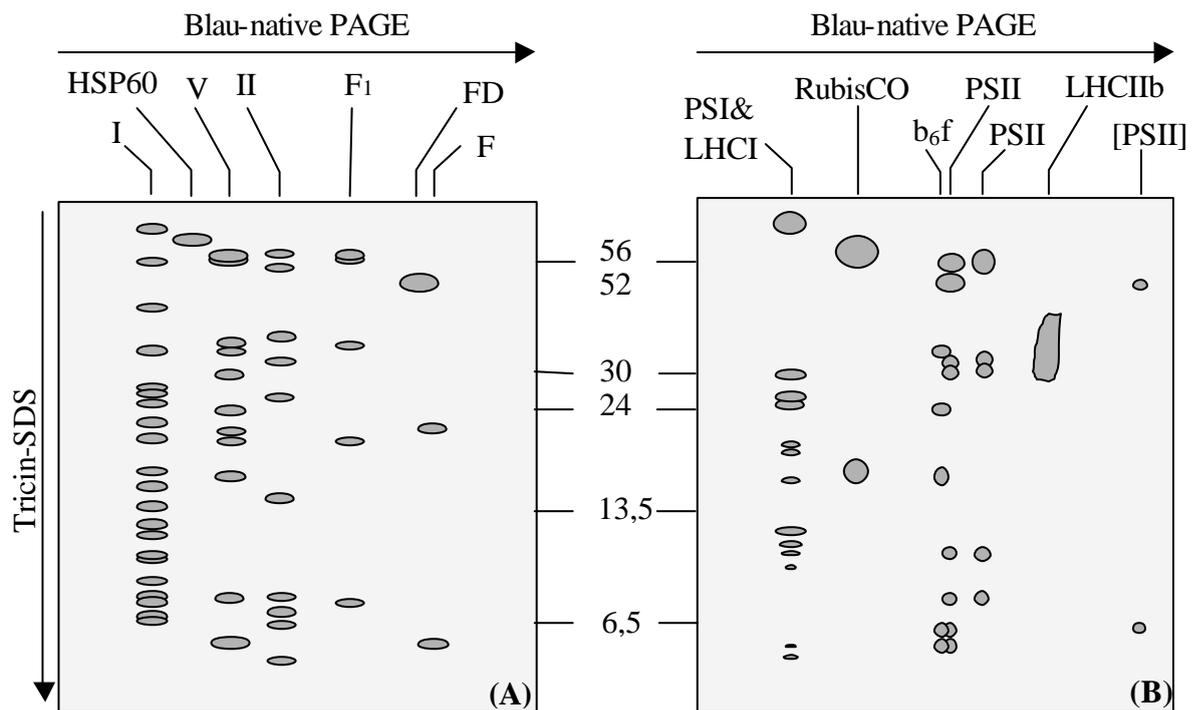
Sauerstoffproduktion nach Zugabe von reduziertem Cytochrom c darauf hin, dass die Membransysteme zerstört wurden.

Die beschriebenen Methoden zur biochemischen und physiologischen Überprüfung der Reinheit und Intaktheit von isolierten Mitochondrien haben alle den Nachteil, dass für jede vermutete Kontamination der Mitochondrien ein eigener Test durchgeführt werden muss; dies setzt eine hohe Proteinausbeute voraus. Außerdem wird die An- oder Abwesenheit eines bestimmten Organellentyps in der Mitochondriensuspension nur anhand einzelner Enzymaktivitäten bestimmt. Dies macht die verwendeten Verfahren zu einer nicht absolut zuverlässigen Methode, um die Reinheit der isolierten Mitochondrien zu überprüfen. Der durchgeführte Chlorophyll-Test lässt zwar Aussagen zur Anwesenheit von Chloroplasten im Isolat zu, kann aber keine Angaben zu möglichen Verunreinigungen mit anderen Plastiden, die kein Chlorophyll enthalten (Proplastiden, Etioplasten), liefern.

### **3.2.3 Gelelektrophoretische Verfahren zur Analyse von Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe**

Die Blau-native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinkomplexen, die in einer zweiten denaturierenden Geldimension in ihre Untereinheiten gespalten und anhand des von diesen gebildeten Musters identifiziert werden können. Da Mitochondrien und Chloroplasten mit sehr unterschiedlichen Proteinkomplexen bestückt sind, wurde ein Verfahren angewandt, um die Reinheit von Mitochondrienpräparationen mit 2D BN/SDS-PAGE zu testen.

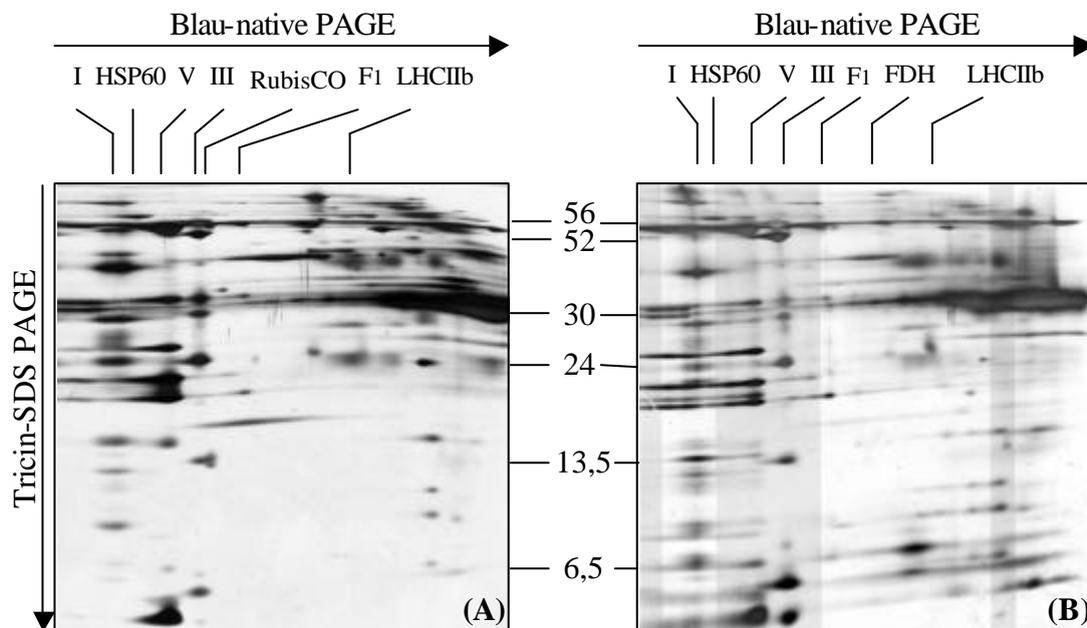
In Abbildung 6 sind *Arabidopsis*-Proteinkomplexe von Mitochondrien (Abb. 6A) und Chloroplasten (Abb. 6B) schematisch dargestellt.



**Abb. 6:** Schematische Darstellung organellarer Proteinkomplexe nach Auftrennung mittels 2D BN/SDS-PAGE. Mitochondriale Proteinkomplexe (A) und chloroplastidäre Proteinkomplexe (B). Die Schemata wurden nach Gelen erstellt, die in JÄNSCH ET AL. (1996) und KÜGLER ET AL. (1997) veröffentlicht wurden. Die Bezeichnungen oberhalb der Schemata identifizieren die Proteinkomplexe: I, NADH-Dehydrogenase; HSP60, Hitzestress-Protein 60; V, F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATP-Synthase-Komplex; III, Cytochromc-Reduktase; F<sub>1</sub>, F<sub>0</sub>, F<sub>1</sub>- und F<sub>0</sub>-Teile des ATP-Synthase-Komplexes; FDH, Format-Dehydrogenase; PSI, Photosystem I; LHCI, Light harvesting complex I; RubisCO, Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase; b<sub>6</sub>f, Cytochrom b<sub>6</sub>f-Komplex; PSII, Photosystem II; [PSII], Subkomplex des Photosystems II; LHCIib, Light harvesting complex IIb. Die Zahlen zwischen den Gelen stehen für die molekularen Massen von Standard-Proteinen (in kDa).

Bei den Mitochondrien nehmen die Proteinkomplexe der Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran sitzen, anteilig den größten Platz ein. Die Untereinheiten der Cytochrom c-Reduktase gehören zu den häufigsten mitochondrialen Proteinen. Als Protein der mitochondrialen Matrix ist das lösliche HSP60 (Hitzestressprotein 60) ein guter Marker für die Intaktheit der Mitochondrien. Bei den Chloroplasten kann RubisCO (Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) diese Funktion übernehmen. Die Photosysteme und die Lichtsammelkomplexe sind dagegen membrangebundene Proteinkomplexe. Der Cytochrom b<sub>6</sub>f-Komplex der Elektronentransportkette kann als Indikator für Plastiden im Allgemeinen dienen, da er auch in Etioplasten vorkommt (HERRMANN ET AL. 1992). Zur Analyse der Reinheit und Intaktheit von Mitochondrien oder Chloroplasten kann ein 2D BN-Tricin/SDS-Gel eingesetzt werden.

Abbildung 7 zeigt eine 2D BN/SDS-PAGE-Auswertung für Mitochondrien aus Erbse (Abb. 7A) und Tabak (Abb. 7B), die nach den Protokollen von DAY ET AL. (1985) und CHAUMONT ET AL. (1994) hergestellt wurden.

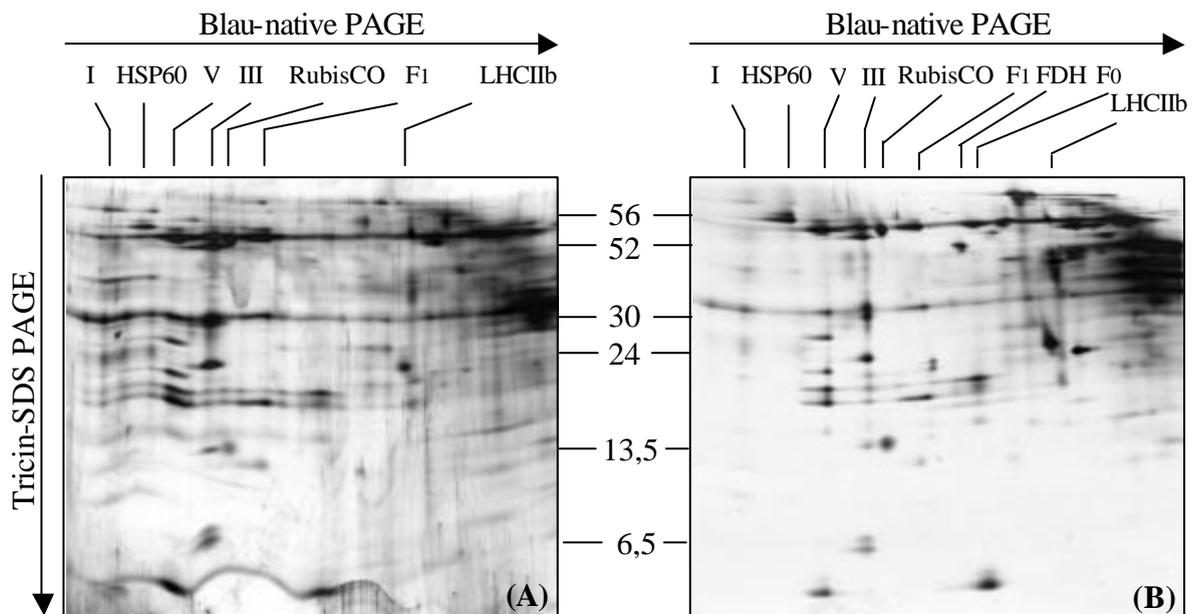


**Abb. 7:** Dokumentation der Reinheit von Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von Erbse (A) und Tabak (B) isoliert wurden. Die Bezeichnungen über den Gelen identifizieren die Proteinkomplexe (siehe Abb. 6). Die Zahlen zwischen den Gelen stehen für die molekularen Massen von Standard-Proteinen (in kDa).

In Abbildung 7A sind die Mitochondrien anhand der Atmungsketten-Komplexe leicht zu identifizieren. Die Anwesenheit von HSP60 belegt, dass die aufgetrennten Mitochondrien weitgehend intakt sind. RubisCO und LHCIib (Light harvesting complex IIb), die häufigsten Proteinkomplexe der Chloroplasten, sind schwach zu erkennen. Die Komplexe der Elektronentransportkette (Photosystem I & II, Cytochrom  $b_6f$ -Komplex) sind dagegen nicht sichtbar. Dennoch ist die Verunreinigung der isolierten Erbsen-Mitochondrien mit Plastiden als gering (2-5 %) anzusehen. Dies korreliert mit den biochemischen und physikalischen Ergebnissen aus Tabelle 6.

Die in Abbildung 7B aufgetrennten Tabak-Mitochondrien sind ähnlich sauber wie die Erbsen-Mitochondrien (Abb. 7A). Außer einem sehr schwachen LHCIib-Spot sind keine plastidären Proteinkomplexe zu erkennen. Auch hier belegt die Anwesenheit von HSP60 die Intaktheit der Mitochondrien. Das letztere Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der physiologischen Analysen.

Abbildung 8 ist eine vergleichende Darstellung von Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von *Arabidopsis* isoliert wurden. In Abbildung 8A wurden die Mitochondrien nach dem Protokoll von DAY ET AL. (1985), in Abbildung 8B nach dem Protokoll von KRUFTE ET AL. (2001) isoliert. Beide Methoden ermöglichen eine nahezu optimale Isolation von Mitochondrien. Die Komplexe der Atmungskette sind alle deutlich erkennbar.



**Abb. 8:** Dokumentation der Reinheit von Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurden. Die Mitochondrien wurden nach DAY ET AL. 1985 (A) und KRUFTE ET AL. 2001 (B) präpariert. Die Bezeichnungen über den Gelen identifizieren die Proteinkomplexe (siehe auch Abb. 6). Die Zahlen zwischen den Gelen stehen für die molekularen Massen von Standard-Proteinen (in kDa).

Die Anwesenheit von HSP60 belegt, dass die Mitochondrien intakt sind. In den nach KRUFTE ET AL. (2001) aufgetrennten Mitochondrien ist deutlich mehr HSP60 zu erkennen als in den nach DAY ET AL. (1985) aufgereinigten. RubisCO und LHCIIb als plastidäre Proteinkomplexe sind nur schwach zu erkennen. Die Komplexe der beiden Photosysteme und der Cytochrom  $b_6f$ -Komplex fehlen. Maximal fünf Prozent der Proteine auf den Gelen sind plastidären Ursprungs.

Es lässt sich feststellen, dass die Kombination von biochemisch/physiologischen Messungen und von gelelektrophoretischen Verfahren geeignet ist, die Reinheit von mitochondrialen Fraktionen umfassend zu beurteilen. Die 2D BN/SDS-PAGE ermöglicht ein umfassenderes Bild vom Zustand der Mitochondrien, lässt jedoch keine Aussagen über ihre Aktivität zu. Es werden nicht nur einzelne Markerproteine analysiert, sondern das gesamte Proteom der

untersuchten Organellen. Sowohl membrangebundene als auch lösliche Proteine können in die Beurteilung des Zustandes der Mitochondrien mit einbezogen werden.

Um sowohl die biochemischen und physiologischen Messungen (3.2.2) als auch die gelelektrophoretischen Verfahren zur Überprüfung der Reinheit und Intaktheit von Mitochondrien durchführen zu können, wurde ca. 100 g Pflanzenmaterial eingesetzt. Daraus wurde 500 µg mitochondriales Protein isoliert. Der Proteineinsatz für die Messungen der Sauerstoffbilanz betrug 150 µg, die Messung der Fumeraseaktivität benötigte 50 µg und für die Protein- und Chlorophyllbestimmung wurden 10 µg eingesetzt. Jedes 2D BN/SDS-PAGE Gel wurde mit 250 µg Protein beladen. Ein entscheidender Nachteil der 2D BN/SDS-PAGE besteht darin, dass sehr viel Pflanzenmaterial eingesetzt werden muss, um die für diese Methode benötigte große Menge mitochondrialen Proteins zu erhalten.

Die Methoden zur Mitochondrienisolation, hier vor allem aus grünem Gewebe, und der Überprüfung auf Reinheit und Intaktheit sind äußerst aufwendig (HAUSMANN ET AL. 2003A), wodurch zahlreiche Fehlerquellen die Reproduzierbarkeit der Methode beeinflussen können.

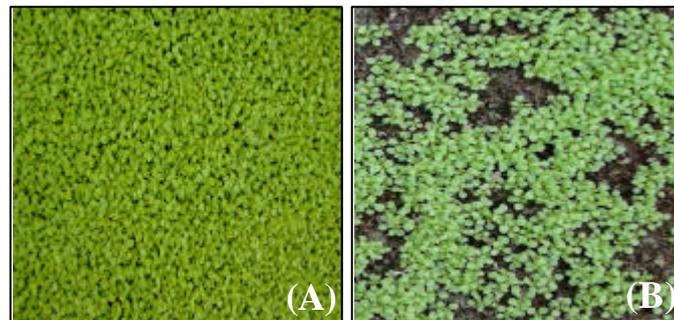
### 3.2.4 Modifikation der Methode von DAY ET AL. (1985) und Optimierung der Pflanzenanzucht

Um Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen isolieren zu können, wurde im Verlauf dieser Arbeit die Methode von DAY ET AL. (1985) modifiziert und optimiert. Die vorgenommenen Modifikationen für *Arabidopsis thaliana* sind in Tabelle 7 zusammengefasst.

**Tabelle 7:** Vorgenommene Modifikationen des Protokolls von DAY ET AL. (1985).

	<b>DAY ET AL. (1985)</b>	<b>HAUSMANN ET AL. (2003A)</b>
<b>Verhältnis von Frischgewicht zu Volumen des Mediums I</b>	1 ml pro g Frischgewicht	5 ml pro g Frischgewicht
<b>Homogenisieren des Pflanzenmaterials</b>	Keine Angaben	Fünf mal zwei Sekunden bei höchster Stufe im Waring Blendor
<b>Filtration des Pflanzenhomogenats</b>	Nylongaze mit einer Porenweite von 50 µm	Nylongaze mit einer Porenweite von 40 µm
<b>Gradientenzentrifugation</b>	Festwinkelrotor: SS34	Ausschwingrotor: SW28
<b>Percollentfernung aus der Mitochondriensuspension</b>	Medium II mit BSA	Medium II ohne BSA
<b>Abschließende Zentrifugationslänge</b>	20 Minuten bei 15.000xg	10 Minuten bei 15.000xg

Auch der optimale physiologische Zustand der zu vergleichenden Pflanzen musste experimentell ermittelt werden. Verglichen mit *starik* zeichnet sich C24 durch eine deutlich schnellere Entwicklung aus. Um bestmögliches Ausgangsmaterial für die Mitochondrienisolation zu gewährleisten, wurden die Pflanzen zeitversetzt ausgesät, die *starik*-Pflanzen zehn Tage vor den Wildtyp-Pflanzen. Die Ernte erfolgte, wenn sie einen möglichst identischen Entwicklungszustand erreicht hatten. Dies war optimal, wenn die Wildtyp-Pflanzen drei Wochen alt waren. In Abbildung 9 sind *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen dargestellt, die physiologisch nahezu identisch sind. In Abbildung 9A sind C24-Pflanzen und in 9B *starik*-Pflanzen dargestellt. In diesem Entwicklungsstadium wurden die Pflanzen mit einer Rasierklinge geerntet und nach der modifizierten Methode von DAY ET AL. (1985) Mitochondrien isoliert.



**Abb. 9:** Ausschnitte von einem C24- (A) und *starik*-Rasen (B) unmittelbar vor der Ernte. Die Pflanzen sind in einem nahezu identischen Entwicklungsstadium.

### 3.3 Auftrennung von Mitochondrien über zweidimensionale Gelelektrophorese

Die zweidimensionale (2D) Gelelektrophorese ermöglicht eine umfassende Auftrennung komplexer Proteingemische durch die Kombination zweier gelelektrophoretischer Trennverfahren. In der ersten Dimension erfolgt eine Trennung der Proteine aufgrund ihrer isoelektrischen Punkte (IEF). Die zweite Dimension separiert die Proteine hinsichtlich ihrer Größe in Form von Tricin-SDS-PAGE. Um hochauflösende Ergebnisse zu erzielen, werden immobile pH-Gradienten (IPG) verwendet (BJELLQVIST ET AL. 1982, GÖRGET AL. 1985 & 1988), bei denen die basischen und sauren Gruppen der Aminosäuren fest an eine Matrix aus Acrylamid gekoppelt sind. Bei der zweiten Dimension handelt es sich

um die Auftrennung der Proteine in einem Tricin-SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht in kDa. Proteine, die einen isoelektrischen Punkt innerhalb des gewählten pH-Bereichs besitzen und eine Größe zwischen ca. 5-120 kDa haben, können durch diese Methode als Proteinspot detektiert werden.

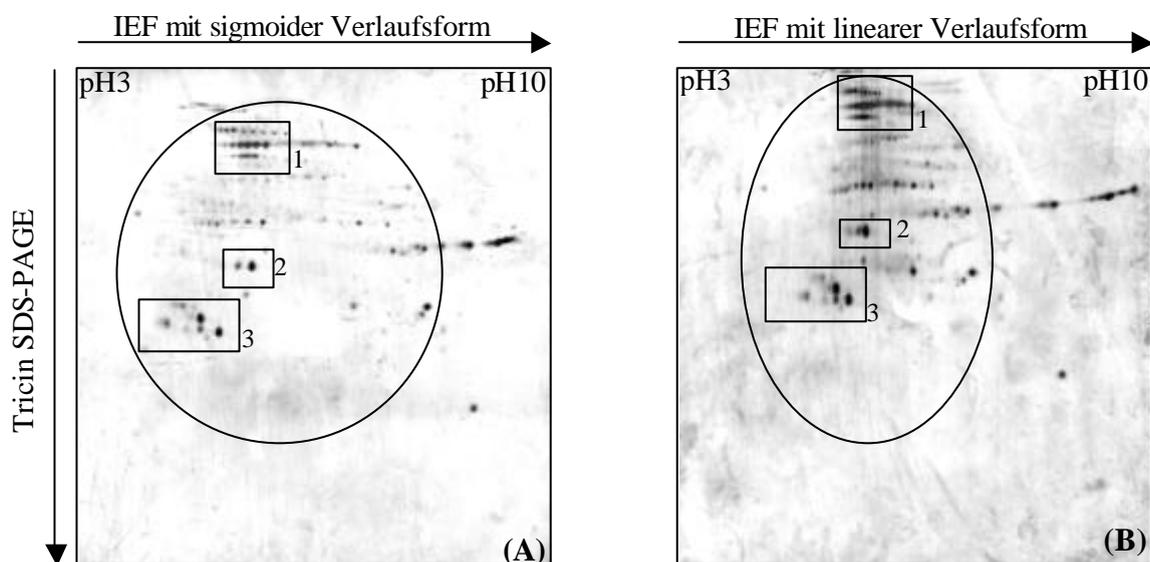
Zu Beginn der Versuchsreihe war nicht klar, wie (i) eine bestmögliche Probenaufbereitung erreicht werden kann, (ii) ob pH-Gradienten mit linearem oder sigmoidem Verlauf als erste Dimension eingesetzt werden sollten und (iii) mit welcher Proteinmenge ein Gel beladen werden sollte, um anschließend eine Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988), eine Coomassie-Färbung nach NEUHOFF ET AL. (1985) oder eine kommerziell erhältliche Coomassie-Färbung der Firma Roth durchzuführen. Hierzu mussten einige Vorversuche gemacht werden, um letztlich die Methode der 2D-Gelelektrophorese zu etablieren.

### **3.3.1 Ausgangsmaterial für die Etablierung der zweidimensionalen Gelelektrophorese von Mitochondrien**

Aus etiolierten Suspensionskulturen wurden Mitochondrien nach KRUFTE ET AL. (2001) isoliert und anschließend die Proteinkonzentration nach STOSCHECK (1990) bestimmt.

Die Gele der Abbildung 10 sind 20 cm x 20 cm groß und haben eine Geldicke von 1 mm. Sie sind jeweils mit 160 µg mitochondrialem Protein beladen und bis auf die Auftrennung in der ersten Dimension identisch behandelt worden. Der IPG-Streifen von Abbildung 10A weist eine sigmoide Verlaufsform auf und deckt einen pH-Bereich von pH 3-10 ab. Für das Gel in Abbildung 10B wurde hingegen ein immobilierter pH-Gradient mit einer linearen Verlaufsform von pH 3-10 eingesetzt. Beide Gele der Abbildung 10 zeigen vergleichbare Proteommuster der aufgetrennten Mitochondrien. Im unteren Drittel beider Gele sind kaum Proteine detektiert worden. Proteine mit einem isoelektrischen Punkt nahe pH 3 wurden auf keinem der Gele fokussiert. Proteine mit einem stark basischen isoelektrischen Punkt sind sowohl in Abbildung 10A als auch in 10B nur partiell erkennbar. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Proteinspots in Abbildung 10A über eine weitaus größere Gelfläche verteilt sind in 10B. Bis auf einige Ausnahmen im stark basischen pH-Bereich befinden sich die aufgetrennten Proteine in dem mittleren pH-Bereich, der mit einer ovalen Markierung gekennzeichnet ist. Diese Markierung macht deutlich, dass ein IPG mit sigmoider Verlaufsform im relevanten pH-Bereich (pH 5-pH 7) das mitochondriale Proteingemisch großflächiger auftrennt als der

lineare IPG. Deshalb kommt es auf dem Gel der Abbildung 10A im Gegensatz zu dem Gel in 10B kaum zu Überlagerungen der einzelnen Spots, wie die Gelausschnitte 1-3 verdeutlichen. Durch diese differenziertere Verteilung der Proteine in Abbildung 10A ist eine Identifizierung einzelnen Proteinspots gegeben und wird eine spätere Einzelanalyse über z.B. MALDI-TOF/MS vereinfacht. Ein immobilierter pH-Gradient mit sigmoidem Verlauf ermöglicht eine bessere Quantifizierbarkeit von Proteommustern. Aus diesem Grund wurden im folgenden für alle 2D-gelelektrophoretischen Auftrennungen IPG-Streifen mit einem sigmoiden Verlauf eingesetzt.

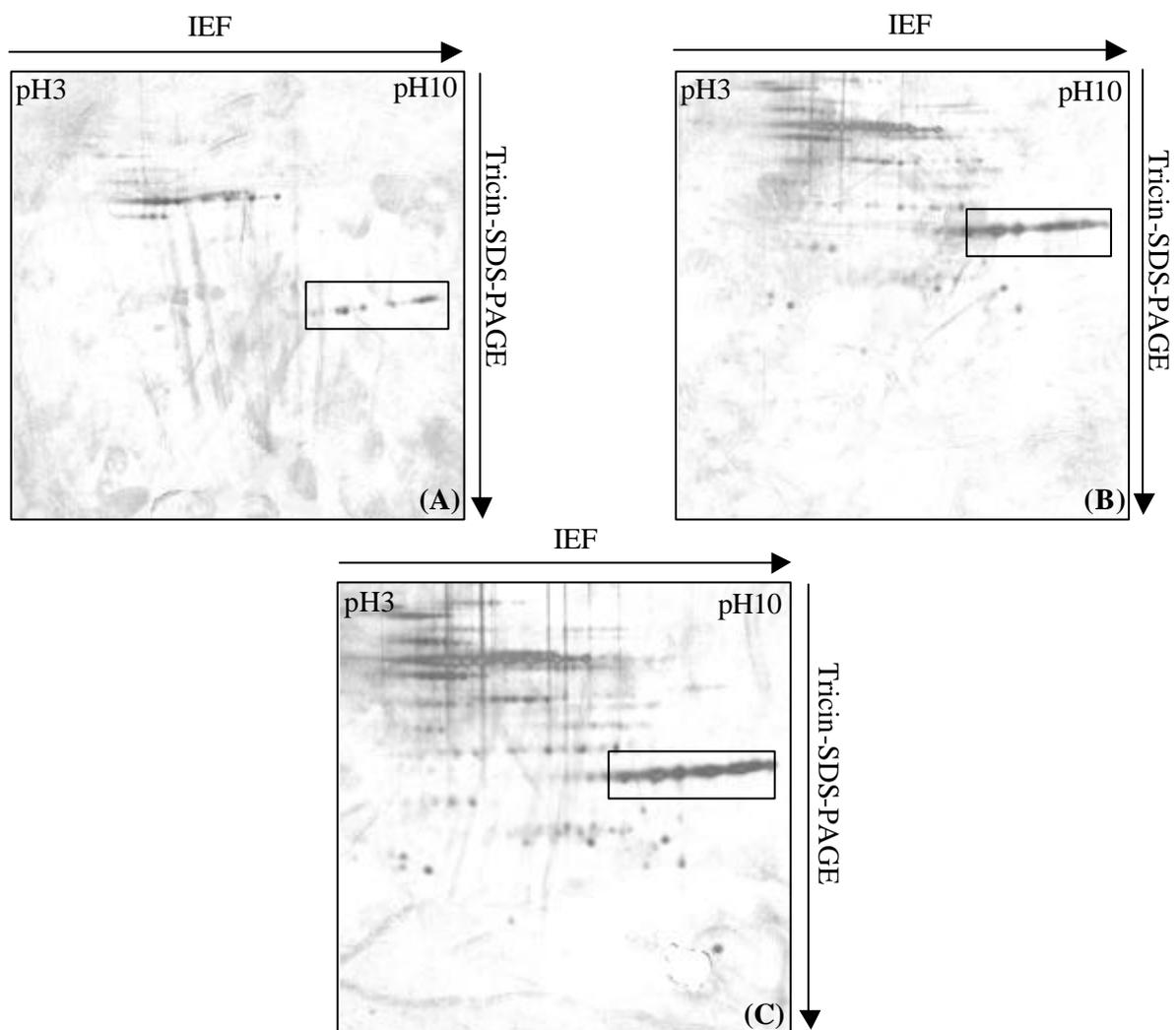


**Abb. 10:** Zweidimensionale Auftrennung des mitochondrialen Proteoms von *starik* unter Einsatz verschiedener immobilierter pH-Gradienten. In der ersten Dimension von Gel A wurde ein sigmoider pH-Gradient gewählt, für Gel B wurde ein linearer pH-Gradient eingesetzt. Die Gele sind mit 160 µg mitochondrialem Protein beladen und silber-gefärbt. Unterschiede im Spotmuster sind in den Gelausschnitten 1-3 dargestellt. Die ovalen Markierungen kennzeichnen die Spotverteilung.

### 3.3.2 Bestimmung der Proteinkonzentration isolierter mitochondrialer Fraktionen

Im Folgenden gilt es nun, eine optimale Proteinmenge für die Beladung der zweidimensionalen Auftrennung zu ermitteln. Die in Abbildung 11A-C dargestellten Mitochondrienproteome stammen aus einer etiolierten Suspensionskultur von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp C24. Die Organellen wurden nach KRUFTE ET AL. (2001) isoliert und deren

Proteingehalt nach STOSCHECK (1990) bestimmt. Die Auftrennung der ersten Dimension erfolgte in einem pH-Bereich von 3-10 über einen IPG mit sigmoider Verlaufsform. Schließlich wurden die Gele nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) silber-gefärbt. In der ersten Dimension von Abbildung 11A wurden 100 µg Protein eingesetzt. Das Gel in 11B wurde mit 300 µg und 11C mit 500 µg mitochondrialem Protein beladen. Auf den Gelen ist deutlich zu erkennen, dass mit zunehmender Proteinmenge von Abbildung 11A nach 11C auch die Intensität der Proteinspots zunimmt. Gut erkennt man dies an der mitochondrialen Porin-Reihe, die im basischen Bereich lokalisiert und mit einer Umrahmung gekennzeichnet ist. Mit steigender Proteinmenge nimmt nicht nur die Intensität der Spots zu, sondern auch deren Anzahl. So sind in Abbildung 11C deutlich mehr Proteine zu erkennen als in 11A. Allerdings nimmt die Anzahl und Stärke der Proteinüberlagerungen ebenfalls zu, wodurch eine genaue Identifizierung einzelner Spots erschwert wird.



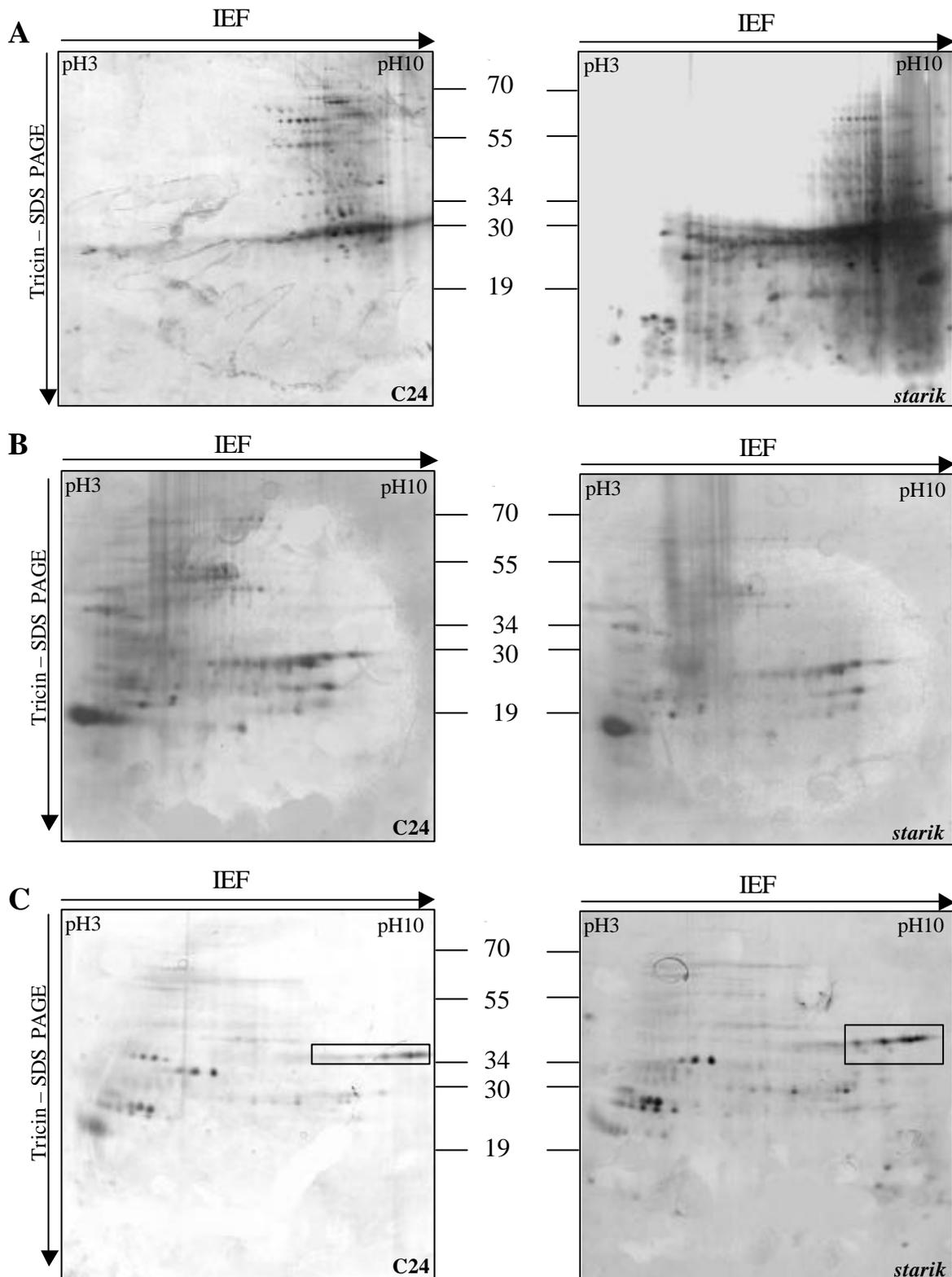
**Abb. 11:** Vergleich verschiedener Proteinmengen der 2D-Auftrennung mitochondrialer Proteine aus einer etiolierten Suspensionskultur von *Arabidopsis*. Nach STOSCHECK (1990) ist das Gel oben links (A) mit 100 µg, das Gel oben rechts (B) mit 300 µg und das Gel unten (C) mit 500 µg Protein beladen. Die Gele sind nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) silber-gefärbt.

Das Resultat dieser Versuchsreihe brachte die Erkenntnis, dass eine optimale Proteinmenge für die Beladung eines Gels zwischen 150-250 µg betragen sollte. Die Silberfärbung konnte kein Proteommuster detektieren, sofern Gele mit deutlich weniger Protein beladen wurden (Ergebnisse nicht gezeigt). Jedoch darf die Proteinmenge nicht zu hoch gewählt werden, da sonst eine Identifizierung einzelner Proteinspots unmöglich wird.

### 3.4 Vergleich des mitochondrialen Proteoms von C24 und *starik*

In Abbildung 12 sind Mitochondrienproteome von C24 und *starik* vergleichend dargestellt. Die Mitochondrien wurden nach einer modifizierten Methode von DAY ET AL. (1985) aus physiologisch identischem Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* C24 und der *starik*-Mutante isoliert. Die drei Präparationen der Organellen aus C24 und *starik*-Pflanzen erfolgten parallel. Die Proteinauftrennung der ersten Dimensionen erfolgte in einem pH-Bereich von 3-10 über einen IPG-Streifen mit sigmoider Verlaufsform. Die Proteinkonzentration wurde nach STOSCHECK (1990) bestimmt, daraufhin wurden je 250 µg mitochondriales Protein für die 2D-Gelelektrophorese eingesetzt. Von den zu vergleichenden Gelen erfolgte auch die Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) parallel. In Abbildung 12A wird deutlich, dass die meisten der mitochondrialen Proteine eine Größe zwischen 20 und 70 kDa und einen basischen isoelektrischen Punkt haben. Im sauren pH-Bereich des Gels sind Proteinspots nur vereinzelt detektiert. Zwischen 55 und 70 kDa ist keine Überlagerung einzelner Proteinspots festzustellen. Gerade in diesem Gelabschnitt liegen die Spots vereinzelt vor. Im direkten Vergleich mit dem dazugehörigen mitochondrialen Proteom von *starik* sind gerade Unterschiede im sauren pH-Bereich auffällig. Hier liegt eine Reihe von Proteinen vor, deren Molekulargewicht kleiner als 19 kDa ist und deren isoelektrischer Punkt im sauren pH-Bereich liegt. Zudem sind viele Proteine in dem mittleren pH-Bereich angesiedelt, die im Gel von C24 fehlen. Die Ansammlung von Proteinen mit einem Molekulargewicht zwischen 55-70 kDa und einem basischen isoelektrischen Punkt findet man, wie auch bei C24, bei *starik* wieder. Vergleicht man das Proteom von C24 und *starik* in Abbildung 12B, so liegen die meisten der detektierten Proteine im sauren und im neutralen pH-Bereich der Gele.

Nur eine kleine Ansammlung von Proteinen liegt zwischen 19 und 30 kDa im leicht basischen Bereich des Gels. Ein auffallend großer Proteinspot mit einem Molekulargewicht von ca. 19 kDa und einem äußerst sauren isoelektrischen Punkt ist auf beiden Gelen an



**Abb. 12:** Zweidimensionale Auftrennung von Mitochondrien, die aus Blättern von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp C24 (linke Spalte) und der *starik*-Mutante (rechte Spalte) nach DAY ET AL. (1985) dreimal isoliert wurden (A-C). Die mitochondriale Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem sigmoiden pH-Gradienten von pH 3-10 aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einer Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Grösse aufgetrennt. Die Zahlen stehen für die molekularen Massen von Standard-Proteinen in kDa. Die Gels wurden mit 250 µg mitochondrialem Protein beladen und silber-gefärbt. Die Gelausschnitte kennzeichnen Ähnlichkeiten.

identischer Stelle zu erkennen. Auf dem Gel von C24 sind zwischen 34 und 60 kDa Proteinspots sichtbar, die im *starik* Proteom fehlen. Spots mit einem Molekulargewicht von über 30 kDa und einem basischen isoelektrischen Punkt fehlen in diesen Proteomen ganz. Die Mitochondrienproteome von C24 und *starik* aus der dritten Präparation sind in Abbildung 12C dargestellt. Eine klare Anhäufung von Proteinen findet sich im sauren pH-Bereich beider Gele. Das Molekulargewicht dieser Proteine liegt zwischen 20 und ca. 55 kDa. Wesentlich kleinere oder größere Proteine sind nicht zu erkennen.

Die Reihe der mitochondrialen Porine ist auf beiden Gelen gleichermaßen zu erkennen und durch eine Umrahmung gekennzeichnet. Bis auf kleine Ausnahmen sind die Proteinmuster beider Gele nahezu identisch.

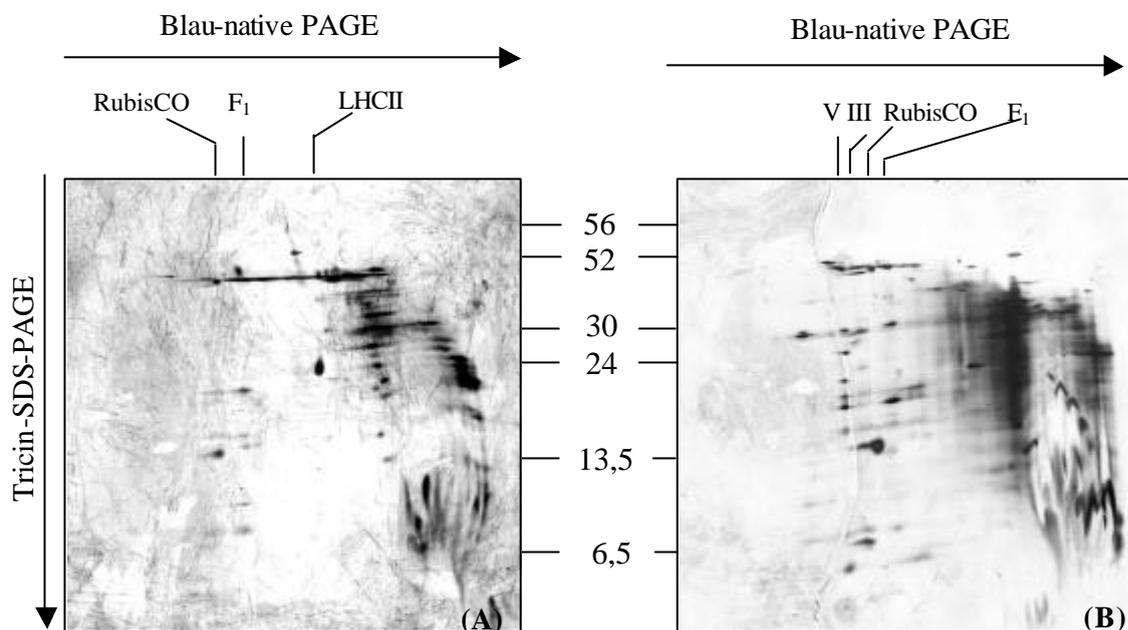
Vergleicht man die Abbildungen 12A-C miteinander, so variiert das Proteinmuster von C24 und *starik* zwischen den einzelnen Mitochondrienpräparationen. In Abbildung 12A sind bei C24 und *starik* relativ viele Proteine im sauren Bereich zu identifizieren. Im *starik*-Proteom erkennt man zudem eine massive Schwarzfärbung des sauren pH-Bereichs, die auf dem C24 Gel fehlt. Diese Färbung findet sich weder in Abbildung 12B noch in 12C des *starik*-Proteoms wieder. Die dargestellten Gele in 12B zeigen eine andere Verteilung der aufgetrennten Proteine als in Abbildung 12A. Der Anteil von Proteinen mit einem sauren isoelektrischen Punkt ist erkennbar größer als in Abbildung 12A. Proteine, die ein hohes Molekulargewicht haben, sind gerade auf dem Gel der *starik*-Mutante reduziert. Die Gele in Abbildung 12C stellen das übersichtlichste Gelpaar dar. Zwar ist das Muster der Proteinspots nochmals anders als in den Abbildungen 12A und 12B, dafür ist es möglich, einzelne Proteinspots auf beiden Gelen identifizieren und vergleichen zu können. Die Gele der Abbildung 12C weisen auch die am besten gelungene Silberfärbung auf, da der Hintergrund des Gels kaum angefärbt wurde.

Aus physiologisch identischem Pflanzenmaterial von C24 und *starik* wurden nach einer modifizierten Methode von DAY ET AL. (1985) parallel Mitochondrien isoliert. Die zweidimensionale Auftrennung des Proteoms erfolgte ebenfalls parallel. Wie die sechs Gele der Abbildung 12 zeigen, kommt es trotz identischer Versuchsdurchführung zu unterschiedlichen, nicht reproduzierbaren Ergebnissen. Weder C24 (linke Spalte) noch *starik* (rechte Spalte) zeigen in den Abbildungen 12A-C vergleichbare Proteommuster.

Abbildung 13 ist eine Dokumentation der Reinheit der Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von *Arabidopsis* und *starik* isoliert wurden. Die abgebildeten Gele sind mit je 770 µg Protein nach STOSCHECK (1990) beladen und silber-gefärbt

(HEUKESHOVEN & DERNICK 1988). Die Darstellung der Proteinkomplexe des Wildtyps zeigt eine schwächere Ausbildung als die der *starik*-Mutante. In Abbildung 13A sind die Proteinkomplexe RubisCO, LHCII und der F<sub>1</sub>-Komplex zu identifizieren, wobei die Proteinkomplexe plastidären Ursprungs deutlicher hervortreten als der F<sub>1</sub>-Komplex der Mitochondrien. Andere Proteinkomplexe konnten nicht identifiziert werden. In Abbildung 13B sind die einzelnen Proteinkomplexe besser zu identifizieren. So sind die mitochondrialen Komplexe III und V im Gegensatz zu Abbildung 13A hier überhaupt erst sichtbar. Man erkennt die RubisCO als chloroplastidäres Protein in stärkerer Ausprägung als in Abbildung 13A. Allerdings fehlt der Komplex des LHCII auf Abbildung 13B vollständig. Möglicherweise werden weitere Proteinkomplexe wie FDH und F<sub>0</sub> vom Hintergrund auf der rechten Seite des Gels verdeckt.

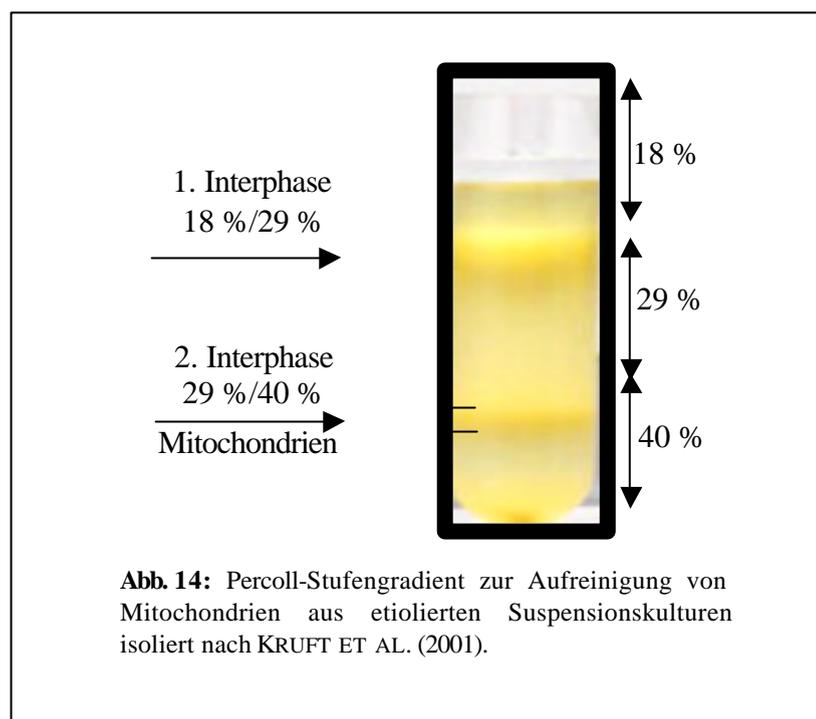
Mitochondrien, die aus grünen Zellen isoliert sind, stellen offenbar kein ideales Ausgangsmaterial dar, um nachfolgend das Proteom zu analysieren. In der vorliegenden Dissertation wurde daher teilweise auf Mitochondrienisolate aus etiolierten *Arabidopsis*-Suspensionskulturen zurückgegriffen.



**Abb. 13:** Vergleich der Proteinkomplexe des mitochondrialen Gesamtproteoms von C24 (A) und *starik* (B) nach zweidimensionaler Auftrennung mittels 2D BN/SDS-PAGE und Silberfärbung. Oberhalb der Gele sind die Proteinkomplexe (siehe Abb. 6) gekennzeichnet. Die Zahlen zeigen die molekulare Masse der Proteinkomplexe an.

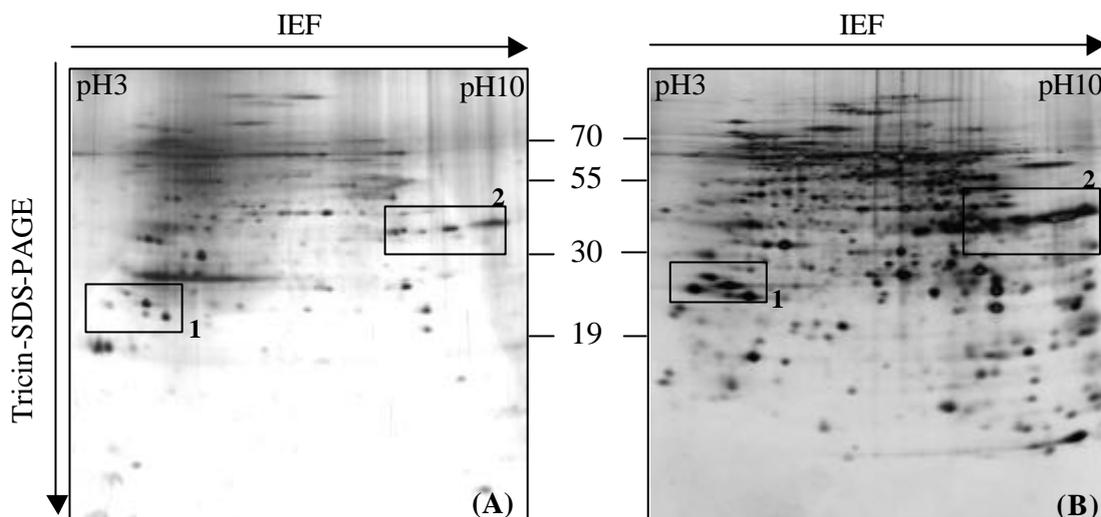
### 3.5 Analyse des mitochondrialen Proteoms von *Arabidopsis thaliana*-Suspensionskulturen

Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, ist es schwierig, saubere Mitochondrien aus pflanzlichem Gewebe zu isolieren. Deshalb dienen etiolierte *Arabidopsis*-Suspensionskulturen als Ausgangsmaterial. Die Präparation von Mitochondrien erfolgt in der Regel durch mehrere differentielle Zentrifugationsschritte und eine nachfolgende Gradientenzentrifugation. Die differentielle Zentrifugation hat in erster Linie das Ziel, zumindest große Partikel wie Zelltrümmer zu eliminieren. Die Gradientenzentrifugation wird bei sehr hoher Umdrehungszahl in einer Ultrazentrifuge durchgeführt und dient der Auftrennung der verbleibenden Zellpartikel nach ihrer Dichte. Ein Dichtegradient wie in Abbildung 14 dargestellt, kann durch die Verwendung von Saccharose und/oder Percoll in unterschiedlichen Konzentrationen erreicht werden. Es kann sich dabei um einen kontinuierlichen oder einen Stufengradienten handeln (PERTOFT 2000). In dieser Arbeit wurden Percollgradienten mit drei Stufen (18 %, 29 %, 40 %) bzw. selbstaufbauende Percollgradienten nach DAY ET AL. (1985) (Gradient nicht gezeigt) verwendet. Abbildung 14 zeigt einen Percoll-Stufengradienten nach der Ultrazentrifugation. Der Gradient wurde mit 3 ml Zellsuspension aus etiolierten *Arabidopsis thaliana*-Suspensionskulturen beladen. Der dreistufige Percoll-Saccharose-Gradient bildete zwei Interphasen aus.



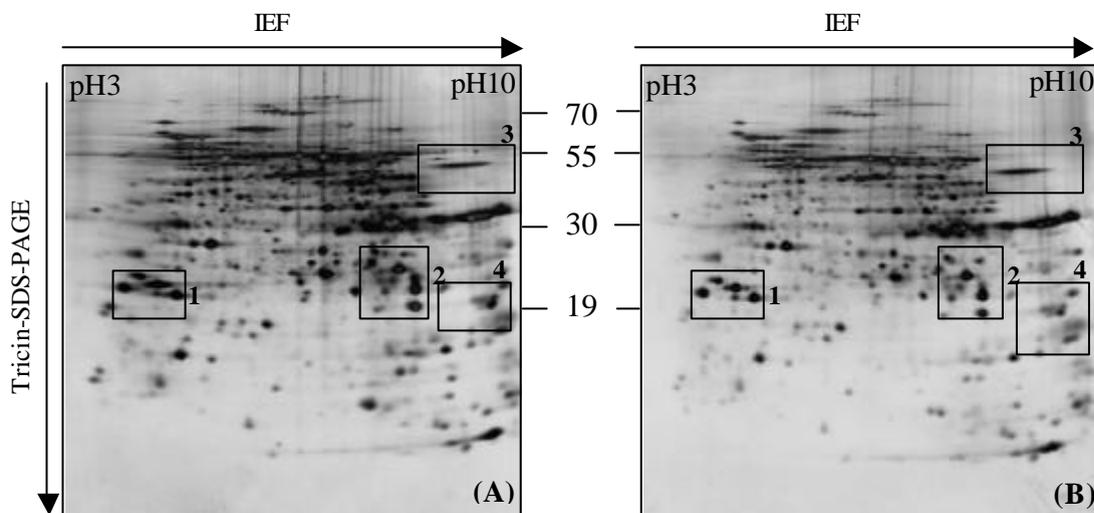
An der ersten Interphase (18 % und 29 %) sammelten sich nach der Ultrazentrifugation Zelltrümmer mit einer geringeren Dichte. Die isolierten Organellen befinden sich an der zweiten Interphase zwischen 29 % und 40 % des Percoll-Stufengradienten. Die unterschiedlichen Dichtestufen des Gradienten sind gut zu erkennen, ebenso die Entfernung jener Zellbestandteile, die für diese Versuchsreihe überflüssig sind. Die Organellen des Gradienten wurden an der zweiten Interphase entnommen und zweidimensional aufgetrennt, die so entstandenen Gele wurden silber-gefärbt.

Die dargestellten Proteome in Abbildung 15 stammen von Mitochondrien, die aus Pflanzenmaterial (A) und aus etiolierten Suspensionskulturen (B) von *Arabidopsis thaliana* isoliert wurden. Beide Präparationen erfolgten nach dem Protokoll von KRUFTE ET AL. (2001). Das Proteingemisch wurde in Abbildung 15A wie auch in 15B über einen IPG mit sigmoider Verlaufsform in einem pH-Bereich von 3-10 fokussiert. Die Gele wurden nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) silber-gefärbt. In Abbildung 15B sind deutlich mehr Proteinspots sichtbar als in 15A, dort fehlen viele Proteine mit einem Molekulargewicht von unter ca. 19 kDa und von über ca. 70 kDa. In Abbildung 15A sind die meisten Proteine im sauren pH-Bereich zu finden, wohingegen in Abbildung 15B eine effektivere Proteinverteilung über den gesamten pH-Gradienten zu verzeichnen ist. Trotz des unterschiedlichen Ausgangsmaterials der mitochondrialen Proteine findet man prägnante Spotmuster auf beiden Gelen wieder, wie die Gelausschnitte 1-2 markieren.



**Abb. 15:** Zweidimensionale Auftrennung von Mitochondrien, die nach KRUFTE ET AL. (2001) aus *Arabidopsis thaliana*-Pflanzenmaterial (A) und aus etiolierten Suspensionskulturen (B) isoliert wurden. Die Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem sigmoiden IPG im pH-Bereich 3-10 fokussiert. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einem Tricin - SDS - Gel nach ihrer Grösse aufgetrennt. Die Gelausschnitte 1-2 stellen Gemeinsamkeiten des Proteommusters dar.

Um eine besser vergleichbare Auftrennung des mitochondrialen Proteoms von C24 und *starik* zu erhalten, wurden die Organellen im Folgenden aus etiolierten Suspensionskulturen beider Spezies isoliert (Abb. 16). Die Präparationen erfolgten in beiden Fällen parallel nach dem Protokoll von KRUFT ET AL. (2001). Die Auftrennung erfolgte über IPG mit einer sigmoiden Verlaufsform und einem pH-Bereich von 3-10. Es wurden sehr viele der mitochondrialen Proteine aufgetrennt, die Proteinspots sind auf beiden Gelen über die gesamte Fläche verteilt. Sowohl kleine als auch sehr große Proteine sind mit der Methode aufgetrennt worden. Die Proteinverteilung erstreckt sich in beiden Gelen über den gesamten pH-Bereich des verwendeten IPG. Sowohl sehr saure als auch sehr basische Proteine wurden fokussiert. Die zweidimensionale Auftrennung der Mitochondrien von C24 und *starik* erfolgte dreimal, erbrachte aber nicht, wie erwartet, signifikante Unterschiede der beiden Mitochondrienproteome. Die Gelausschnitte 1-4 markieren lediglich einen kleinen Teil des identischen Spotmusters von C24 und der *starik*-Mutante. Da in der Silber-Färbung keine Unterschiede sichtbar waren, wurde die weniger sensitive Coomassie-Färbung für eine Sequenzierung über MALDI/TOF nicht durchgeführt.



**Abb. 16:** Zweidimensionale Auftrennung von Mitochondrien, die aus etiolierten Suspensionskulturen von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp C24 (A) und der *starik*-Mutante (B) nach KRUFT ET AL. (2001) isoliert wurden. Die Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem sigmoiden immobilisierten pH-Gradienten von pH 3-10 fokussiert. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einer Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Zahlen stehen für die molekularen Massen von Standard-Proteinen in kDa. Die Gele wurden nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) silber-gefärbt. Die markierten Gelausschnitte 1-4 zeigen Gemeinsamkeiten des Proteommusters.

---

## 3.6 Vergleichende Analyse chloroplastidärer Proteome von Wildtyp- und transgenen Pflanzen

Zunächst wurden Methoden zur Isolation weitgehend intakter Chloroplasten getestet und etabliert. Die Proteine wurden mittels 2D IEF/SDS-PAGE aufgetrennt und das Proteommuster der Chloroplasten aus Wildtyp- und transgenen Pflanzen vergleichend untersucht. Als Ausgangsmaterial für die Proteomanalyse der Chloroplasten wurden (i) *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen, Wildtyp C24, verglichen mit der *starik*-Mutante, und (ii) *Nicotiana tabacum*-Pflanzen, Wildtyp SNN, verglichen mit der Ferrochelatase-antisense-Linie E82, eingesetzt. Zu vermutende signifikante Unterschiede der Proteommuster sollten erkannt und massenspektrometrisch über MALDI/TOF identifiziert werden.

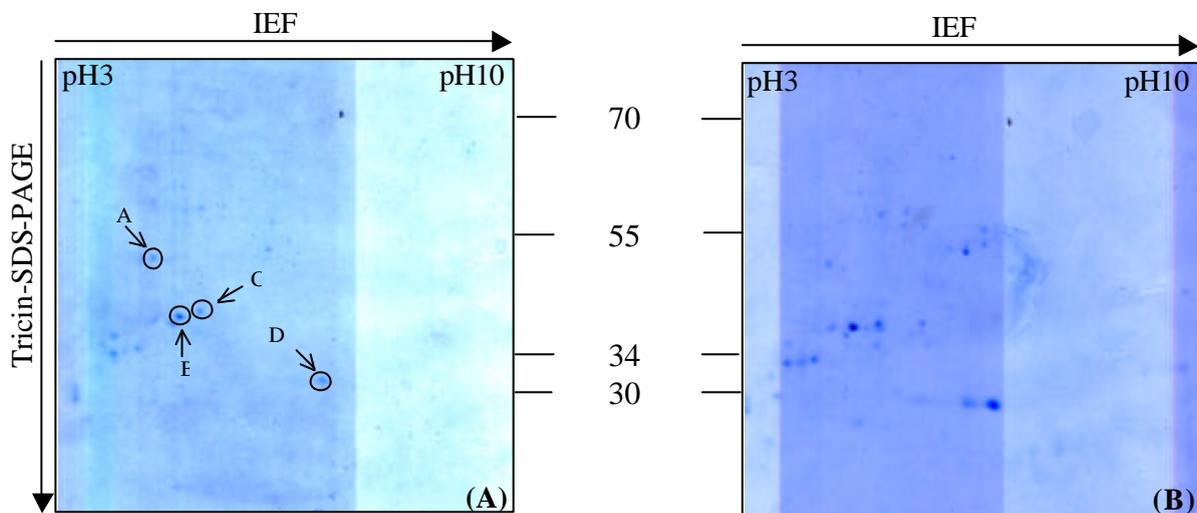
### 3.6.1 Optimierung zur Chloroplastenisolierung aus *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen

Das ursprünglich für Spinat publizierte Protokoll von JENSEN & BASSHAM (1966) wurde auf *Arabidopsis thaliana* übertragen. Die Chloroplasten wurden isoliert und waren nach LEEGOOD & MALKIN (1986) zu 20 % intakt. Die chloroplastidären Proteine wurden durch Zentrifugation in lösliche- und membrangebundene Proteinfractionen separiert und die Proteinkonzentration nach STOSCHECK (1990) bestimmt. Die in den Abbildungen 17 und 18 dargestellten Gele sind mit je 800 µg Protein beladen und Coomassie-Colloidal nach NEUHOFF ET AL. (1985) gefärbt.

### 3.6.2 Zweidimensionale Auftrennung löslicher Proteinfractionen von Chloroplasten aus *Arabidopsis*

Die löslichen Proteine der Chloroplasten aus Blattmaterial von C24 und *starik* wurden in der ersten Dimension auf einem sigmoiden IPG-Streifen von pH 3-10 aufgetrennt und sind in Abbildung 17 dargestellt. Vergleicht man die Spotmuster von C24 (Abb. 17A) und *starik*

(Abb. 17B), so stellt man fest, dass relativ wenig Proteine fokussiert und aufgetrennt wurden. Die erfassten Proteinspots liegen sowohl bei C24 als auch bei *starik* im sauren pH-Bereich. Proteine mit einem basischen isoelektrischen Punkt konnten weder bei C24 noch bei *starik* detektiert werden. Deutliche Unterschiede der Spotmuster sind im neutralen pH-Bereich zu erkennen. In Abbildung 17B sind Proteine mit einem Molekulargewicht von ca. 55 kDa sichtbar, die in Abbildung 17A fehlen. Da die Spotmuster von C24 und *starik* Unterschiede aufweisen, wurden einige Proteine aus dem Gel der Abbildung 17A ausgestochen und über Maldi/TOF sequenziert. Die Ergebnisse dieser Identifizierung sind in Tabelle 10 zusammengefasst.



**Abb. 17:** Zweidimensionale Auftrennung löslicher, chloroplastidärer Proteine, die aus Blattmaterial von *Arabidopsis thaliana* C24 (A) und der *starik*-Mutante (B) nach JENSEN & BASSHAM. (1966) isoliert wurden. Die Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem sigmoiden immobilisierten pH-Gradienten von pH3-10 fokussiert. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einem Tricin-SDS-Gel nach ihrer Grösse separiert. Die Zahlen stehen für die molekularen Massen von Standard-Proteinen in kDa. Die Gele wurden nach NEUHOFF ET AL. (1985) Coomassie-Colloidal-gefärbt. Die in Abbildung 17A markierten Proteinspots A-D wurden ausgestochen und über Maldi/TOF identifiziert (Tabelle 10).

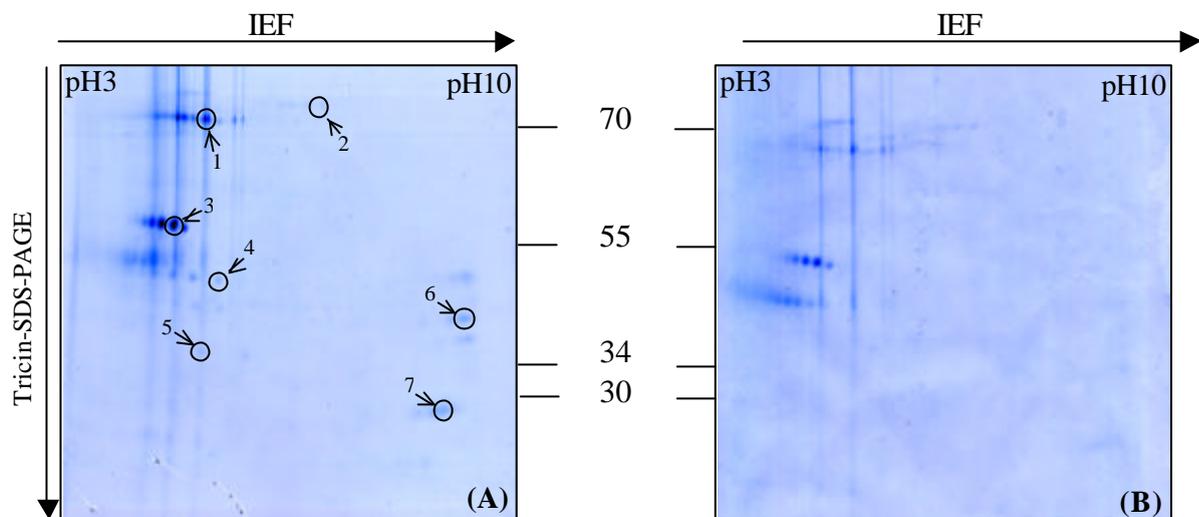
### 3.6.3 Zweidimensionale Auftrennung membrangebundener Proteinfraktionen von Chloroplasten aus *Arabidopsis*

Um eine komplette Darstellung des chloroplastidären Proteoms von *Arabidopsis thaliana* zu erhalten, wurden auch die membrangebundenen Proteine von C24 (Abb. 18A) und der *starik*-Mutante (Abb. 18B) mittels 2D IEF/SDS-PAGE aufgetrennt und im Anschluss Coomassie-

Colloidal nach NEUHOFF ET AL. (1985) angefärbt. Die Proteine wurden in der ersten Dimension ebenfalls in dem pH-Bereich von pH 3-10 fokussiert. Ähnlich wie bei den oben beschriebenen Gelen in Abbildung 17 findet sich auch hier eine Anhäufung von Proteinen mit einem sauren isoelektrischen Punkt. In diesem Bereich erkennt man zwei Gruppierungen von Proteinen. Die erste Gruppe besitzt eine Größe von 30-50 kDa, die andere Gruppe hat eine Größe von ca. 70 kDa. Auffällig bei der vergleichenden Betrachtung ist, dass die Intensität der angefärbten Proteinspots auf Abbildung 18A deutlich verstärkt ist. Zudem wurden hier Proteinspots im basischen pH-Bereich detektiert, die in Abbildung 18B fehlen.

Einige Proteine aus dem Gel der Abbildung 18A wurden ausgestochen und über Maldi/TOF sequenziert. Die Ergebnisse dieser Identifizierung sind in Tabelle 11 zusammengefasst.

Da es sowohl bei den in Abbildung 17 als auch bei den in Abbildung 18 dargestellten Auftrennungen zu Überlagerungen der Proteinspots im sauren Bereich kam, was eine korrekte Identifizierung einzelner Proteine erschwerte, wurde im weiteren Verlauf der Chloroplastenuntersuchungen ein IPG-Streifen von pH 4-7 gewählt.

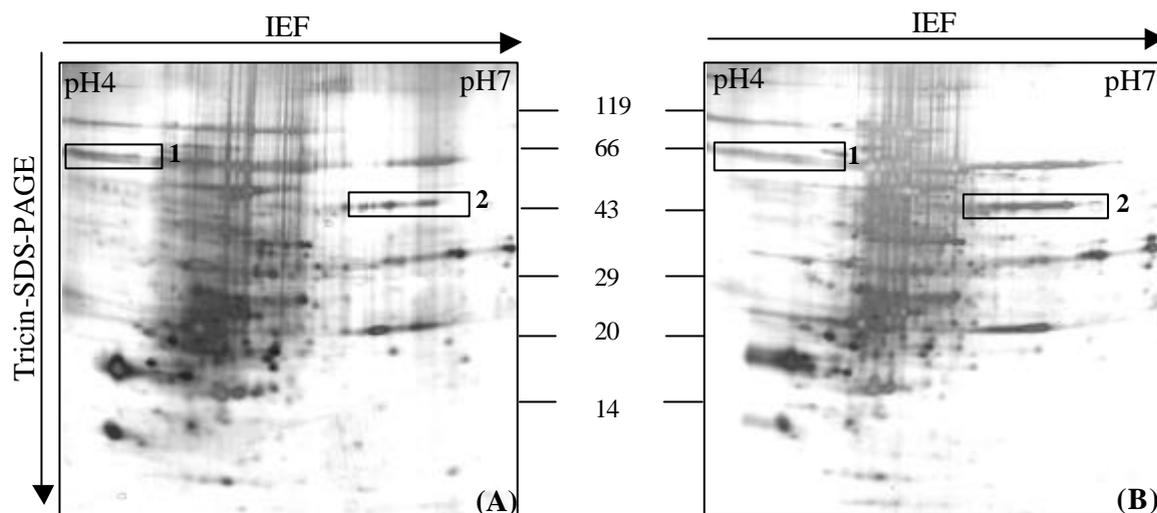


**Abb. 18:** Zweidimensionale Auftrennung chloroplastidärer Membranproteine von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp C24 (A) und der *starik*-Mutante (B). Die Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem sigmoiden immobilisierten pH-Gradienten von 3-10 aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einer Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Größe aufgetrennt. Die in Abbildung 18A markierten Proteinspots 1-7 wurden ausgestochen und über Maldi/TOF identifiziert (Tabelle 11)

### 3.6.4 Isolierung und vergleichende Proteomanalyse von *Arabidopsis thaliana*, Wildtyp C24, und der *starik*-Mutante

Die Chloroplasten wurden nach JENSEN & BASHAM (1966) aus dem Wildtyp C24 und der *starik*-Mutante isoliert und der prozentuale Anteil intakter Organellen nach LEEGOOD & MALKIN (1986) ermittelt. Demzufolge waren von allen Chloroplasten, die für die abgebildeten Gele isoliert wurden, unmittelbar nach ihrer Isolierung 60-65 % intakt. Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, Unterschiede im Muster des Chloroplastenproteoms zwischen C24 und *starik* zu erkennen und eventuell abweichende Proteine zu identifizieren, um somit Gründe für den chlorotischen Phänotyp der *starik*-Mutante aufzudecken. Mittels 2D-Gelelektrophorese wurden die chloroplastidären Proteine aufgetrennt und durch die Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) angefärbt. Es wurden weitere Gele mit chloroplastidären Proteinen angefertigt. Diese wurden mit deutlich höherer Proteinmenge beladen, Coomassie-colloidal angefärbt und sollten als eventuelle Sequenzierungsgrundlage dienen.

Die Proteine der Chloroplasten beider Pflanzen in Abbildung 19 wurden in der ersten Dimension auf einem immobilisierten pH-Gradienten in dem pH-Bereich von 4-7 aufgetrennt. Nach der Proteinbestimmung von STOSCHECK (1990) sind beide Gele mit 150 µg chloroplastidärem Protein beladen.

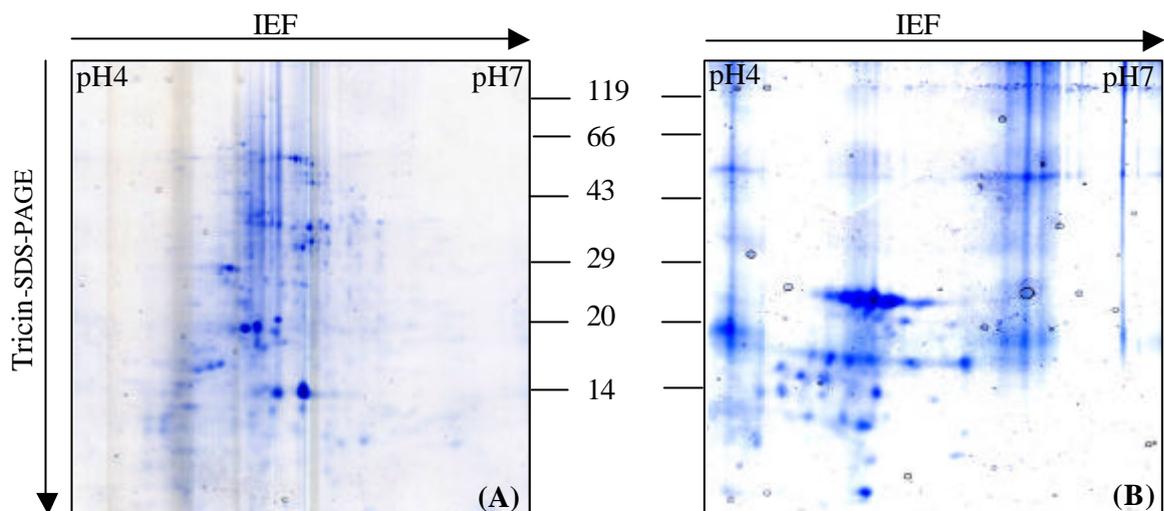


**Abb. 19:** Vergleichende zweidimensionale Auftrennung chloroplastidärer Proteine von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp C24 und *starik*. Die Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem IEP-Streifen im pH-Bereich von 4-7 aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einer Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Grösse in kDa separiert. Die Gele sind nach STOSCHECK (1990) mit 150 µg Protein beladen und wurden nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) silber-gefärbt. Die Gelausschnitte 1-2 markieren Gemeinsamkeiten des Proteommusters.

Auf beiden Gelen der Abbildung 19 sind viele Proteine fokussiert und aufgetrennt worden. Eine besonders effektive Proteinauftrennung hat bei pH5 stattgefunden. Hier wurden deutlich mehr Proteine fixiert als im pH-Bereich 6-7. Proteine mit identischer Größe sind auf beiden Gelen gleichermaßen pH-übergreifend zu erkennen. Die Gelausschnitte 1-2 markieren beschriebene Bereiche. Die meisten der aufgetrennten Proteine von C24 und *starik* haben ein Molekulargewicht zwischen 14 und 43 kDa. Einzelne Proteinspots sind auf beiden Gelen klar zu identifizieren, wobei die Deutlichkeit mit zunehmendem Molekulargewicht abnimmt.

Aus demselben Proteinextrakt wurden zwei weitere Gele angefertigt, die mit 800 µg Protein beladen und Coomassie colloidal gefärbt wurden. Eventuelle Unterschiede im Proteommuster von C24 und *starik* sollten identifiziert und aus dem Gel ausgestochen werden, um eine Sequenzierung nach MALDI/TOF-MS durchführen zu lassen.

Das Gel der Abbildung 20A zeigt das Chloroplastenproteom von C24, das Gel der Abbildung 20B das Proteom von *starik*. Die Proteine wurden in einem leeren IPG im pH-Bereich von 4-7 fokussiert. Auffällig ist, dass sich die beiden Proteome deutlich unterscheiden, sowohl in der Verteilung der Proteinspots auf der Gelfläche als auch in ihrer Intensität. Die Masse der chloroplastidären Proteine von C24 haben einen isoelektrischen Punkt nahe 5. Proteine mit einem pI nahe 4 als auch über 6 fehlen völlig. Die aufgetrennten Proteine haben ein Molekulargewicht zwischen 14 und 66 kDa. Es sind keine Überlagerungen der Proteinspots zu erkennen. Die chloroplastidären Proteine von *starik* sind über einen breiteren pH-Bereich (pH 4-6) verteilt, wobei auch hier eine Anhäufung nahe pH5 festzustellen ist.



**Abb. 20:** Vergleichende zweidimensionale Auftrennung chloroplastidärer Proteine von *Arabidopsis thaliana* Wildtyp C24 (A) und *starik* (B). Die Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem IPG-Streifen im pH-Bereich von 4-7 aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einer Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Größe in kDa separiert. Die Gele sind nach STOSCHECK (1990) mit 800 µg Protein beladen und wurden Coomassie-colloidal gefärbt.

Proteine mit einem pI nahe 7 fehlen. Der grösste Teil der fokussierten Proteine hat ein Molekulargewicht von unter 29 kDa. Einzelne Proteinspots sind im Bereich unter 20 kDa gut zu identifizieren. Im Bereich zwischen 20 und 29 kDa kommt es zu Proteinüberlagerungen. Proteine mit einem Molekulargewicht von über 29 kDa sind lediglich im pH-Bereich 4 und 6 erkennbar, wobei in diesen Bereich Proteine geringer Grösse fehlen.

Die Unterschiede der Chloroplastenproteome von C24 und *starik* sind nicht signifikant, da es nicht gelang, dreimal identische Gele jeder Variante herzustellen. Aus diesem Grund wurde keine Sequenzierung durchgeführt.

### **3.6.5 Isolierung und vergleichende Proteomanalyse von *Nicotiana tabacum*, Wildtyp SNN, und der Ferrochelatase-antisense-Linie E82**

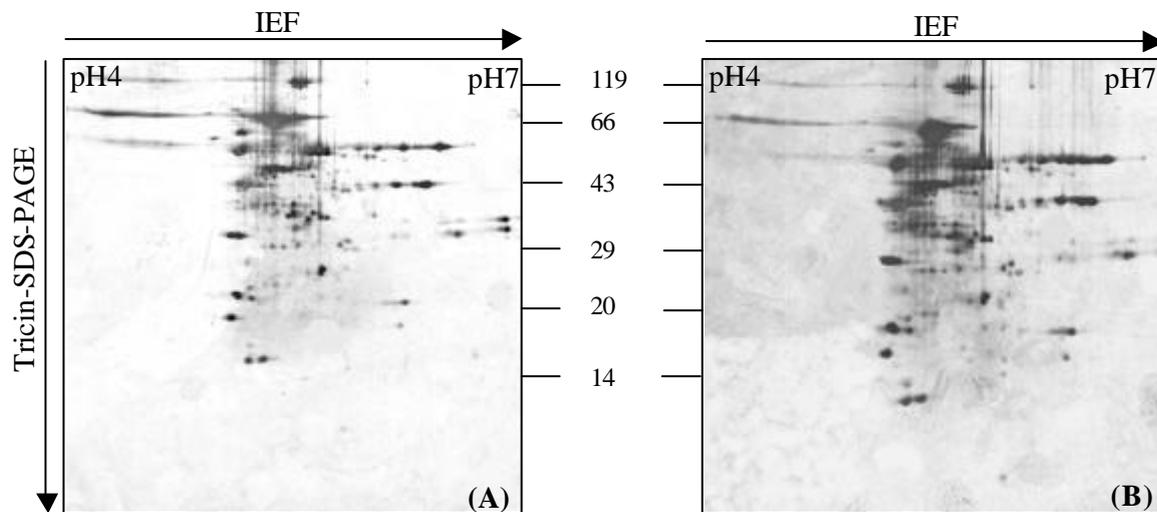
Um die Folgen der beeinträchtigten Hämsynthese auf Proteomebene untersuchen zu können, wurden intakte Chloroplasten aus physiologisch nahezu identischen Tabak-Pflanzen isoliert. Die Tabak-Mutante der Linie E82 weist Chlorosen entlang der Blattadern und der Mittelrippe auf. Dieses Gewebe wird im Laufe der Pflanzenentwicklung nekrotisch (Abb 4). Es wurden Unterschiede in dem chloroplastidären Proteom der Linie E82 erwartet, weil (i) die Ferrochelatase-Aktivität in der transgenen Linie E82 reduziert ist und (ii) den oben beschriebenen Blatt-Phänotyp zeigt (PAPENBROCK ET AL. 2001).

Abbildung 21 zeigt die zweidimensionale Auftrennung chloroplastidärer Proteine von *Nicotiana tabacum*. Der Wildtyp SNN und die transgene Linie E82 sind vergleichend dargestellt. Die Proteine wurden in einem pH-Bereich von 4-7 fokussiert.

Der Grossteil der chloroplastidären Proteine von SNN und E82 hat einen pI zwischen 5-6 und ein Molekulargewicht zwischen 29-66 kDa, Proteine mit einem geringeren Molekulargewicht sind vereinzelt auf beiden Gelen in diesem pH-Bereich zu erkennen. Sowohl bei SNN als auch bei E82 finden sich Proteinspots im pH-Bereich von 4 und einem Molekulargewicht über 43 kDa. Kleinere Proteine mit einem pI von 4 fehlen. Im pH-Bereich über 6 zeigen beide Gele einzelne Proteinspots mit einer Grösse zwischen 14 und ca. 50 kDa.

Generell nimmt die Deutlichkeit der einzelnen Proteinspots mit zunehmender Proteingrösse ab und es kommt zu Proteinüberlagerungen. Vergleichend betrachtet ähneln sich die Proteommuster beider Spezies. Trotz identischer Proteinkonzentration beider Gele ist die

Intensität der Proteinspots von E82 deutlich höher als bei SNN. Gründe hierfür sind vermutlich in nicht automatisierbarer Handhabung zu suchen.



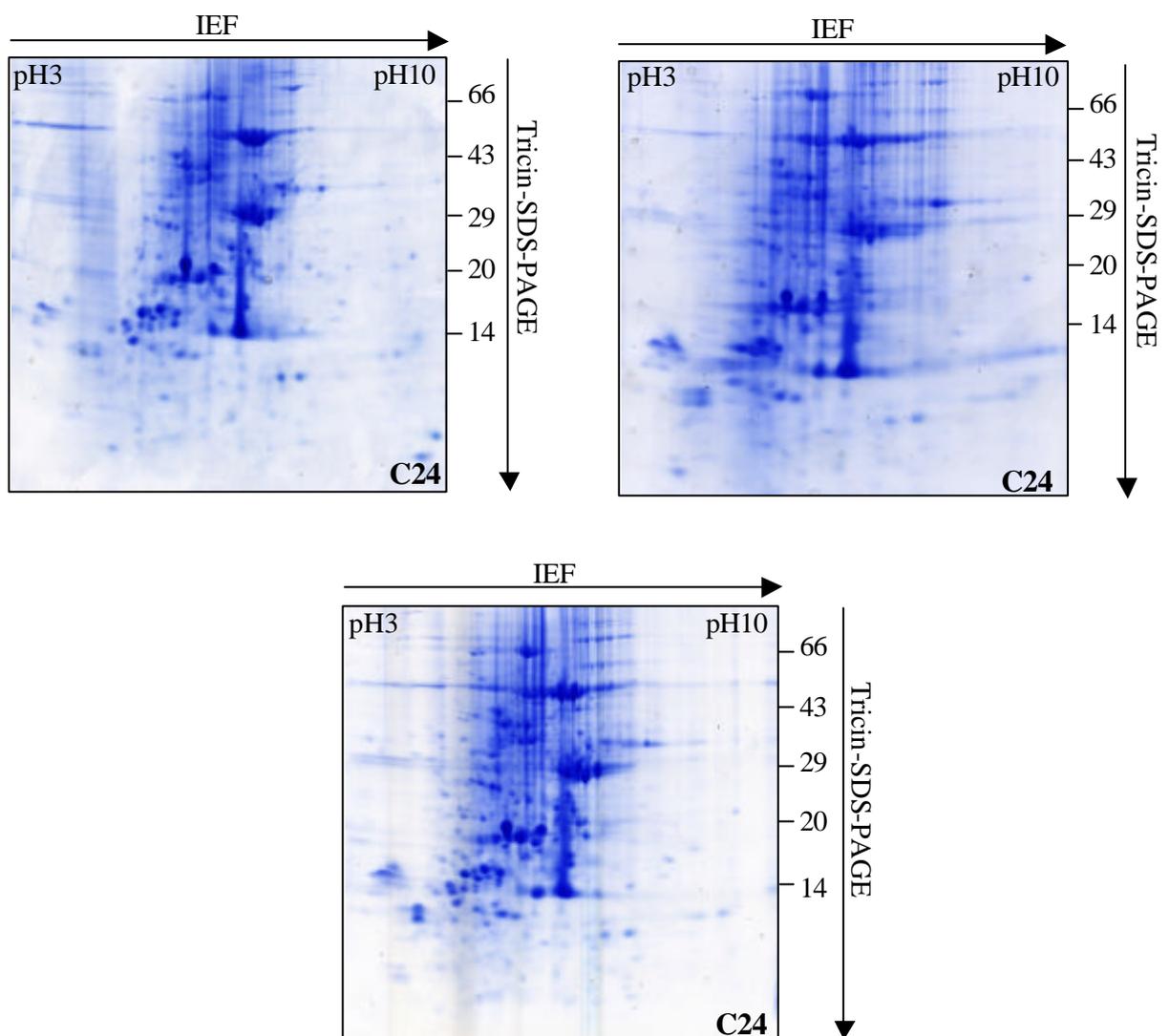
**Abb. 21:** Vergleichende zweidimensionale Auftrennung chloroplastidärer Proteine von *Nicotiana tabacum* Wildtyp SNN (A) und Linie E82 (B). Die Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem linearen IPG in dem pH-Bereich von 4-7 aufgetrennt. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einer Tricin-SDS-PAGE nach ihrer Grösse kDa aufgetrennt. Die Gele sind nach STOSCHECK (1990) mit 150 µg Protein beladen und wurden nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) silber-gefärbt.

### 3.7 Zweidimensionale Auftrennung von Proteingestamtexttrakten

#### 3.7.1 Zweidimensionale Auftrennung von Proteingestamtexttrakten C24

Da es bis zu diesem Punkt der Forschungsarbeit nicht gelungen war, reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wurde ein Ausgangsmaterial gewählt, das als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen werden konnte. Proteingestamtexttrakte stellen keinen limitierenden Faktor einer Versuchsreihe dar und sind reproduzierbar und schnell zu isolieren (2.10.1 und 2.10.4). In Abbildung 22 wurden drei voneinander unabhängige Protein-Gesamt-Extrakte aus C24-Pflanzen extrahiert und mittels 2D-Gelelektrophorese in einem pH-Bereich von 3-10 aufgetrennt. Ziel dieser Versuchsreihe war es, die Zuverlässigkeit der Methode zu überprüfen. Es wurde in allen drei Gelen eine große Anzahl von Proteinen detektiert. Die Proteine erstrecken über den gesamten pH-Bereich mit einer Anhäufung im mittleren pH-Bereich.

Proteine mit einem Molekulargewicht unter 14 kDa und einem sehr sauren oder extrem basischen isoelektrischen Punkt sind auf allen drei Gelen lediglich vereinzelt zu erkennen. Die abgebildeten Gele weisen zwar sehr ähnliche, nicht jedoch identische Proteommuster auf. Die Abbildung macht deutlich, dass sich trotz identischer Versuchsdurchführung bei den Gelen Unterschiede sowohl in der Intensität als auch in der Verteilung der Proteinspots zeigen. Um unterschiedliches Ausgangsmaterial als mögliche Fehlerquelle gänzlich auszuschließen, wurden daraufhin aus einer Probe des Gesamtproteinextraktes einer C24-Pflanze zwei Gele parallel beladen und in Abbildung 23 dargestellt.

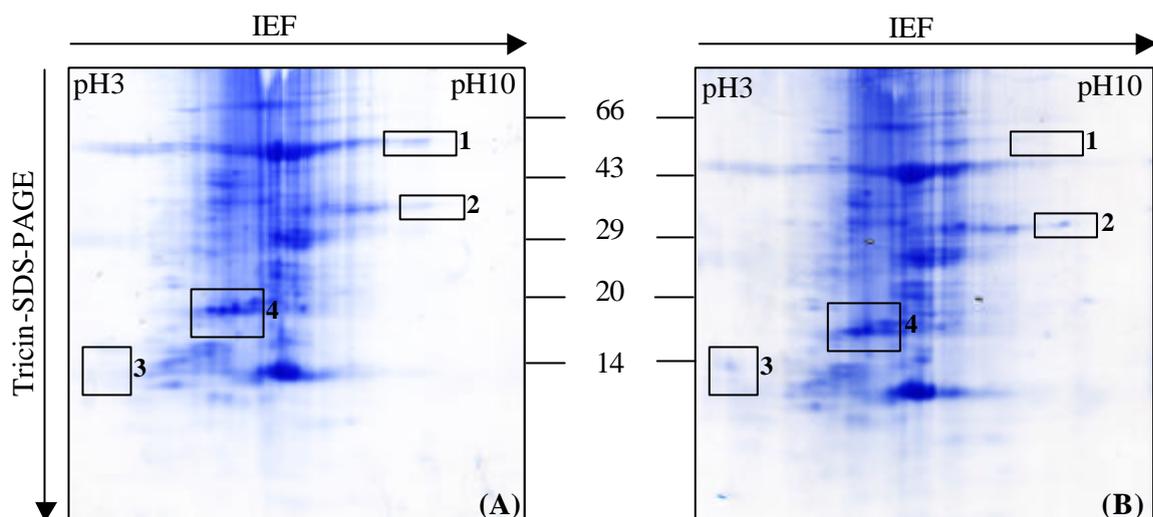


**Abb. 22:** In der Abbildung sind drei voneinander unabhängig hergestellte Proteingestamtextrikte aus C24-Pflanzen dargestellt, die zweidimensional in einem pH-Bereich von 3-10 aufgetrennt wurden. Jedes der Gele wurde mit 800 µg Protein beladen und Coomassie-colloidal (Roth) gefärbt.

### 3.7.2 Wiederholte Auftrennung desselben Proteingestamtextraktes von C24

Abbildung 23 zeigt zwei identisch behandelte Gele, die mit jeweils 800 µg Protein aus dem Gesamtextrakt einer C24-Pflanze beladen und Coomassie-colloidal angefärbt wurden. Da mit diesen Gelen genau so verfahren wurde wie mit den in Abbildung 22 dargestellten, sollten die Proteommuster sowohl untereinander als auch mit denen von Abbildung 22 identisch sein, um so die Zuverlässigkeit der Methode zu verifizieren.

Die Gelausschnitte 1-4 verdeutlichen klare Unterschiede der beiden Gele. Es sind Abweichungen in allen pH-Bereichen sowie in allen molekularen Massen festzustellen. Gelausschnitt 1 markiert ein Protein mit einem basischen pI und einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa. Dieses Protein wurde in Abbildung 23A detektiert, nicht aber in Abbildung 23B. Dort konnte dagegen ein Protein mit einem Molekulargewicht von 29 kDa im basischen Bereich deutlich detektiert werden, welches in Abbildung 23A eine geringere Intensität aufweist (Gelausschnitt 2). Im sauren Bereich wurde in Abbildung 23B ein Protein mit dem Molekulargewicht von 14 kDa aufgetrennt. In 23A ist an identischer Stelle kein Protein zu erkennen (Gelausschnitt 3). Deutliche Unterschiede in der Proteinintensität sind im mittleren pH-Bereich bei 20 kDa sichtbar. Die Abbildung 23A stellt die Proteine deutlich differenzierter dar als 23B (Gelausschnitt 4).



**Abb. 23:** Dargestellt ist eine zweidimensionale Auftrennung von Proteingestamtextrakt aus einer C24-Pflanze im Doppelansatz (A) und (B). Die Proteinkonzentration beider Gele beträgt 800 µg. Für die Fokussierung wurden IPG-Streifen eingesetzt, die einen pH-Bereich von 3-10 abdecken. Die Gele wurden Coomassie-colloidal gefärbt. Die Gelausschnitte 1-4 zeigen zeigen Unterschiede im Spotmuster.

Verglichen mit Abbildung 22 zeigen sich noch deutlichere Unterschiede. Die dargestellten Proteommuster differieren. In mehrfachen Versuchsreihen konnte die Methode lediglich als bedingt reproduzierbar etabliert werden.

### 3.8 Western Blot-Analyse mit verschiedenen Antikörpern

Da zu Beginn der Arbeit nicht bekannt war, welche Proteine in Höheren Pflanzen an der Synthese der Fe/S-Zentren beteiligt sind und in welchen Kompartimenten die Synthese stattfindet, wurde mittels Antikörper gegen Nfs1p, NifS, IscS und hABC7 nach homologen *Arabidopsis*-Proteinen zu den bereits identifizierten Proteinen aus Hefe, Mensch und *E. coli* gesucht. Bei einer Identifizierung von homologen Proteinen sollten diese identifiziert, sequenziert und anschließend ihre Isoformen über PCR isoliert werden. Mit Hilfe der verschiedenen Antikörper gegen Proteine der Fe/S-Zentren-Biosynthese wurde zunächst versucht, in Gesamt-Protein-Extrakten sowie in isolierten Chloroplasten und Mitochondrien, diese Proteine und mögliche Veränderungen ihrer Gehalte in der Mutante nachzuweisen. Es wurden mehrere gegen Proteine oder Oligopeptide der Fe/S-Zentren-Biosynthese aus unterschiedlichen Organismen (Eubakterien, Cyanobakterien, Hefe, Mensch) gerichtete Antikörper eingesetzt. Die Antikörper wurden freundlicherweise von verschiedenen Arbeitsgruppen zur Verfügung gestellt und sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

**Tabelle 8:** Antikörper, gerichtet gegen verschiedene Proteine der Fe/S-Zentren-Biosynthese.

	<b>Herkunft</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Inkubation</b>	<b>Größe der homologen Proteine in <i>Arabidopsis</i></b>
<b>Nfs1p</b>	Peptid-AK gegen <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1:250	3h bei RT	Doppelbande 45 kDa
<b>NifS</b>	Peptid-AK gegen <i>Synechocystis</i>	1:1.000	3h bei RT	42 kDa und 38 kDa
<b>IscS</b>	Peptid-AK gegen <i>E. coli</i>	1:250	3h bei RT	Spezifische Bande bei 37 kDa
<b>hABC7</b>	Oligopeptid-AK gegen <i>Homo sapiens</i>	1:500	1h bei RT	65 kDa

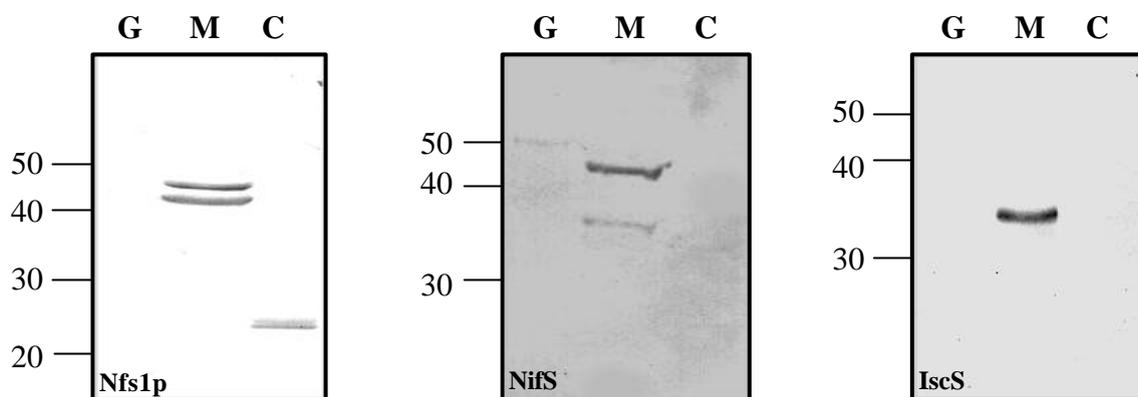
Es wurden Proteine aus Gesamtextrakten, Mitochondrien, die aus *Arabidopsis thaliana*-Suspensionskulturen gewonnen worden waren, und aus Blattmaterial isolierte Chloroplasten

über eindimensionale SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und verschiedene Western Blot-Analysen durchgeführt.

### 3.8.1 Western Blot-Analyse mit den Antikörpern gegen Nfs1p, NifS und IscS

In den Abbildungen 24-27 und 29 sind verschiedene Western Blot-Analysen vorgestellt. Proteinextrakte von *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp C24) wurden über eindimensionale SDS-PAGE aufgetrennt. Eingesetzt wurden pflanzliche Gesamtextrakte (G), Mitochondrien aus Suspensionskultur (M) und Chloroplasten aus Blattmaterial (C) (Abb. 25A). Die für diese Arbeit zur Verfügung gestellten Antikörper mussten hinsichtlich ihrer Verdünnung als auch ihrer Inkubationszeiten optimiert werden. In Abbildung 24 wurden drei Peptid-Antikörper gegen die Cysteindesulhydrasen (i) Nfs1p aus *Saccharomyces cerevisiae*, (ii) NifS aus *Synechocystis* und (iii) IscS aus *E. coli* eingesetzt (VICKERY ET AL. 1997, LILL ET AL. 1999, JASCHKOWITZ & SEIDLER 2000, LILL & KISPAL 2000, MÜHLENHOFF & LILL 2000).

Der erste Western Blot (links) der Abbildung 24 wurde mit dem Antikörper Nfs1p in der Verdünnung 1:250 durchgeführt. Im mitochondrialen Proteinextrakt wurde eine Doppelbande bei 45 kDa erkannt. Ein Protein mit dem Molekulargewicht von ca. 23 kDa wurde vom Nfs1p Antikörper im chloroplastidären Proteinextrakt erfasst.



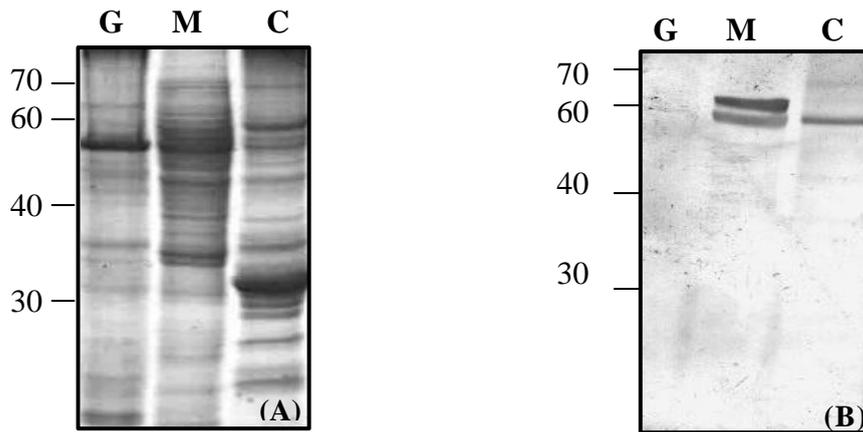
**Abb. 24:** Eindimensionale Auftrennung von Proteinextrakten aus *Arabidopsis thaliana* (Wildtyp C24). Pflanzlicher Gesamtextrakt (G), Mitochondrien aus Zellkultur (M) und Chloroplasten aus Blattmaterial (C). Ein Gel wurde Coomassie-gefärbt (Abb. 25A), während drei gleichermassen beladene Gele geblottet und Western Blot-Analysen mit den Antikörpern gegen Nfs1p (links), NifS (mitte) und IscS (rechts) durchgeführt wurden.

Beim mittleren Western Blot wurde der NifS Antikörper in einer Verdünnung 1:1.000 für drei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Im pflanzlichen Gesamtextrakt konnte eine Proteinbande von schwacher Intensität bei ca. 50 kDa detektiert werden. Bei den Mitochondrien wurden zwei Proteine erfasst; ein großes Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa und ein deutlich kleineres Protein mit einer Größe von 38 kDa. Die Proteinbande des größeren Proteins ist intensiver angefärbt als die des kleineren. Im rechten Western Blot der Abbildung 24 wurde der IscS Antikörper in einer Verdünnung von 1:250 für drei Stunden bei Raumtemperatur eingesetzt. Dieser Antikörper detektiert ausschließlich im mitochondrialen Proteinextrakt ein spezifisches Protein mit einem Molekulargewicht von 37 kDa.

Aufgrund dieser Western Blot-Analyse gibt es auch in *Arabidopsis* homologe Proteine zu den bereits identifizierten aus anderen Organismen. Allerdings liegen die Proteine hier scheinbar in einer sehr niedrigen Konzentration vor, da sie die eingesetzten Antikörper in den pflanzlichen Gesamtextrakten nicht detektieren konnten. Die zur Untersuchung eingesetzten Antikörper detektieren zwar Proteine in *Arabidopsis* Proteinextrakten, allerdings lassen diese Ergebnisse keine zweifelsfreien Rückschlüsse auf die Existenz homologer Proteine zu.

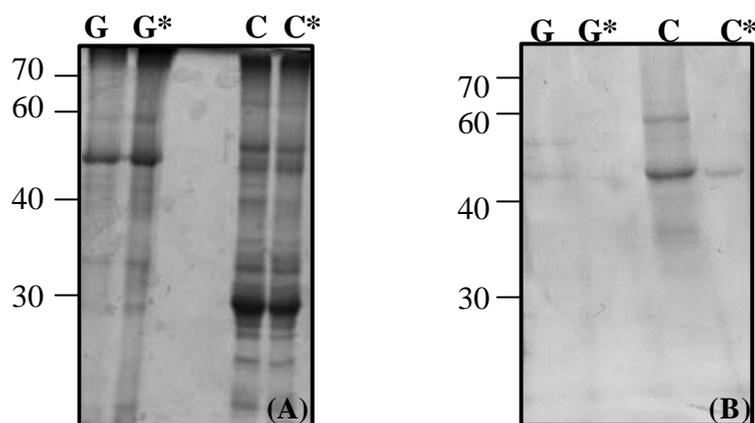
### **3.8.2 Western Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen hABC7**

In Abbildung 25 handelt es sich um die Darstellung der eindimensionalen Auftrennung des pflanzlichen Gesamtextraktes (G), von Mitochondrien aus Suspensionskultur (M) und von Chloroplasten aus Blattmaterial (C) von *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp C24. Das Gel in Abbildung 25A wurde Coomassie-gefärbt, während das gleichermaßen beladene Gel in Abbildung 25B geblottet und ein Western Blot durchgeführt wurde. Der immunologische Nachweis wurde mit dem Antikörper gegen hABC7 in einer Verdünnung von 1:500 geführt. Die dargestellte Western Blot-Analyse in Abbildung 25B zeigt, dass der Antikörper kein Protein im pflanzlichen Gesamtproteinextrakt erkannte. In den Mitochondrien detektierte der Antikörper eine Doppelbande mit einer Größe zwischen 60-70 kDa. In dem Chloroplastenextrakt wurde eine einzelne Proteinbande von dem AK gegen hABC7 erkannt.



**Abb. 25** Eindimensionale Auftrennung von Extrakten aus *Arabidopsis* (Wildtyp C24); Pflanzlicher Gesamtextrakt (G), Mitochondrien aus Zellkultur (M) und Chloroplasten aus Blattmaterial (C). Ein Gel wurde Coomassie-gefärbt (Abb. 25A), während ein gleichermassen beladenes Gel geblottet und ein Western Blot mit dem Antikörper gegen hABC7, dem Sta1-Homolog aus *Homo sapiens*, in der Verdünnung 1:500 durchgeführt wurde (Abb. 25B).

Es wurden weitere Western Blot-Analysen durchgeführt, in denen der Antikörper gegen hABC7 vergleichend in pflanzlichen Gesamtextrakten (G) und Chloroplasten (C) aus Blattmaterial von Wildtyp und *starik*-Mutante eingesetzt wurde (Abb. 26). Die Proteinextrakte der Mutante sind mit G\* und C\*, die Extrakte der Wildtyppflanzen sind mit G und C darstellt. Das Gel in Abbildung 26A wurde Coomassie-gefärbt.



**Abb. 26:** Eindimensionale Auftrennung von Extrakten aus *Arabidopsis* (Wildtyp C24 und *starik*\*): Pflanzlicher Gesamtextrakt (G) und Chloroplasten aus Blattmaterial (C). Ein Gel wurde Coomassie gefärbt (Abb. 26A), während ein gleichermassen beladenes Gel geblottet und ein Western Blot mit dem Antikörper gegen hABC7, dem Sta1-Homolog aus *Homo sapiens*, in der Verdünnung 1:500 durchgeführt wurde (Abb. 26B).

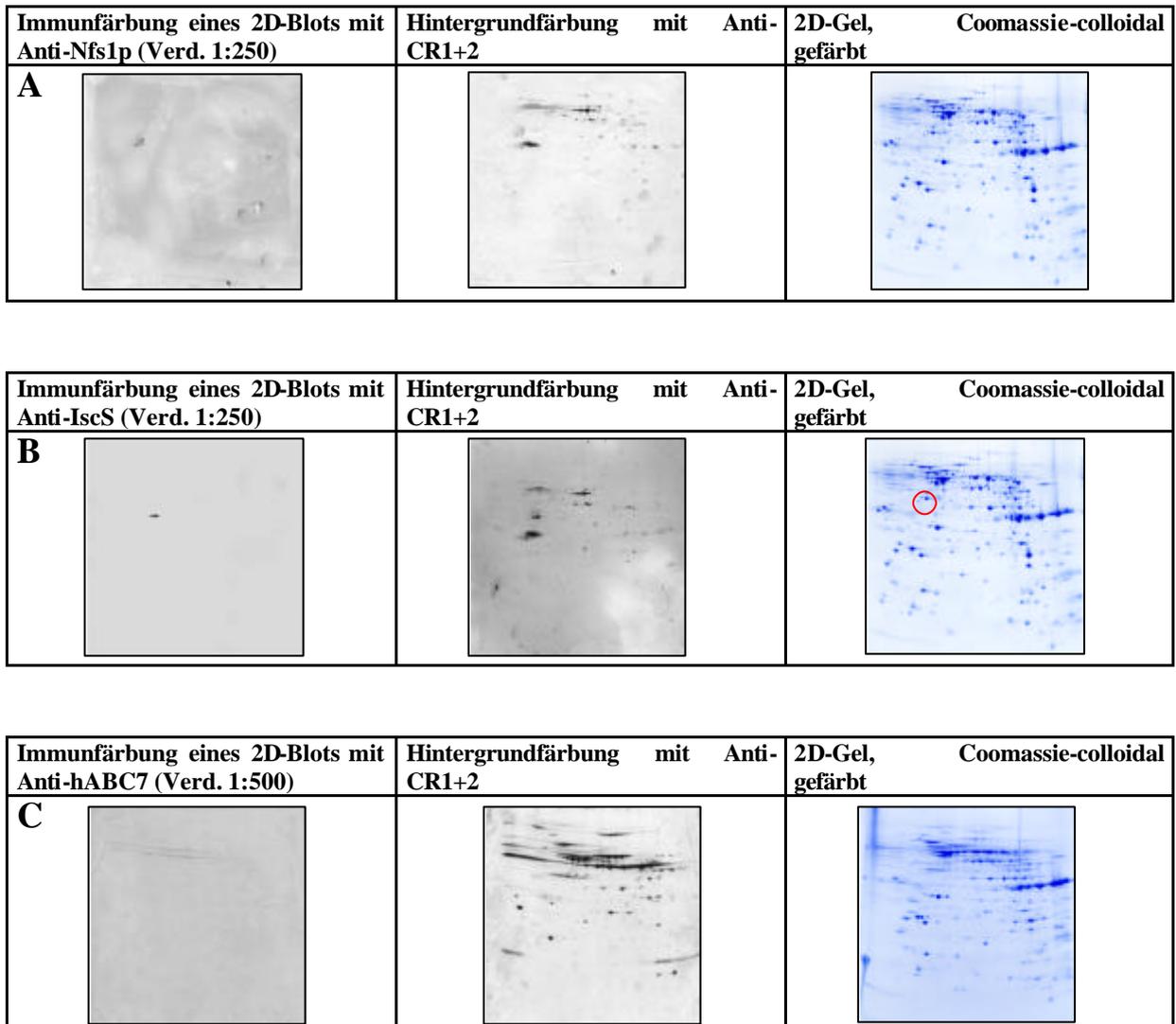
Abbildung 26B zeigt eine eindimensionale Auftrennung von Extrakten aus *Arabidopsis thaliana*-Wildtyp C24 verglichen mit dem jeweiligen Extrakt aus der *starik*-Mutante; pflanzlicher Gesamtextrakt von C24 (G), pflanzlicher Gesamtextrakt von *starik* (G\*) sowie Chloroplasten aus Blattmaterial C24 (C) und *starik* (C\*). Der Western Blot wurde mit dem Antikörper gegen hABC7, dem Sta1-Homolog aus *Homo sapiens*, in der Verdünnung 1:500 durchgeführt. Im pflanzlichen Gesamtextrakt von C24 (G) erkennt der Antikörper zwei Proteine mit den Molekulargewichten 50 kDa und 58 kDa. Betrachtet man die chloroplastidären Extrakte der beiden Pflanzen, so wird deutlich, dass der Antikörper in beiden Extrakten Proteine erfasst. Es wurden eine deutliche Proteinbande von ca. 50 kDa detektiert. Im Chloroplastenextrakt von *starik* (C\*) erkennt der AK ebenfalls ein Protein bei 50 kDa. Die Bande in der *starik*-Mutante ist nicht so intensiv gefärbt wie die Proteinbande identischer Größe in den Chloroplasten von C24. Obwohl die Chloroplasten von der mitochondrialen Mutation der *starik*-Mutante nicht theoretisch nicht betroffen sind, konnte der Antikörper Unterschiede in den Chloroplasten detektieren. Eventuell stellt dies einen Erklärungsansatz für den chlorotischen Phänotyp der *starik*-Pflanze dar, auch wenn nicht eindeutig identifiziert werden konnte, um welche Proteine es sich handelt.

### **3.9 Western Blot-Analysen nach zweidimensionaler Proteinauftrennung**

Um die Spezifität der verwendeten Antikörper zu klären, wurde das Proteom von aus *Arabidopsis*-Suspensionskulturen isolierten Mitochondrien über zweidimensionale-Gelelektrophorese aufgetrennt und geblottet.

Auf Abbildung 27 sind drei Immunoblots dargestellt. Zunächst wurden Mitochondrien aus Suspensionskulturen nach KRUFTE ET AL. (2001) isoliert. Es erfolgte eine Proteinbestimmung, dann wurde das mitochondriale Proteingemisch zweidimensional aufgetrennt. Jeder Immunoblot wurde mit 1 mg Mitochondrienprotein beladen. Ebenso wurden drei 2D-Gele mit identischer Proteinmenge hergestellt und Coomassie-gefärbt. Sie dienten in diesem Versuch als Referenzgele. Jeweils eine Membran wurde mit den spezifischen Antikörpern Nfs1p, IscS und hABC7 inkubiert, eine zweite Membran zur besseren Orientierung mit einem unspezifischen Antikörper gegen die Cytochrom c-Reduktase.

In der Abbildung 27A wurde ein Western Blot mit dem Antikörper Nfs1p in der Verdünnung von 1:250 und einer Inkubationszeit von drei Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. In Abbildung 27B wurde der Antikörper IscS in einer Verdünnung von 1:250 eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug ebenfalls drei Stunden und fand bei Raumtemperatur statt. In Abbildung 27C wurde die Membran mit dem Antikörper gegen hABC7 in einer Verdünnung von 1:500 für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

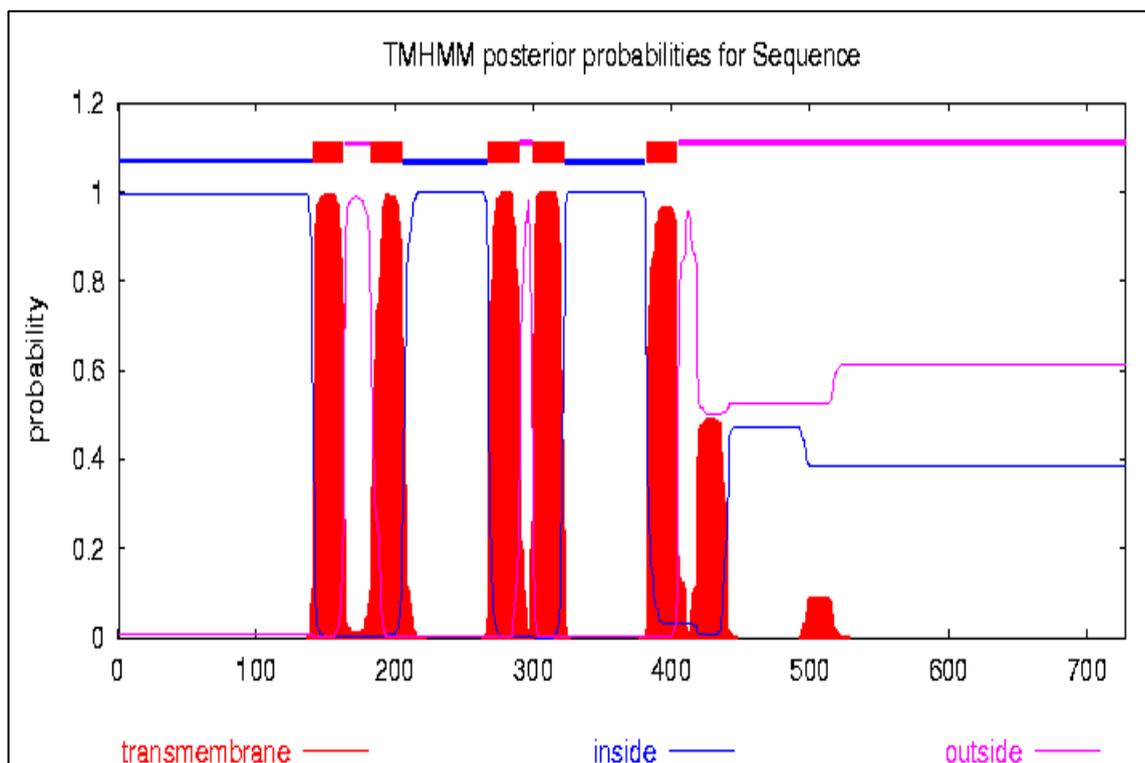


**Abb. 27:** Dargestellt sind drei Western Blot-Analysen mit den primären Antikörpern Nfs1p, IscS in einer 1:250 Verdünnung, hABC7 in einer 1:500 Verdünnung. Coomassie-colloidal-gefärbte 2D-Gele dienen als jeweiliges Referenzgel. Die Immunoblots sowie die Referenzgele wurden mit je 1 mg mitochondrialem Protein von *Arabidopsis thaliana* beladen. Die erste Dimension des geblotteten Gels und des Referenzgels wurde mit hydrophoben Puffern durchgeführt. Die Hintergrundfärbung erfolgte mit einem relativ unspezifischem Antiserum gegen Cytochrom c-Reduktase (CR). Der rot markierte Proteinspot in 27B wurde identifiziert und sequenziert.

Lediglich der Antikörper IscS konnte ein Protein detektieren, das auch über die Hintergrundfärbung auf der Membran lokalisiert werden konnte. Dieses Protein wurde an markierter Stelle aus dem Referenzgel ausgestochen und freundlicherweise von Dr. C. Lemaitre-Guillier (Strassburg, Frankreich) identifiziert. Hierbei stellte sich heraus, dass es sich bei dem detektierten Protein nicht um ein zu IscS homologes Protein handelte.

### 3.10 Charakterisierung des Sta1-Proteins

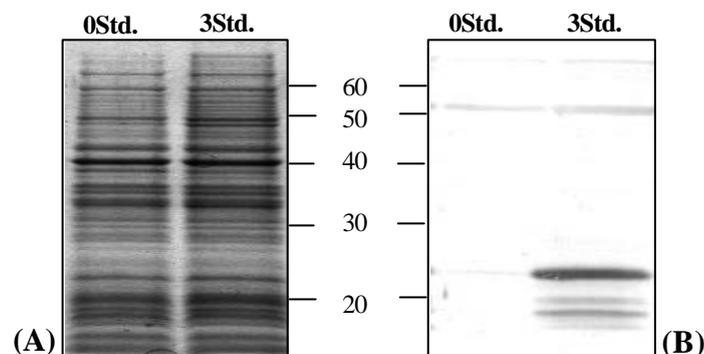
Das Diagramm der Abbildung 28 stellt die Hydrophobizität des Sta1-Proteins dar. Die roten Bereiche markieren die transmembranen Domänen des Proteins. Die lösliche Domäne des Proteins ist grün gekennzeichnet und hat eine Grösse von 278 aa, dies entspricht 834 bp und 22,5 kDa. Um eine weitere Charakterisierung der Funktion des Sta1-Proteins und der *starik*-Mutante vorzunehmen, wurde mit dem Ziel der Antikörpergewinnung die lösliche Domäne des Sta1-Proteins aus *Arabidopsis thaliana* in *E. coli* exprimiert.



**Abb. 28:** Schematische Darstellung des Sta1-Proteins. Die verschiedenen Farben kennzeichnen die einzelnen Domänen. Programm: [WWW.CBS.DTU.DK](http://WWW.CBS.DTU.DK)

### 3.10.1 Expression und Reinigung des Sta1-Proteins

Da das Sta1-Protein in der *starik*-Mutante fehlt, wurde eine ausschliessliche Proteindetektion des Sta1-Proteins in den Mitochondrien des Wildtyps C24 erwartet (Abb. 25). Da dieses Ergebnis den Erwartungen entsprach, wurden Mitochondrien aus C24-Suspensionskulturen zweidimensional aufgetrennt und ebenfalls eine Western Blot-Analyse mit dem gegen hABC7 gerichteten Antikörper durchgeführt. Hier konnte der AK kein Proteine detektieren (Abb. 27). Erstaunlicherweise detektierte der Antikörper jedoch in den *starik*-Chloroplasten eine Proteinbande, die hier nicht erwartet wurde, da die Chloroplasten von mitochondrialen Mutation nicht betroffen sein dürften. Um diese Diskrepanz zu klären und die Spezifität des AK als Fehlerquelle auszuschliessen, wurde die lösliche Domäne des Sta1-Proteins in *E. coli* heterolog exprimiert um einen Antikörper herzustellen. Das Protein wurde am N-Terminus mit einem aus sechs Histidinresten (His-Tag) bestehenden Oligopeptid versehen. Die *E. coli*-Kulturen wurden für drei Stunden mit 1 mM Isopropyl-ss-D-Galaktosid (IPTG) induziert. Ein 12,5 %iges Polyacrylamidgel wurde mit Aliquots der 0 und 3 Stunden-Werte nach Induktion des T7-Promotors mit IPTG entnommenen Proben beladen und Coomassie-gefärbt (Abb. 29A). Mit einem idenisch beladenen Gel wurde eine Western Blot-Analyse mit dem Antikörper gegen den His-Tag durchgeführt (Abb. 29B).



**Abb. 29:** Eindimensionale SDS-PAGE-Analyse von *E. coli*-Zellen, die das Sta1-Protein, exprimieren. Ein weiteres Gel wurde geblottet und ein Antikörper gegen den His-Tag verwendet.

Dieser Antikörper richtet sich gegen die sechs Histidinreste des rekombinanten Fusionproteins. In Abbildung 29B ist zu erkennen, dass der Antikörper gegen den His-Tag in dem 0 Stunden-Extrakt keine Bande detektiert. In dem Proteinextrakt des 3 Stunden-Wertes des Proteinextrakts erkennt der Antikörper eine deutliche Proteinbande mit einem

Molekulargewicht von 22,5 kDa. Dies entspricht der zuvor errechneten Grösse des rekombinant exprimierten löslichen Fragments des Sta1-Proteins. Das rekombinante Protein wurde mittels  $\text{Ni}^{2+}$ -Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen gereinigt und zur Immunisierung eines Kaninches eingesetzt. Da der Antikörper das rekombinante Sta1-Protein, gegen das er hergestellt wurde, erkennt, wurden weitere Western Blot-Analysen durchgeführt. Es wurden Proteingestamtextrate, Mitochondrien- und Chloroplasten-Proteinextrakte aus C24 und *starik*-Pflanzen hergestellt, eindimensionall aufgetrennt und geblotet. Jedoch konnte der Antikörper in keinem der Proteinextrakte ein Protein detektieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

### 3.11 Physiologische Charakterisierung der von C24 und *starik*

Um den chlorotischen Phänotyp der *starik*-Mutante näher charakterisieren zu können, wurden die Chlorophyll- und Carotinoidgehalte der Pflanzen bestimmt. Zu diesem Zweck wurde eine Alterungsreihe von C24- und *starik*-Pflanzen angezogen. Die Pflanzen wurden in fünf verschiedenen Entwicklungsstadien geerntet. Zum Zeitpunkt ihrer Ernte waren die Pflanzen in einem nahezu identischen physiologischen Zustand. Einen komplett identischen Zustand zeigten die Pflanzen zum Zeitpunkt der dritten Ernte. Die Diagramme der Abbildung 30 zeigen die unterschiedlichen Chlorophyll- und Carotinoid-gehalte von C24- und *starik*-Pflanzen.

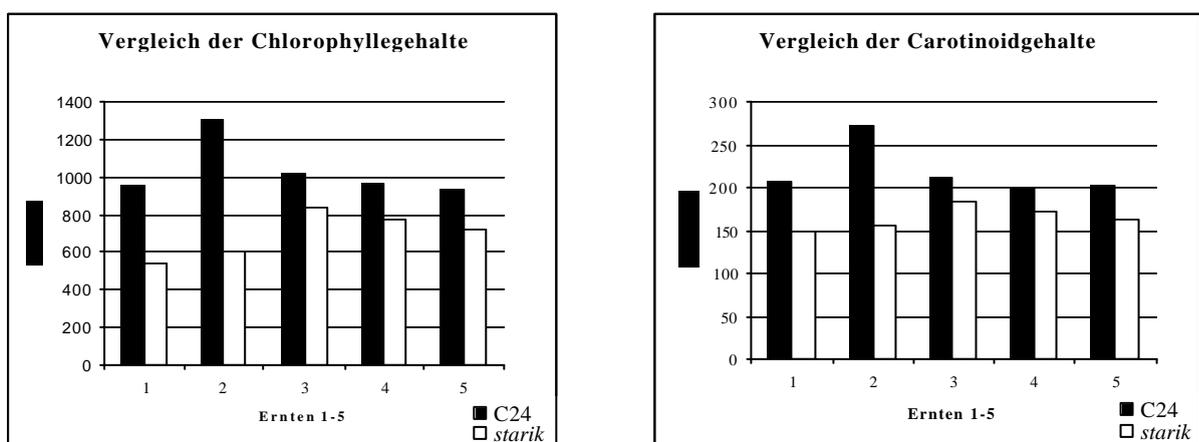


Abb. 30: Bestimmung der Chlorophyll- und Carotinoidgehalte von C24 und *starik* aus Pflanzengestamtextraten nach LICHTENTHALER (1987).

Mit diesen Pigment-Messungen konnte gezeigt werden, dass die Pflanzen der *starik*-Mutante ca. 30 % weniger Chlorophyll und ca. 25 % weniger Carotinoide aufweisen als C24-Pflanzen.

Die Elementanalysen in Tabelle 9 wurden mittels Atomabsorptionsspektroskopie (AAS) freundlicherweise von Dr. M. Hawkesford (Agriculture & Environment Division, IACR Rothamsted, Harpenden, U.K.) durchgeführt. Pflanzliche Gesamtextrakte, Mitochondrien aus etiolierten Suspensionskulturen und Chloroplasten aus Blattmaterial von C24 und *starik* wurden untersucht.

Das Ergebnis dieser Analyse ergab einen dreifach erhöhten Eisengehalt in den Mitochondrien der *starik*-Mutante im Vergleich zum Wildtyp. Die Mitochondrien einer *atm1*-Hefemutante (homologes Protein zu Sta1) akkumulierten 30 Mal mehr Eisen als die Mitochondrien des Wildtyps. Aus diesem Grunde sollten die Eisengehalte in aus grünem Gewebe isolierten Mitochondrien bestimmt werden. Aufgrund der geschilderten Schwierigkeiten war es jedoch nicht möglich, eine ausreichende Menge an Mitochondrien aus grünem Gewebe zu isolieren und ebenfalls über AAS zu analysieren.

In aus der *starik*-Mutante isolierten Mitochondrien ist der Phosphorgehalt interessanterweise fast doppelt so hoch wie in den Mitochondrien des Wildtyps. Dies sollte weiter untersucht werden.

**Tabelle 9:** Elementanalysen von C24 und *starik* mittels AAS. Pflanzlicher Gesamtextrakt (G); Mitochondrien isoliert aus Zellkultur (M); Chloroplasten aus Blattmaterial (C). Einheit in  $\mu\text{mol pro g}$  Trockengewicht.

Elemente	C24/G	<i>starik</i> /G	C24/M	<i>starik</i> /M	C24/C	<i>starik</i> /C
Al	33,0?0,2	8,8?2,9	4,9?3,9	5,2?3,1	14,8	27,0
Ca	793,8?77,11	1126,9?250	16,3?2,5	16,5?7,7	18,7	23,1
Cd	0,15?0,1	0,13?0,02	0,03?0,002	0,01?0,002	0,0	0,0
Co	0,08?0,03	0,2?0,1	0,01?0,001	0,032?0,01	0,0	0,0
Cr	0,5?0,17	0,3?0,18	0,2?0,1	0,3?0,2	0,2	0,6
Cu	0,3?0,06	0,2?0,03	0,4?0,1	0,8?0,3	0,2	0,2
<b>Fe</b>	<b>14,7?2,3</b>	<b>24,9?43,7</b>	<b>5,3?0,9</b>	<b>17,6?1,4</b>	<b>4,2</b>	<b>5,2</b>
K	808,4?264	1158,5?457	68,8?0,2	88,5?0,8	227,2	302,4
Mg	214,1?4,7	279,8?77,4	5,3?2,1	8,2?2,5	51,4	76,4
Mn	2,21?0,2	2,6?1,1	0,2?0,02	1,1?0,2	8,0	10,7
Mo	0,1?0,1	0,06?0,06	0,0?0,16	0,01?0,001	0,0	0,0
Na	212,1?3,6	353,0?1,7	77,4?37,9	79,4?20,7	263,6	387,2
Ni	0,3?0,06	0,2?0,1	0,2?0,19	0,9?0,9	0,1	0,2
<b>P</b>	<b>263,6?46,6</b>	<b>295,3?60,0</b>	<b>108,8?8,4</b>	<b>214,3?1,1</b>	<b>38,6</b>	<b>47,3</b>
Pb	0,03?0,003	0,03?0,02	0,001?0,0001	0,01?0,01	0,0	0,0
<b>S</b>	<b>288,6?31,7</b>	<b>274,9?21,2</b>	<b>58,0?2,5</b>	<b>120,2?0,6</b>	<b>389,2</b>	<b>526,8</b>
Ti	0,7?0,7	0,0?0,1	0,0?0,05	0,09?0,06	0,4	0,7
Zn	2,0?0,02	1,4?0,14	1,2?0,94	1,4?0,13	0,5	1,1
<b>Fe/S</b>	<b>0,051</b>	<b>0,091</b>	<b>0,091</b>	<b>0,146</b>	<b>0,011</b>	<b>0,001</b>
<b>S/Fe</b>	<b>19,6</b>	<b>11,0</b>	<b>10,9</b>	<b>6,83</b>	<b>92,7</b>	<b>101,3</b>

## 4 Diskussion

Anhand von Analysen isolierter Organellen sollten im Rahmen dieser Arbeit die Folgen von Beeinträchtigungen der Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren in Höheren Pflanzen untersucht werden. *Arabidopsis thaliana* diente aufgrund der vollständigen Genomanalyse (THE ARABIDOPSIS GENOM INITIATIVE 2000) in dieser Arbeit als Modellpflanze. Es mussten zunächst Methoden zur Isolierung intakter und sauberer Organellen aus *Arabidopsis*- und Tabak-Pflanzen etabliert werden. Nach der Organellenisolierung sollten dann differentiell exprimierte Proteine von in ihrem Eisenstoffwechsel beeinträchtigten Mutanten und den dazugehörigen Wildtypen durch die 2D-Gelelektrophorese und Western Blot-Analysen untersucht und diese dann in einen physiologischen Kontext zu der Mutation gestellt werden.

Nach der Etablierung der neuen Methoden erwies es sich zunächst als notwendig, diese hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit zu überprüfen.

### 4.1 Die 2D-Gelelektrophorese

Voraussetzung für jede Proteomanalyse sind definierte und reproduzierbare Bedingungen aller relevanten Parameter. Es muss sichergestellt sein, dass das Material reproduzierbar gewonnen wird (CHOE & LEE 2000). Unabhängig, auf welche Art die Proteine gewonnen wurden, müssen sie für eine zweidimensionale Auftrennung vollständig solubilisiert und denaturiert werden, um molekulare Interaktionen zu unterbinden (HERBERT 1999). Nur so kann gewährleistet werden, dass nach abgeschlossener Fokussierung und SDS-PAGE ein Proteinspot einem Polypeptid entspricht (GÖRG ET AL. 2000). Die Solubilisierung und Denaturierung erfolgt in Probenpuffern, die im wesentlichen aus chaotropen, oberflächenaktivierenden und reduzierenden Substanzen bestehen. Chaotrope Salze heben Wasserstoffbrückenbindungen und damit Wechselwirkungen auf. Oberflächenaktive Substanzen verhindern hydrophobe Wechselwirkungen und damit Proteinaggregationen (MOLLOY 2000).

Da allerdings noch kein universell einsetzbares Protokoll zur Solubilisierung heterogener Proteingemische existiert, sollten die Möglichkeiten zunächst in der Literatur eruiert werden ([WWW.EXPASYS.CH](http://WWW.EXPASYS.CH), MÉCHIN ET AL. 2003). Bei den zu untersuchenden Proteinen handelt es sich um komplexe, heterologe Gemische. Aus ihnen müssen zum einen (i) die Proteine

solubilisiert, zum anderen (ii) Substanzen wie Nucleinsäuren, Polysaccharide, Phenole und Salze eliminiert werden, die in der isoelektrischen Fokussierung (IEF) zu störenden Effekten führen (BERKELMANN & STENSTEDT 1998, GÖRG ET AL. 2000). Wie auch bei der Isolierung von Organellen stellt sich bei der Proteinsolubilisierung das generelle Problem, dass Probenmaterial mit zunehmend aufwendiger Probenaufbereitung verloren geht (BERKELMANN & STENSTEDT 1998, JUNG ET AL. 2000, MILLAR ET AL. 2001A).

Lösliche Proteine sind erheblich effizienter solubilisierbar als hydrophobe Transmembranproteine (SANTONI ET AL. 1999A,B & 2000A,B), was eine 2D-Auftrennung löslicher Proteine deutlich vereinfacht.

Die Solubilisierung hydrophober Membranproteine stellt ein besonderes Problem in Zusammenhang mit der 2D-Auftrennung dar. In der Literatur werden zahlreiche Möglichkeiten zur Solubilisierung dieser Proteine genannt und diskutiert (RABILLOUD ET AL. 1999, MOLLOY 2000, SANTONI ET AL. 2000A,B, HERBERT 2001 MÉCHIN ET AL. 2003). Es liegt auf der Hand, dass die diffizile Solubilisierung von membrangebundenen Proteinen die Quantifizierbarkeit, Reproduzierbarkeit und somit die Bewertung der Ergebnisse erschwert. Die Kombination von komplexer Probe und vielschichtiger Methode ist in der Literatur selten zu finden. Entweder wird die Probengewinnung vereinfacht, z.B. durch die Verwendung von Zellkulturen, und/oder die Methode. Zum Teil werden spezielle Methoden der Proteingewinnung mit organischen Lösungsmitteln vorgeschlagen, z.B. Chloroform/Methanol. Arbeitsgruppen, die membrangebundene Proteine untersuchen, stoßen aber schon bei der Solubilisierung der Proteinen an die Grenzen der Methode und trennen von daher die Proteinen mittels eindimensionaler SDS-PAGE auf (HERBERT ET AL. 1998, SEIGNEURIN-BERNY ET AL. 1999, FERRO ET AL. 2000 & 2003, HERALD ET AL. 2003, MILLAR & HEAZLEWOOD 2003, ZABROUSKOV ET AL. 2003). Bisher ist es lediglich wenigen Arbeitsgruppen, z.B. HIPPLER ET AL. (2001) mit der näheren Charakterisierung des LHC I - Komplexes aus *Chlamydomonas reinhardtii*, gelungen, membrangebundene Proteine mit der Methode der 2D-Gelelektrophorese zu identifizieren.

Nach der Solubilisierung folgt unmittelbar die isoelektrische Fokussierung (IEF). Hierbei werden die Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt (pI) separiert. Die IEF ist eine Endpunktmethode, bei der sich die Proteine in einem immobilisierten pH-Gradienten (IPG) an den Punkt bewegen, an dem ihre Nettoladung gleich Null ist und dann ihre Mobilität verlieren. Hierbei kann es schnell zu Proteinpräzipitationen kommen (ADESSI ET AL. 1997).

Um optimale Ergebnisse bezüglich Qualität und Reproduzierbarkeit der Auftrennung zu erzielen, muss der steady-state-Zustand erreicht sein. Wurde die Fokussierungsdauer zu kurz gewählt, kommt es zu horizontalen oder vertikalen Streifen auf der sich anschließenden SDS-PAGE (GÖRG ET AL. 2000). Die optimale Zeit der Proteinfokussierung muss experimentell ermittelt werden.

Ist die IEF abgeschlossen, wird der IPG-Streifen equilibriert. Zum einen werden die Proteine mit DTT-haltiger Equilibrierungslösung reduziert, zum anderen werden ihre SH-Seitenketten mit Equilibrierungslösung, der Jodacetamid zugesetzt wurde, alkyliert (GÖRG ET AL. 2000). Während der Equilibrierung ist mit Verlusten vor allem kleiner und gut wasserlöslicher Proteine zu rechnen (DUNCAN & HERSHEY 1984). Zudem kommt es zu Proteinverlusten, da sich nicht alle Proteine vollständig aus der Gelmatrix des IPG lösen und somit nicht aus der ersten in die zweite Dimension (SDS-PAGE) einwandern. Vorsichtige Schätzungen gehen von einem Proteinverlust von 11-16% bei diesem Schritt aus (KLOSE & KOBALZ 1995).

In der zweiten Dimension werden die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und abschließend als Proteinspot visualisiert. Hierzu schließt sich eine von vielen Färbemöglichkeiten an. Das verfolgte Ziel bestimmt hier die Methode. Es gibt nicht nur eine Färbung für sämtliche Anwendungen, sondern jeweils die beste Färbung für spezifische Anwendungen. Anzuführen sind hier z.B Silber-Färbungen (HEUKESHOVEN & DERNICK 1988), Coomassie-Färbungen (NEUHOFF ET AL. 1985 & 1988), Zink/Imidazol-Färbung (FERNANDEZ-PATRON ET AL. 1992, ORTIZ ET AL. 1992) oder aber Fluoreszenz-Färbungen (PATTON 2002, PATTON & BEECHEM 2002). Generell ist das Ziel jeder Färbung, möglichst viele differentiell exprimierte Proteine anzufärben und zu detektieren. Bei der Silberfärbung handelt es sich um eine äußerst sensitive Methode, mit der Proteinmuster visuell verglichen werden können. Eine sich anschließende massenspektrometrische Proteinidentifikation oder Western-Blot-Analyse scheidet jedoch weitestgehend aus, da durch die Verwendung von Glutaraldehyd und einer Fixierung der Proteine im Gel diese nicht mehr nachbearbeitet werden können. In dieser Arbeit wurde die Silberfärbung nach HEUKESHOVEN & DERNICK (1988) angewandt, um organellare Proteommuster von Wildtyp- und transgenen Pflanzen zu vergleichen. Eine Färbung mit Coomassie-collodial ist etwa zwei Zehnerpotenzen weniger sensitiv, ermöglicht jedoch die Spaltung von Polypeptiden im Gel, daher können sich massenspektrometrische Analysen anschließen (HOUE ET AL. 1997, MATSUI ET AL. 1999A,B, RABILLOUD ET AL. 1999). Ein Problem bei der Visualisierung zweidimensional aufgetrennter Proteine ist das sehr

dynamische Geschehen der Proteinexpression und die chemische Diversität der Proteine (GÖRG ET AL. 2000).

## 4.2 Die Analyse mitochondrialer Proteine

Anhand der Analyse isolierter Mitochondrien aus *Arabidopsis*-Pflanzen (C24 und *starik*) sollte untersucht werden, welche Auswirkung die Mutation von *starik* auf dessen Proteom hat. Obwohl die Isolation von Mitochondrien sowohl aus etiolierten als auch aus grünen Geweben oft in der Literatur beschrieben wurde (NEUBURGER ET AL. 1982, BOUNTRY ET AL. 1984, DOUCE ET AL. 1987, HAMASUR ET AL. 1990, MOORE ET AL. 1993), gestaltete sich ihre Isolation nach eigenen Erkenntnissen als äußerst diffizil und langwierig. Kritische Punkte bei jeder Isolierung von Organellen sind nach MILLAR ET AL. (2001A) die Homogenisation des Pflanzenmaterials, pH-Werte eingesetzter Aufschlusspuffer und das Mengenverhältnis zwischen Aufschlusspuffer und Frischgewicht. Gerade in pflanzlichen Geweben weisen Proteasen eine erhöhte Aktivität auf (COLAS DES FRANCES ET AL. 1985, GEGENHEIMER 1990) und werden bei jedem mechanischen Zellaufschluss aus den Vakuolen freigesetzt (RABILLOUD 2000). Um die daraus resultierende Proteindegradation zu minimieren, wurden alle Arbeitsschritte schnellstmöglich und bei 4°C durchgeführt. Zusätzlich wurde allen Lösungen Protease-Inhibitoren zugesetzt.

Zunächst wurden Mitochondrien aus verschiedenen Pflanzenspezies nach unterschiedlichen Methoden isoliert. Jeder Versuchsansatz bestand aus jeweils sechs voneinander unabhängigen Durchführungen. Die Isolierung der Mitochondrien aus *Arabidopsis* nach der von BERKEMEYER ET AL. (1998) veröffentlichten Methode erwies sich trotz verschiedenster Modifikationen als völlig unzureichend und wurde nicht weiter verfolgt (Ergebnisse nicht gezeigt). Die Isolation von Tabakmitochondrien wurde nach CHAUMONT ET AL. (1994) modifiziert und durchgeführt. Des Weiteren wurden Erbsenmitochondrien nach dem von DAY ET AL. (1985) publizierten Protokoll isoliert. Die nach CHAUMONT ET AL. (1994) und DAY ET AL. (1985) isolierten Mitochondrien wurden biochemisch/physiologisch (Tabelle 6) und gelelektrophoretisch mittels BN-SDS-PAGE (Abb. 7) auf Reinheit und Intaktheit überprüft. Hiernach konnte mit der Methode von DAY ET AL. (1985) die größte Ausbeute an Mitochondrien aus Erbsenpflanzen isoliert werden (Tabelle 6). Zudem wiesen diese die größte Intaktheit auf. Diese Methode wurde daher auf *Arabidopsis*-Pflanzen übertragen. Hierfür mussten jedoch zahlreiche experimentell ermittelte Modifikationen vorgenommen

werden (Tabelle 7). So gelang die Isolierung am besten, wenn die Pflanzen drei Wochen alt waren (Abb. 9), da sich die Chloroplasten, Mitochondrien und andere Organellen in diesem Entwicklungszustand scheinbar noch nicht aneinander gelagert haben und eine Trennung und Isolierung möglich sind. Dieser Zeitpunkt der Pflanzenentwicklung wird vielfach gewählt, um Organellen aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren (PILON-SMITS ET AL. 2002, FERRO ET AL. 2003).

Durch die eingeführten Modifikationen gelang es, eine Methode zu entwickeln, mit der *Arabidopsis*-Mitochondrien in ausreichender Menge isoliert werden konnten, um sie anschließend zweidimensional aufzutrennen. Jedoch scheint die Isolierungsmethode nur eingeschränkt reproduzierbar, wie die Ergebnisse der Abbildung 12 zeigen. Die parallel verlaufenden Auftrennungen von C24 und *starik* (Abb. 12A-C) zeigen durchaus ähnliche Proteommuster, wohingegen die Proteommuster der drei voneinander unabhängigen C24-Versuchsdurchführungen keinerlei Übereinstimmungen aufweisen. Es konnten zwar erhebliche Verbesserungen gegenüber den Ausgangsprotokollen erzielt werden, doch scheint es bislang nicht gelungen, Mitochondrien reproduzierbar aus *Arabidopsis*-Pflanzen zu isolieren. Dies bestätigt die Ergebnisse von JUNG ET AL. (2000), dass weder die Methoden zur Isolierung von Mitochondrien aus Pflanzen, noch die Methoden zur Feststellung der Reinheit und Intaktheit momentan als ausreichend bezeichnet werden können.

Als limitierend stellte sich die Wahl der Modellpflanze heraus. Für molekularbiologische Untersuchungen eignet sich *Arabidopsis thaliana* zwar ausgezeichnet, da die Genomsequenzierung seit Dezember 2000 abgeschlossen ist. Sollen jedoch physiologische Parameter auf Proteinebene untersucht werden, ist es nach eigenen Erfahrungen empfehlenswert, andere Pflanzenspezies zu wählen, da hier deutlich bessere Ergebnisse erzielt werden (DAY ET AL. 1995, PELTIER ET AL. 2000). Um physiologische Untersuchungen durchführen zu können, ist die geringe Blattgröße von *Arabidopsis* ein ganz entscheidender Nachteil, da so nur eine ungenügende Menge Ausgangsmaterial vorhanden ist (SCHUBERT ET AL. 2002).

Daher lässt sich feststellen, dass für die Isolation von Mitochondrien in den allerseltensten Fällen *Arabidopsis*-Pflanzen verwendet werden. In der Literatur wird meist die Verwendung chloroplastenfreier Suspensionskulturen beschrieben, seit der abgeschlossenen Genomsequenzierung meist von *Arabidopsis thaliana* (KRUFTE ET AL. 2001, KUSHNIR ET AL. 2001, MILLAR ET AL. 2001B, HERALD ET AL. 2003, MILLAR & HEAZLEWOOD. 2003, HEAZLEWOOD ET AL. 2003, BORNER ET AL. 2003). Auch

Niedere Organismen wie Hefe oder *E. coli* werden häufig verwendet (HATZIMANIKATIS ET AL. 1999, MOLLOY ET AL. 2000, SICKMANN ET AL. 2003).

Nicht grünes Gewebe als Ausgangsmaterial vereinfacht die Gewinnung von Mitochondrienextrakten, da sie frei von Chloroplasten sind. Aus diesem Grund wurden im Verlauf der vorliegenden Arbeit etiolierte *Arabidopsis*-Suspensionskulturen hergestellt (Abb. 3). Aus den Suspensionskulturen wurden nach KRUFFT ET AL. (2001) Mitochondrien von C24 und *starik* isoliert. Die technische Durchführbarkeit ihrer Isolierung ist eindeutig besser zu bewerten, als die Mitochondrienisolierung aus Pflanzen. So war die Ausbeute bedeutend höher und es konnten letztendlich mehr Proteine aufgetrennt werden, wenn die Organellen aus etiolierten Suspensionskulturen stammen (Abb. 15). Die Mitochondrienproteome von C24 und *starik* zeigten sich auf den Gelen als identisch und die vermuteten Unterschiede der Proteinexpression konnten nicht detektiert werden (Abb. 16) (HAUSMANN ET AL. 2003B). Dies kann verschiedene Gründe haben. Es wäre denkbar, dass (i) bestehende Unterschiede mittels zweidimensionaler Elektrophorese nicht dargestellt werden können, oder dass (ii) eventuell keine Unterschiede zwischen den Proteomen von Wildtyp und Mutante bestehen.

Es wäre es durchaus möglich, dass die Menge der von der *starik*-Mutation betroffenen Proteine unterhalb der Detektionsgrenze der Silber-Färbung lagen und somit nicht detektiert werden konnten. Auch könnten die physikalischen Eigenschaften der beteiligten Proteine die Bedingungen für eine isoelektrische Fokussierung nicht erfüllen. So könnten z.B. der isoelektrische Punkt der Proteine außerhalb des eingesetzten pH-Gradienten liegen. Dann bestünde durchaus eine unterschiedliche Proteinexpression zwischen Wildtyp und Mutante, die jedoch mittels 2D-Gelelektrophorese nicht visualisiert werden konnte.

Die zweite Möglichkeit wäre, dass die untersuchten Proteinextrakte keine zu detektierenden Unterschiede aufweisen. In etiolierten Suspensionskulturen sind die Zellen nicht ausdifferenziert und die Morphologie ist deutlich verändert, es kommt zu keiner Blattausbildung und die Entwicklung reifer Chloroplasten wird unterbunden (CHORY ET AL. 1996, CLOUSE 2001). Licht stellt einen essentiellen abiotischen Faktor für die Pflanzenbiogenese dar. Von SYMONS & REID (2003) konnte anhand von etiolierten und de-etiolierten Suspensionskulturen von Erbse gezeigt werden, dass sich Stoffwechselprozesse lichtabhängig ändern. Eine solche Änderung der Protein- und Metabolitgehalte könnte zur Folge haben, dass das fehlende Genprodukt *Sta1* der *starik*-Mutante durch eine Isoform ersetzt wird, die diese Rolle unter natürlichen Bedingungen nicht übernehmen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die 2D-Gelelektrophorese zunächst eingesetzt, um Proteingemische aus Mitochondrien von *Arabidopsis*-Pflanzen zu untersuchen. Dabei zeigte sich, dass die Methode hierfür ungeeignet erscheint. Es konnten keine reproduzierbaren Ergebnisse erzielt werden. Dies ist sicherlich darauf zurückzuführen, dass die Methode für die Analyse dieser schwer zu extrahierenden Proteine zu komplex ist. Der Vorteil der Methode, ihre Sensitivität, wendet sich hier zum Nachteil, da die Isolierung reiner Mitochondrien aus Pflanzen und die Solubilisierung von Proteinen aus ihnen schwer zu gewährleisten ist (SINGH ET AL. 2000, HAUSMANN ET AL. 2003A).

So ist es leider nicht gelungen die *starik*-Mutante durch den Einsatz der 2D-Gelelektrophorese näher zu charakterisieren. Es wäre erstrebenswert, Mitochondrien in ausreichender Menge und Sauberkeit aus Pflanzen zu isolieren und physiologische Untersuchungen durchzuführen, jedoch versagt hier die Isolierungsmethodik. Eventuell müsste man sich andere physikalische Charakteristika der Organellen als die Dichte zu nutze machen, um sie aus der grünen Pflanze zu isolieren.

### 4.3 Die Analyse von Chloroplasten

Um die chlorotischen beziehungsweise nekrotischen Phänotypen der *starik*- und E82-Mutante näher zu charakterisieren, mussten Methoden zur Chloroplastenisolierung etabliert werden. Zur Isolierung wurde das Protokoll von JENSEN & BASSHAM (1966), ursprünglich für Spinat publiziert, mit nur geringen Modifikationen auf *Arabidopsis thaliana* und Tabak übertragen. Zu Beginn der Analyse chloroplastidärer Proteome von C24 und *starik* sind relativ wenige Proteinspots auf den gezeigten Gelen zu erkennen (Abb. 17 & 18). Ein Grund hierfür ist u.a. in dem geringen Intaktheitsgrad (20 %) der anfangs isolierten Chloroplasten zu suchen. Viele der Plastiden wurden demzufolge während der Isolierung beschädigt und ein Teil der löslichen Proteine, wie die RubisCO als Markerenzym, ging verloren. Dennoch korreliert die Spot-Verteilung mit der in der Literatur beschriebenen typischen Verteilung chloroplastidärer Proteommuster (SCHUBERT ET AL. 2002). Aus diesen gezeigten Gelen wurden auffällige Proteinspots ausgeschnitten und freundlicherweise von Dr. Christelle Lemaitre-Guillier (Strassburg, Frankreich) massenspektrometrisch analysiert. Die Sequenzanalyse lieferte jedoch keine schlüssigen Ergebnisse, da die prozentuale Übereinstimmung zu in Datenbanken vorhandenen Sequenzen lediglich etwa 25 % betrug. Die Methode zur Chloroplastenisolierung wurde optimiert, so dass die isolierten Plastiden zu ca. 65 % intakt

waren und somit auch deutlich mehr Proteine zweidimensional erfasst werden konnten (Abb. 19-21). Jedoch gelang dies nicht reproduzierbar, weshalb auf eine weitere Sequenzanalyse verzichtet wurde.

Es scheint allerdings lediglich eine Frage der Routine zu sein, chloroplastidäre Proteine zweidimensional aufzutrennen, was in der Kürze der Zeit jedoch nicht mehr zu erreichen war. Etliche Arbeitsgruppen analysieren und identifizieren aus Chloroplasten extrahierte Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese. KIESELBACH ET AL. (2000), PELTIER ET AL. (2000 & 2002) und SCHUBERT ET AL. (2002) analysieren die löslichen Proteine des chloroplastidären Thylakoidlumens, BALMER ET AL. (2003) die Proteine des Chloroplastenstromas. Diese Gruppen bewerten die Methode der 2D-Gelelektrophorese als hocheffizient zur Identifizierung löslicher Chloroplastenproteine.

#### **4.4 2D-Auftrennung pflanzlicher Gesamtextrakte**

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden Proteingesamtextrakte aus *Arabidopsis thaliana* und Tabak parallel untersucht, um mögliche Unterschiede im Proteommuster zwischen Wildtyp und Mutante zu detektieren. Gesamtextrakte sind ohne großen Aufwand schnell und reproduzierbar zu extrahieren und stellen keinen limitierenden Faktor für die Proteomanalyse dar. Dennoch war es nicht möglich, erwartete Unterschiede der Proteommuster von Wildtyp und Mutante zu detektieren (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da die Proteommuster der isolierten Mitochondrien aus Suspensionskulturen, Chloroplasten aus Blattmaterial als auch die Proteingesamtextrakte keine schlüssigen Ergebnisse erbrachten, wurden Gesamtextrakte der eingesetzten Pflanzenspezies vergleichend aufgetrennt, um die Zuverlässigkeit der 2D-Gelelektrophorese zu überprüfen (Abb. 22). Die Proteommuster der drei Extrakte aus C24-Pflanzen zeigten viele Ähnlichkeiten, dennoch waren in der Spotintensität auch Unterschiede erkennbar. Daraufhin folgte eine parallele Auftrennung desselben C24-Proteingesamtextraktes auf zwei Gelen, um so die Reproduzierbarkeit der Gelelektrophorese zu kontrollieren (Abb. 23). Hiernach kann die Methode zwar als etabliert bezeichnet werden, da die Proteommuster viele und eindeutige Übereinstimmungen zeigten. Leider ist es aber nicht gelungen, komplett identische Gele aus dem eingesetzten Gesamtextrakt von C24-Pflanzen herzustellen, was die Reproduzierbarkeit der Methode in diesem Stadium der Untersuchungen in Frage stellte.

---

## 4.5 2D-Gelelektrophorese – The road to Mandalay?

Bei allen durchgeführten Analysen mittels 2D-Gelelektrophorese konnten keine signifikanten Unterschiede der Proteome von Wildtyp und Mutante erkannt werden. Vielmehr stellte sich heraus, dass der Methode große Probleme bezüglich Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit zu bescheinigen sind. Im folgenden soll hierauf eingegangen werden.

Der Weg, den ein Protein aus dem jeweiligen Gewebe bis zu seiner Identifizierung als Proteinspot auf einem Gel zurücklegen muss, umfasst viele Schritte und ist von vielen Faktoren beeinflusst. Die Kombination sämtlicher flexibler Parameter (Proteinisolierung, Solubilisierung, Fokussierung, Auftrennung per SDS-PAGE, Visualisierung und Identifizierung), die einer Proteinidentifizierung zugrunde liegen, ist ausgesprochen schwierig zu optimieren und die reproduzierbare Etablierung dieser Methoden stellt immer wieder Probleme dar (CHOE & LEE 2000). Das gesamte Procedere der 2D-Gelelektrophorese ist durch die Komplexität als äußerst störanfällig einzustufen. Zwar ist der Begriff der Proteomanalyse im Laufe der letzten Jahre zu einem Schlagwort in der Post-Genomsequenzierungsära geworden, jedoch sind in der Literatur ständig neue Veröffentlichungen zu finden, die sich mit dem Thema der 2D-Gelelektrophorese kritisch auseinandersetzen (GYGI ET AL. 2000, SANTONI ET AL. 2000A,B, FEY & LARSEN 2001, HERBERT ET AL. 2001, ONG & PANDEY 2001, RABILLOUD 2002, MEYER 2003). Prinzipiell lässt sich sagen, dass je einfacher die untersuchte Probe ist, desto besser und reproduzierbarer sind die erzielten Ergebnisse (JUNG ET AL. 2000).

Die Methode der 2D-Gelelektrophorese ist durch ihre Komplexität und Sensivität in ihren Anwendungsmöglichkeiten und ihrer Reproduzierbarkeit deutlich eingeschränkt (CHOE & LEE 2000, SARTO ET AL. 2002). Sie ist kaum zu automatisieren, da alle Arbeitsschritte auf personelle Durchführung angewiesen sind. Dies kann zu einer Summierung kleinster Ungenauigkeiten und somit zu nicht reproduzierbaren Ergebnissen führen. CHOE & LEE (2000) nennen etliche Fehlerquellen, die zu beseitigen Jahre dauern kann. Nicht umsonst gibt es bisher keine allgemein gültigen Standardprotokolle. Der Bedarf an Methoden, die reproduzierbar, schnell und einfach in der Handhabung sind, ist nach wie vor vorhanden. Trotz jahrzehntelanger Bemühungen vieler Arbeitsgruppen gibt es bis heute keine wirklich schnelle, befriedigende Lösung. Die vielleicht größten Probleme für Präzision und

Robustheit der 2D-Gelelektrophorese entstehen wahrscheinlich durch die bei allen Detektionsarten vorgeschalteten Derivatisierungen. Die Problematik der Robustheit der Methode wurde bisher in der Literatur noch überhaupt nicht diskutiert (VOSS & HABERL 2000, MAHON & DUPREE 2001). Die meisten Arbeitsgruppen nutzen die Proteomanalyse letztlich nur als Hochdurchsatzmethode zur Identifizierung möglichst vieler Proteinsequenzen, um damit Vergleichsstudien in Datenbanken durchzuführen (GALLARDO ET AL. 2002).

## 4.6 Untersuchungen zur Fe/S-Zentren-Biosynthese

Aufgrund der beschriebenen Schwierigkeiten bei der Etablierung neuer Methoden und deren Überprüfung auf Zuverlässigkeit konnten im Rahmen dieser Arbeit keinerlei aussagekräftige Ergebnisse zur Kompartimentierung der Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren erzielt werden.

Molekularbiologisch arbeitende Arbeitsgruppen, die sich mit der Fe/S-Zentren Biosynthese beschäftigen, konnten mittlerweile nachweisen, dass in dem *Arabidopsis*-Genom ein Gen für eine plastidäre Cysteindesulphydrase codiert. Somit würde in Chloroplasten reduzierter Schwefel bereitgestellt und sie wären theoretisch in der Lage, benötigte Fe/S-Zentren selbst zu synthetisieren (LEON ET AL. 2002 & 2003). Diese Untersuchungsergebnisse werden von zwei weiteren Arbeitsgruppen gestützt (PILON-SMITS ET AL. 2002, WOLLENBERG ET AL. 2003).

Um diese ausschließlich molekularbiologischen Daten mittels Western Blot-Analysen physiologisch zu untermauern, wurde im Verlauf dieser Arbeit durch Antikörper gegen Cysteindesulphydrasen (Nfs1p, NifS, IscS) und das ABC-Transporter-Protein hABC7 nach homologen Proteinen in *Arabidopsis* gesucht. Bei einer Identifizierung von homologen Proteinen sollten diese sequenziert und anschließend ihre Isoformen über PCR isoliert werden. Hierzu wurden zunächst Proteingesamtextrakte, Mitochondrien aus Suspensionskulturen und Chloroplasten eindimensional aufgetrennt (Abb.24-27 & 29). Die eingesetzten Antikörper gegen Nfs1p, NifS und IscS erkannten homologe Proteine nur in den Proteinextrakten der Mitochondrien, nicht aber in denen der Chloroplasten und im Gesamtextrakt. Da die meisten Proteine der Fe/S-Zentren-Biosynthese jedoch lösliche Proteine sind (LILL ET AL. 1999), kann hier nicht ausgeschlossen werden, dass ein Teil der löslichen Proteine bereits aus den beschädigten Chloroplasten ausgetreten war. Jedoch reagierten teilweise mehrere Proteine mit den Antikörpern, was eine eindeutige Aussage nicht

zulässt. Vor allem wäre ein Antikörper gegen das Fe/S-Zentrum von Ferredoxin hilfreich gewesen. Es haben allerdings weder ein selbsthergestellter, noch ein zugesandter Antikörper reproduzierbar das richtige Protein erkannt (Ergebnisse nicht gezeigt).

Es wurden weitere Western Blot-Analysen durchgeführt, in denen ein zugesandter Antikörper gegen hABC7 vergleichend in pflanzlichen Gesamtextrakten, aus Suspensionskulturen gewonnenen Mitochondrienextrakten und Chloroplasten aus Blattmaterial von C24 eingesetzt wurde. Wie eingangs beschrieben, bestehen Homologien des mitochondrialen Transporterproteins Atm1p aus Hefe zum Sta1-Protein aus *Arabidopsis* und zum menschlichen hABC7-Protein (BEKRI ET AL. 2000, KUSHNIR ET AL. 2001). Die in den Mitochondrien aus C24 detektierte Bande (Abb. 25) entspricht also durchaus den vermuteten Ergebnissen, da es sich bei *starik* um eine mitochondriale Knock-out-Mutante handelt. Interessanterweise detektierte der Antikörper jedoch auch in den Chloroplasten eine spezifische Bande. Daraufhin wurden chloroplastidäre Proteinextrakte von C24 und der *starik*-Mutante näher untersucht. In Abbildung 26 ist festzustellen, dass der Antikörper gegen hABC7 nicht nur im Wildtyp ein Protein erkennt, sondern auch in der *starik*-Mutante. Hier liegt das Protein jedoch in erheblich geringerer Konzentration vor. Es stellt sich die Frage, was der Antikörper detektiert. Bei dem zugesandten Antikörper handelt es sich um einen Oligopeptid-Antikörper gegen das Protein hABC7 aus *Homo sapiens*, von daher sind Artefakte der Proteindetektierung nicht auszuschließen. Handelt es sich also um Artefakte, oder existiert ein zu hABC7 homologes Protein auch in Chloroplasten, dessen Expression durch die Mutation in *starik* ebenfalls beeinträchtigt wäre? Die könnte ein sinnvoller Ansatz für die Erklärung des chlorotischen Phänotyps der *starik*-Mutante sein.

Von Frau PD Dr. D. Kessler (Institut für Biologische Chemie, Universität Heidelberg) wurde freundlicherweise ein weiterer Antikörper zur Verfügung gestellt, der sich gegen eine mögliche Cysteindesulhydrase (C-DES) in dem Cyanobakterium *Synechocystis* richtet. *Synechocystis* gilt als Chloroplastenmodell Höherer Pflanzen. Durch Western Blot-Analysen wurde nach einem zu C-DES homologen Protein in *Arabidopsis*-Chloroplasten gesucht. Jedoch konnte der Antikörper kein Protein in den Plastiden von *Arabidopsis thaliana* detektieren (Ergebnisse nicht gezeigt). Da es sich bei dem Antikörper um einen polyklonalen handelt, ist seine Spezifität eventuell nicht ausreichend, um in Pflanzenextrakten ein Protein zu detektieren. Das homologe Protein aus *Arabidopsis*-Chloroplasten könnte allerdings auch während der Chloroplastenisolierung verloren gegangen sein, da es sich um ein lösliches Protein handeln würde, oder die Homologie des C-DES-Proteins aus *Synechocystis* zu den chloroplastidären Proteinen Höherer Pflanzen ist nicht hoch genug. Jedoch zeigten Northern

Blot-Analysen von C24- und *starik*-Pflanzen, dass sie sich bezüglich mitochondrialer und plastidärer Cysteindesulphydrasen unterscheiden. Die Mengen der m-RNA-Moleküle, die für C-DES und NifS codieren, sind in der *starik*-Mutante interessanterweise deutlich höher als in C24 (mündliche Mitteilung von Frau J. Volker). Dies hätte zur Folge, dass in den Organellen der *starik*-Mutante eine erhöhte Aktivität der Cysteindesulphydrasen zu verzeichnen wäre.

Da diese Untersuchungen keine schlüssigen Ergebnisse zuließen, wurde das mitochondriale ABC-Transporter-Protein (Sta1) von *Arabidopsis thaliana* heterolog in *E. coli* exprimiert, um so einen Antikörper gegen die lösliche Domäne des Proteins herzustellen (Abb. 28 & 29). Hiermit wurden ebenfalls Western Blot-Analysen durchgeführt. Der Antikörper gegen die lösliche Domäne des Sta1-Proteins konnte lediglich das heterologe *E. coli*-Protein detektieren, nicht aber Proteine in den Extrakten aus Organellen oder im pflanzlichen Proteingesamtextrakt von C24 und *starik* (Ergebnisse nicht gezeigt). Entweder ist es nicht ausreichend, einen Antikörper nur gegen die lösliche Domäne eines Proteins zu richten, oder das Sta1-Protein ist selbst im Wildtyp zu gering exprimiert. Eventuell ist die Expression des Sta1-Proteins zu gering, als dass es mittels der eingesetzten Analysemethoden detektiert werden könnte. Zumal besonders die Methode der 2D-Gelelektrophorese das Problem beinhaltet, lediglich in hoher Zahl exprimierte Proteinen darstellen zu können (VAN WIJK 2001, FERRO ET AL. 2003). Vermutlich ist es nicht gelungen, mit den eingesetzten Solubilisierungspuffern das hydrophobe Sta1-Protein in Lösung zu bringen. Die Kombination beider Methoden, 2D-Gelelektrophorese und Western Blot-Analyse, scheint aber durchaus erfolgsversprechend zu sein, wie Abbildung 27 zeigt. Dort konnte zumindest der IscS Antikörper ein mitochondriales Protein spezifisch detektieren. Die massenspektrometrische Analyse erfolgte freundlicherweise von Dr. Christelle Lemaitre-Guillier (Strassburg, Frankreich) über MALDI und/oder LC-MSMS. Eine Homologie zum IscS-Protein aus *E. coli* konnte jedoch nicht festgestellt werden. Dies kann aber auch primär daran liegen, dass das IscS-Protein im Referenzgel nicht als solches erkannt werden konnte, weil entweder die Coomassie-Färbung nicht sensitiv genug ist, oder aber das Protein sich im Referenzgel nicht an identischer Position wie im Immunoblot befand. Somit wäre schlicht und einfach ein falsches Protein sequenziert worden, was aber durchaus die Schwierigkeiten der Proteinidentifikation mittels 2D-Gelelektrophorese illustriert. Es müssen identische Gele hergestellt werden, um eine Proteinidentifikation auf dem dazugehörigen Referenzgel gewährleisten zu können.

Im weiteren Verlauf wurden die Metabolitgehalte von C24 und *starik* näher untersucht. Die Messungen ergaben deutliche Unterschiede ihrer Chlorophyll- und Carotinoidgehalte (Abb.30). Die Metabolitgehalte der *starik*-Mutante sind gegenüber C24 um etwa 30 % reduziert. Auch die freundlicherweise von Dr. M. Hawkesford durchgeführte Elementanalysen per AAS von C24 und *starik* zeigen Unterschiede besonders des Eisengehaltes in den Mitochondrien (Tabelle 9). In aus Wurzelzellkulturen der *starik*-Mutante isolierten Mitochondrien war 1,5-mal mehr Eisen gemessen worden als in C24 (KUSHNIR ET AL. 2001). Die Messungen der eigenen Proben aus Suspensionskulturen ergab einen dreifach erhöhten mitochondrialen Wert. Zudem wurde auch eine Akkumulation von Schwefel und Phosphat in den *starik*-Mitochondrien ermittelt. Die Eisen- und Schwefelakkumulationen in der *starik*-Mutante ließen sich durch das Fehlen des mitochondrialen Transporterproteins und der erhöhten Cysteindesulfhydrase erklären.

Die Elementanalyse der Chloroplasten zeigte, dass die Chloroplasten der *starik*-Mutante ca. 30 % mehr Schwefel und ca. 25 % mehr Eisen akkumulieren als die Chloroplasten von C24. Jedoch ergab die Elementanalyse keine Ergebnisse, durch die sich der chlorotische Phänotyp erklären ließe, da Eisen für die Chlorophyll-Biosynthese essentiell ist und ein Mangel normalerweise sehr schnell zu Chlorosen führt (RICHTER 1998).

Zudem stammten die analysierten Mitochondrien aus etiolierten Suspensionskulturen, die aufgrund ihres veränderten Stoffwechsels kein optimales Probenmaterial darstellen. Es wäre daher wünschenswert, biochemische Untersuchungen mit aus Pflanzen isolierten Organellen durchzuführen. Auf Grund der oben beschriebenen Schwierigkeiten bei der Isolierung von Mitochondrien aus Pflanzen waren diese Untersuchungen aber im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

## 4.7 Nachbetrachtung, Bewertung und Ausblick

Alle in dieser Arbeit vorgenommenen Ansätze zur Analyse der Kompartimentierung der Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren in Höheren Pflanzen scheiterten, da es nicht gelang, Mitochondrien in ausreichender Menge und Sauberkeit aus *Arabidopsis thaliana* zu isolieren. Es ist aber sicher nur eine Frage der Zeit, bis auch die Genome anderer Pflanzenspezies durchsequenziert sind, die sich besser für physiologische Untersuchungen eignen, wie z.B. Erbse oder Tabak. Aus diesen Spezies stellt die Isolierung der Organellen deutlich weniger

Probleme dar. Es konnten innerhalb weniger Monate Methoden zur Organellenisolation aus diesen Pflanzenspezies etabliert werden. Etabliert wurden im Verlauf dieser Arbeit zusammengefasst folgende Methoden: Die Isolierung von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana*-Pflanzen und -Suspensionskulturen sowie aus Erbsen- und Tabak-Pflanzen als auch die Isolierung intakter Chloroplasten aus *Arabidopsis* und Tabak. Zusätzlich wurde die 2D-Gelelektrophorese inklusive der Methoden zur Visualisierung der Proteinspots in diesem Labor eingeführt. Aufgrund der langwierigen Arbeiten zur Etablierung dieser Methoden und der nur eingeschränkten Reproduzierbarkeit konnten keine aussagekräftigen Ergebnisse bezüglich der ursprünglichen Fragestellung getroffen werden.

Die etablierten Methoden scheinen zudem relativ ungeeignet, die abweichenden Phänotypen der eingesetzten transgenen Pflanzen näher charakterisieren zu können. Bei der technisch am einfachsten durchzuführenden Auftrennung der Proteome aus pflanzlichen Gesamtextrakten konnten keine Unterschiede zwischen Wildtyp und Mutante erkannt werden, da vermutlich die gesuchten Proteine zu gering exprimiert werden, als dass sie im Gesamtextrakt detektierbar wären. Weder durch die 2D-Gelelektrophorese noch durch Western Blot-Analysen konnten hier Ergebnisse erzielt werden. Von daher ist es zweckmäßig, eine Subproteomanalyse durchzuführen. Jedoch sind die Methoden zur Subfraktionierung nicht ausreichend, um quantitativ und qualitativ hochwertige Mitochondrien aus *Arabidopsis*-Pflanzen zu isolieren (HAUSMANN ET AL. 2003A). Die Analyse von etiolierten Suspensionskulturen, aus Sicht der Durchführbarkeit sicherlich am angebrachtesten, ist aus physiologischer Sicht wenig hilfreich. Der Stoffwechsel dieser Suspensionskulturen ist deutlich abweichend von dem einer natürlich gewachsenen Pflanze. Die gesuchten Unterschiede der Proteinexpression treten hier eventuell gar nicht auf. Es scheint zweifelhaft, ob physiologische Untersuchungen zur Kompartimentierung der Biosynthese eisenhaltiger Kofaktoren in *Arabidopsis thaliana* durch die in dieser Arbeit angewandten Methoden überhaupt durchzuführen sind. Es stellen sich also die grundsätzlichen Fragen, inwieweit physiologische Untersuchungen mittels Zellkulturen aussagekräftig sind, und ob bestehende Unterschiede in der Proteinexpression von *starik* unter Umständen mittels 2D-Gelelektrophorese gar nicht erfasst werden können.

Es ist zudem fragwürdig, ob Unterschiede der differentiell exprimierten Proteine mittels 2D-Gelelektrophorese nachgewiesen werden können. Wie bereits ausführlich dargestellt, erweist sich die Methode hier als begrenzt. Geeignet ist eine 2D-Auftrennung lediglich für lösliche Proteine. Bei vielen Proteinen, die an der Fe/S-Zentren-Biosynthese beteiligt sind, handelt es sich um lösliche Proteine. Eventuell bietet sich hier eine Möglichkeit, die Ergebnisse der

molekularbiologischen Arbeitsgruppen über Proteomanalysen zu vervollständigen. Angebracht wäre hier dann eine Fluoreszenzfärbung der Gele (DiGE: Difference Gel Electrophoresis). Mit dieser Methode können bis zu drei verschiedene Proben auf einem Gel dargestellt werden (UNLU ET AL. 1997, TONGE ET AL. 2001, PATTON 2002, BORNER ET AL. 2003). Hierdurch wird die Reproduzierbarkeit deutlich erhöht, da zumindest Fehler durch eine geringfügig abweichende Herstellung und Beladung unterschiedlicher Gele ausgeschlossen werden kann. Demzufolge wird die Vergleichbarkeit der Proben erheblich gesteigert. Diese Methode ist allerdings äußerst kostspielig.

Die Durchführung zweidimensionaler Analysen setzt eine große Erfahrung und Routine des Experimentators voraus. Nur sehr wenige große Arbeitsgruppen, die sich schon lange mit der Methode beschäftigen, können reproduzierbare Ergebnisse vorweisen (Choe & Lee 2000). Diese Arbeitsgruppen arbeiten jedoch nicht mit dem komplexen System "Pflanze". Das Hauptaugenmerk scheint dabei einzig der Identifizierung einer großen Anzahl von Proteinen aus verschiedenen Organismen zu gelten. Generell ist festzustellen, dass die Entwicklung der Proteomanalyse in Richtung datenbankgestützter Untersuchungen zur Identifizierung prominenter Proteine tendiert (SUCKAU ET AL. 2003). In den letzten Jahren scheinen physiologische Analysen mehr und mehr ins Hintertreffen geraten zu sein, da physiologische Untersuchungsansätze diesbezüglich in der Literatur nahezu verschwunden sind.

Bis zum Abschluss dieser Arbeit konnten zwar zahlreiche Methoden in diesem Labor etabliert werden, durch ihre Komplexität und die schwierige Handhabung der Methoden ist es jedoch nicht gelungen, definitive Aussagen bezüglich der ursprünglichen Fragestellung zu treffen. Werden die Plastiden von den Mitochondrien mit Fe/S-Zentren versorgt, oder ob eine eigenständige Synthese von Fe/S-Zentren in Chloroplasten stattfindet, wie es molekularbiologisch arbeitende Arbeitsgruppen nachgewiesen haben. Diese Gruppen konnten nachweisen, dass die Chloroplasten theoretisch in der Lage sind, benötigte Fe/S-Zentren selbst zu synthetisieren. Jedoch stellt sich dann erst recht die Frage, weshalb die mitochondriale Mutation in *starik* einen chlorotischen Phänotyp der Pflanze mit sich bringt.

# Anhang

**Tabelle 10:** Ergebnisse der massenspektrometrischen Sequenzierung löslicher chloroplastidärer Proteine.

Spot	Maldi file	LC-MS/MS file	Identification (peptide mass)	Maldi	Identification LC-MS/MS (peptide mass and sequence)
A	U6649C G	Q9062CG	<b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</b> O63143, cover.20%, error 33 ppm 764.37, 1020.52, 1464.75, 927.46, 909.44, 1260.71, 1186.66, 911.46, 897.40, 913.40, 920.43, 1274.72, 1058.55		<b>Homologous to plastic aldolase P93565</b> 1386.71:LASIGLENTEAR 1113.52:SAAYYQQGAR <b>hypothetical protein Aam98225</b> 1760.77:LVSWYDNEWGYSSR 1433:AASFNIIPSSTGAAK <b>PhotosystemII 44kDa reaction center protein P10804</b> 1452.75:LGANVGSAQGPTGLGK
B	U6648C G	Q9063CG	<b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</b> Q8LUP6, cover.21%, error 32ppm 764.37, 1020.52, 1464.75, 1187.60, 927.46, 909.44, 1260.71, 888.47, 700.39,1186.66, 911.46, 897.40, 913.40		<b>Latex plastidic aldolase-like protein Q81168</b> 1386.71:LASIGLENTEANR 1198.49:YTGEGESEEA 1349.68:TVVSIPNGPSALAVK <b>PSII 44kDa protein</b> <b>1425.75:LGANVGSAQGPTGLGK</b> <b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Q9ZSR9</b> 1229.62:DLATEGNEIIR 1260.62:FLFCAEAIYK 1406.66:LTYYTPEYETK
C	U6647C G	Q9064CG	<b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase</b> Q95dx5, cover.20%,error 24ppm 1406.66, 1020.52, 1464.75, 1187.60, 1260.71, 1044.54, 1186.66, 911.46, 897.40		<b>Latex plastidic aldolase-like protein Q81168</b> 1386.71:LASIGLENTEANR 1349.68:ATPQQVSDYTLK <b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Q9XQP7</b> 1088.57:GPPHGIQVER 1406.66:LTYYTPEYETK 1260.62:FLFCAEAIYK <b>Malate dehydrogenase Q9SPB8</b> 1575.89:ALEGADVVIIPAGVPR 1218.69:LFGVTTLDVVR
D	U6645C G	Q9065CG	<b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Q8mar2,cover.23%, error 24ppm</b> 1406.66, 1020.52, 1464.75, 909.44, 1186.66, 1260.71, 911.46, 897.40, 927.46, 913.40, 1274.72, 1549.77, 1794.77		<b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase P36485</b> 1406.66:LTYYTPEYETK <b>Putative fructose bisphosphate aldolase Aan15425</b> 1386.71:LASIGLENTEANR

**Tabelle 11:** Ergebnisse der massenspektrometrischen Sequenzierung chloroplastidärer Membranroteine.

1	U6661C G	Q9066CG	<p><b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase AA019421, cover.33%, error 26ppm</b></p> <p>1020.52, 1464.75, 1501.84, 909.44, 1450.61, 1260.62, 961.47, 1186.66, 911.46, 897.40, 913.40, 1432.74, 1248.67, 1115.58, 1227.65</p> <p><b>Monodehydroascorbate reductase Q9XEL2, cover 22%, error 28ppm</b></p> <p>1118.60, 1564.80, 732.42, 1507.77, 963.51, 1294.71, 1403.71, 1031.58, 1072.48, 1164.59</p> <p><b>PhotosystemII P680 chlorophyll A apoprotein Q9bbq8, cover 18%, error 25ppm</b></p> <p>790.41, 1205.65, 1325.66, 1922.86, 1484.73, 2169.00, 703.37, 1289.66</p>	<p><b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Q39288</b></p> <p>1186.65:DNGLLLHIHR 3853.86: VTPQPGVPPEEAGAAVAAESSTGTWTTVWTDGLTSLDR 1088.57:GPPHGIQVER 1020.52:DTDILAAFR 1464.78:TFKGPPIHGIQVER 1450.61:DDENVNSQPFMR 911.46:AMHAVIDR 1818.94:LEGDRESTLGFVDLLR</p> <p><b>ADP-Glucose 1-phosphate adenylyl transferase small unit, chloroplast precursor Q9M462</b></p> <p>1342.81:LLNTDNVK</p>
---	-------------	---------	---	--

3	U6660C G	Q9067CG	<p><b>ATP synthase beta subunit Q95dz3, cover 25%, error 23ppm</b></p> <p>1260.69, 1253.57, 2056.07, 810.42, 1044.58, 974.4, 1327.69, 1600.81, 1432.74, 1020.56</p> <p><b>Ribulose-1.5 bisphosphate carboxylase/oxygenase Q9mvx3, cover. 24%, error 25ppm</b></p> <p>1020.52, 1464.75, 909.44, 947.46, 1786.73, 1186.66, 911.46, 1432.74, 1260.71, 1044.54</p>	<p><b>Similar to mitochondrial NAD-dependent malate dehydrogenase Aam91183</b></p> <p>1589.91:ALEGADLVIIIPAGVPR 1218.69:LFGVTTLDVVR 1346.79:KLFVTTILDVVR 1232.58:TQDGGTEVVEAK 1792.06:VAILGAAGGIGQPLALLMK</p> <p><b>Chloroplast NAD-dependent malate dehydrogenase Q9sn86</b></p> <p>1467.71:AGAGSATLSMAYAAAR 1218.69:LFGVTTLDVVR 1346.79:KLFVTTILDVVR 1776.08:VALVLGAAGGIGQPLSLLIK13K23.15 <b>protein</b></p> <p><b>Aam63361</b></p> <p>1333.73:LIAVVFPSFGER 1460.77:LILTMPASMSLER <b>1344.72:AFGAELVLTPEPAK</b>Cystein synthase <b>Aam63361</b> 1333.73: LIAVVFPSFGER 1460.77:LILTMPASMSLER 1344.72:AFGAELVLTPEPAKAT4g38970/F19H22-70 Q944g9 1127.53:TAAYYQQGAR 1451.83:TVVSIPNGPSALAVK 1430.70:LDSIGLENTEANR 1290.68:ATPPEQVAAYTLK <b>Endomembrane associated protein Q96262</b> <b>1424.70:VVETYEATSAEVK</b>Glucan <b>endo-1,3-beta D glucosidase T10119</b> 1516.00:DPNQEVLASLR</p>
5	U6659C G	Q9068CG	<p><b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase O20306, cover.23%, error 47ppm</b></p> <p>1020.52, 804.47, 1464.75, 909.44, 1186.66, 911.46, 1432.74, 1187.60, 1244.63, 972.46, 897.40, 1115.58, 829.43</p> <p><b>ATP synthase beta subunit Q8wje9, cover24%, error36ppm</b></p> <p>1260.69, 810.42, 1044.58, 974.54, 1327.69, 1432.74, 1020.56, 1988.00, 1470.85, 874.44</p>	<p><b>AT4g38970/F19H22-70 Q944g9</b></p> <p>1586.80:RLDSIGLENTEANR 1127.53:TAAYYQQGAR 1198.49:YTGESESEEAK 1451.83:TVVSIPNGPSALAVK 1430.70: LDSIGLENTEANR 1099.63:AKANSLLAQLGK 1290.68: ATPPEQVAAYTLK</p> <p><b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Q9XQP7</b></p> <p>1260.62:FLFCAEALYK 1186.65:DNGLLLHIHR 1088.57: GPPHGIQVER 1020.52:DTDILAAFR 1464.78:TFKGPPHGIQVER 911.46:AMHAVIDR</p>
6	U6658C G	Q9069CG	<p><b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Q95cb1, cover. 28%, error23ppm</b></p> <p>1020.52, 1467.73, 1501.84, 961.47, 1826.74, 913.40, 1464.71, 815.41, 909.44, 1186.66, 911.46, 897.40, 1115.58</p>	<p><b>Chlorophyll a/b binding protein Q8w159, (Q9SHR7)</b></p> <p>1324.66:NRELEVIHCR 1918.98:WAMLGALGCVFPELLAR 1902.98:WAMLGALGCVFPELLAR 1054.52:ELEVIHCR 982.49 :FGEAVWFK 2025.01:LAMFSMFGFFVQAVTGK 1790.85:TVKPTGPSGSPWYGSDR (1630.81):STPQSIWYGPDPRK (1251:66):NRELEVIHSR</p>

7	U6657C G	Q9070CG	<b>Putative carbonic anhydrase, chloroplast Q8rww2, cover48%, error 28ppm</b> 1467.72, 1234.51, 2042.00, 1244.62, 1260.62, 1659.90, 1651.87, 700.39, 1724.77, 1781.79, 1905.04, 947.44 <b>Ribulose-1.5-bisphosphate carboxylase/oxygenase Q96090, cover.25%, error 29ppm</b> 1020.52, 790.42, 1260.62, 1496.70, 1274.72, 829.43, 701.34, 961.47, 1464.71, 1186.66, 911.46, 1115.58	<b>PSI type III chlorophyll a/b binding protein Q8Icr7</b> 1550.73:RLQDWYNPGSMGK 1644.89:FAMLGAAGAIPEILGK 1394.62:LQDWYNPGSMGK 1290.67:WLAYGEIINGR 1410.62:LQDWYNPGSMGK(Ox) 996.52:QYFLGLEK <b>Carbonic anhydrase, chloroplast Aam10220</b> 1724.86:EKYETNPALYGELAK 1905.03:EAVNVSLANLLTYPFVR 1659.89:YGGVGAIEYAVLHLK 1250.50:XMVFACSDRSR 1260.61:NIANMVPPFDK 2384.09:GLMSFPLDGNNSTDFIEDWVK
---	-------------	---------	---	--

## Literaturverzeichnis

- ADESSI, C., MIEGE, C., ALBRIEUX, C. & RABILLOUD, T. (1997) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins: A current challenge for immobilized pH gradients. *Electrophoresis* 18, 127-135
- ARNON, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24, 1-5
- BALMER, Y., KOLLER, A., DEL VAL, G., MANIERI, W., SCHURMANN, P. & BUCHANAN, B. B. (2003) Proteomics gives insight into the regulatory function of chloroplast thioredoxins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 370-375
- BAUER, B. E., WOLFGER, H. & KUCHLER, K. (1999) Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance. *Biochim. Biophys. Acta* 1461, 217-236
- BEKRI, S., KISPAL, G., LANGE, H., FITZSIMONS, E., TOLMIE, J., ILL, R. & BISHOP, D. F. (2000) Human ABC7 transporter: gene structure and mutation causing X-linked sideroblastic anemia with ataxia with disruption of cytosolic iron-sulfur protein maturation. *Blood* 96, 3256-3264
- BERKELMANN, T. & STENSTEDT, T. (1998) 2-D electrophoresis using immobilized pH gradients: Principles and methods. Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ
- BERKEMEYER, M., SCHEIBE, R. & OCHERETINA, O. (1998) A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 273, 27927-27933
- BJELLQVIST, B., EK, K., RIGETTI, P. G., GIANAZZA, E., GÖRG, A., WESTERMEIER, A. & POSTEL, W. (1982) Isoelectric focussing in immobilized pH gradients: Principle, methodology, and some applications. *J. Biochem. Biophys. Meth.* 6, 316-339
- BORNER, G. H. H., LILLEY, K. S., STEVENS, T. J. & DUPREE, P. (2003) Identification of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in *Arabidopsis*. A proteomic and genomic analysis. *Plant Physiol.* 132, 568-577
- BOUNTRY, M., FABER, A.-M., CHARBONNIER, M. & BRIQUET, M. (1984) Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products: Detection of variant polypeptides associated with cytoplasmic male sterility. *Plant Mol. Biol.* 3, 445-452

- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254
- CAMMACK, R. (1992) Iron-sulfur clusters in enzymes: Themes and variations. In *Iron-sulfur proteins*, R. Cammack, ed. (San Diego: Academic Press), 281-322
- CANNON, F., RIEDEL, G. & AUSUBEL, F. (1977) Recombinant plasmid that carries part of the nitrogen fixation (*nif*) gene cluster of *Klebsiella pneumoniae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 2963-2967
- CHAUMONT, F., DE CASTRO SILVA FILHO, M., THOMAS, D., LETERME, S. & BOUTRY, M. (1994) Truncated presequences of mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase beta subunit from *Nicotiana plumbaginifolia* transport CAT and GUS proteins into mitochondria of transgenic tobacco. *Plant Mol. Biol.* 24: 631-641
- CHOE, L. H. & LEE, K. H. (2000) A comparison of three commercially available isoelectric focusing units for proteome analysis: The multiphor, the IPGphor and the Protean IEF cell. *Electrophoresis* 21, 993-1000
- CHORY, J., CHATTERJEE, M., COOK, R. K., ELICH, T., FRANKHAUSER, C., LI, J., NAGPAL, P., NEFF, M., PEPPER, A., POOLE, D., REED, J. & VITART, V. (1996) From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93,12066-12071
- CLOUSE, S. D. (2001) Integration of light and brassinosteroid signals in etiolated seedling growth. *Trends Plant. Sci.* 6, 443-445
- COLAS DES FRANCS, C., THIELLEMENT, H. & DE VIENNE, D. (1985) Analysis of leaf proteins by two-dimensional gel electrophoresis. *Plant. Physiol* 78, 178-182
- DAY, D. A., NEUBURGER, M. & DOUCE, R. (1985) Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from pea leaves. *Austr. J. Plant Physiol.* 12: 219-228
- DEAN, D. R., BOLIN, J. T. & ZHENG, L. (1993) Nitrogenase metalloclusters: structures, organization, and synthesis. *J. Bacteriol.* 175, 6737-6744
- DOUCE, R., BOURGUIGNON, J., BROUQUISSE, R. & NEUBURGER, M. (1987) Isolation of plant mitochondria: general principles and criteria of integrity. *Meth. Enzymol.* 148, 403-415
- DUNCAN, R. & HERSHEY, J. W. (1984) Evaluation of isoelectric focusing running conditions during two-dimensional isoelectric focusing/sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis: variation of gel patterns with changing conditions and optimized isoelectric focusing conditions. *Anal. Biochem.* 138, 144-55

- FERNANDEZ-PATRON, C., CASTELLANOS-SERRA, L. & RODRIGUEZ, P. (1992) Reverse staining of sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels by imidazole-zinc salts: Sensitive detection of unmodified proteins. *Bio. Techniques* 12, 564-573
- FERRO, M. ET AL. (2000) Organic solvent extraction as a versatile procedure to identify hydrophobic chloroplast membrane proteins. *Electrophoresis* 21, 3517-26
- FERRO, M., SALVI, D., BRUGIERE, S., MIRAS, S., KOWALSKI, S., LOUWAGIE, M., GARIN, J., JOYARD, J. & ROLLAND, N. (2003) Proteomics of the Chloroplast Envelope Membranes from *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell Proteomics* 5,325-345
- FEY, S. J. & LARSEN, P. M. (2001) 2D or not 2D. *Current Opinion in Chemical Biology* 5, 26-33
- FICHMANN, J. (1999) Advantages of immobilized pH gradients. *Methods Mol. Biol.* 112, 173-174
- GALLARDO, K., JOB, C., GROOT, S. P. C., PUYPE, M., DEMOL, H., VANDEKERCKHOVE, J. & JOB, D. (2002) Proteomics of *Arabidopsis* Seed Germination. A Comparative Study of Wild-Type and Gibberellin-Deficient Seeds. *Plant Cell* 14, 211-236
- GEGENHEIMER, P. (1990) Preparation of extracts from plants. *Meth. Enzymol.* 182, 174-193
- GÖRG, A., OBERMAIER, C., BOGUTH, G, HARDER, A., SCHEIBE, B., WILDGRUBER, R. & WEISS, W. (2000) The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 21, 1037-1053
- GÖRG, A., POSTEL, W., GUNTHER, S. & WESER, J. (1985) Improved horizontal two-dimensional electrophoresis with hybrid isoelectric focussing in immobilized pH gradients in the first dimension and laying-on transfer to the second dimension. *Electrophoresis* 6, 599-604
- GÖRG, A., POSTEL, W., GUNTHER, S., WESER, J., STRAHLER, J. R., HANASH, S. M., SOMERLOT, L. & KUICK, R. (1988) Approach to stationary two-dimensional pattern: influence of focusing time and immobiline/carrier ampholytes concentrations. *Electrophoresis* 9, 37-46
- GYGI, S. P., CORTHALS, G. L., ZHANG, Y., ROCHON, Y. & AEBERSOLD, R. (2000) Evaluation of two-dimensional gel electrophoresis-based proteome analysis technology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 9390-9395
- HAMASUR, B., BIRGERSSON, U., ERIKSSON, A. C. & GLASER, E. (1990) Large-scale purification procedure of spinach leaf mitochondria -isolation and immunological studies of the F<sub>1</sub>-ATPase. *Plant Physiol.* 78, 367-373

- HATZIMANIKATIS, V., CHOE, L. H. & LEE, K. H. (1999) Proteomics: theoretical and experimental considerations. *Biotechnol. Prog.* 15, 312-318
- HAUSMANN, N., EUBEL, H. & PAPENBROCK, J. (2003B) Investigation of the Fe-S cluster biosynthesis in higher plants. Proceedings of the 5<sup>th</sup> Workshop on Sulfur Transport & Assimilation. Backhuys Publ., The Hague, in Druck
- HAUSMANN, N., WERHAHN, W., HUCHZERMAYER, B., BRAUN, H.-P. & PAPENBROCK, J. (2003A) How to document the purity of mitochondria prepared from green tissue of tobacco, pea and *Arabidopsis thaliana*. *Phyton*, 43, 215-229
- HEAZLEWOOD, J. L., HOWELL, A. & MILLAR, A. H. (2003) Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1604, 159-169
- HELD, H. W. (1999) *Pflanzenbiochemie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- HERALD, V. L., HEAZLEWOOD, J. L. & MILLAR, A. H. (2003) Proteomic identification of divalent metal cation binding proteins in plant mitochondria. *FEBS Lett.* 537, 96-100
- HERBERT, B. (2001) Reduction and alkylation of proteins in preparation for two-dimensional map analysis: Why, when, and how? *Electrophoresis* 22, 2046-2057
- HERBERT, B. R. (1999) Advances in protein solubilisation for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis* 20, 660-663
- HERBERT, B. R., HARRY, J. L., PACKER, N. H., GOOLEY, A. A., PEDERSEN, S. K. & WILLIAMS, K. L. (2001) What place for polyacrylamide in proteomics? *Trends Biotechnol.* 19, 3-9
- HERBERT, B. R., MOLLOY, M. P., GOOLEY, A. A., WALSH, B. J., BRYSON, W. G. & WILLIAMS, K. L. (1998) Improved solubility in two-dimensional electrophoresis using tributyl phosphine as reducing agent. *Electrophoresis* 18, 845-851
- HERRMANN, R. G., WESTHOFF, P. & LINK, G. (1992) Biogenesis of plastids in higher plants. In: HERRMANN, R. G. (Ed.), *Plant gene research: cell organelles*, Springer Verlag, Wien, 275-249
- HEUKESHOVEN, J. & DERNICK, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in Phast System Development Unit I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9, 28-32
- HIGGINS, C. F. (1992) ABC transporters: From microorganism to man. *Annu. Rev. Cell Biol.* 8, 67-113

- HIPPLER, M., KLEIN, J., FINK, A., ALLINGER, T. & HOERTH, P. (2001) Towards functional proteomics of membrane protein complexes: analysis of thylakoid membranes from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J.* 28, 595-606
- HOUEN, G., BRUUN, L. & BARKHOLT, V. (1997) Combined immunostaining and Coomassie Brilliant Blue staining of polyvinylidene difluoride membranes without organic solvent. *Electrophoresis* 18, 701-705
- IMSANDE, J. (1999) Iron-sulfur clusters: Formation, perturbation, and physiological functions. *Plant. Physiol. Biochem.* 37, 87-97
- JACOBSON, M. R., CASH, V. L., WEISS, M. C., LAIRD, N. F., NEWTON, W. E. & DEAN, D. R. (1989) Biochemical and genetic analysis of the *nifUSVWZM* cluster from *Azotobacter vinelandii*. *Mol. Gen. Genet.* 219, 49-57
- JÄNSCH, L., KRUF, V., SCHMITZ, U. K. & BRAUN, H.-P. (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.* 9, 357-368
- JASCHKOWITZ, K. & SEIDLER, A. (2000) Role of a NifS-like protein from cyanobacterium *Synechocystis* PCC 6803 in the maturation of FeS proteins. *Biochemistry* 39, 3416-3423
- JENSEN, R. G. & BASSHAM, J. A. (1966) Photosynthesis by isolated Chloroplasts. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 56, 1095-1101
- JOHNSON, M. K. (1998) Iron-sulfur proteins: new roles for old clusters. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 173-181
- JUNG, E., HELLER, M., SANCHEZ, J.C. & HOCHSTRASSER, D.F. (2000) Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes. *Electrophoresis* 21, 3369-3377
- KIESELBACH, T., BYSTEDT, M., HYND, P., ROBINSON, C. & SCHRÖDER, W. P. (2000) A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* chloroplast thylakoid lumen. *FEBS Lett.* 480, 271-276
- KIRK, J. T. O. & TILNEY-BASSETT, R. A. E. (1978) *The Plastids*. Amsterdam: Elsevier/North Holland, Biochemical Press
- KISPAL, G., CSERE, P., PROHL, C. & LILL, R. (1999) The mitochondrial proteins Atm1p and Nifs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *EMBO J.* 18, 3941-3989.
- KLOSE, J. & KOBALZ, U. (1995) Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome. *Electrophoresis* 16, 1034-1059

- KLOSE, J. (1975) Protein mapping by combined isoelectric focussing and electrophoresis of mouse tissues. A novel approach to testing for induced point mutation in mammals. *Humangenetik* 26, 231-243
- KRUFT, V., EUBEL, H., JÄNSCH, L., WERHAHN, W. & BRAUN H.-P. (2001) Proteomic approach to identify novel mitochondrial proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 127, 1694-1710.
- KÜGLER, M., JÄNSCH, L., KRUFT, V., SCHMITZ, U. K. & BRAUN H.-P. (1997) Analysis of the chloroplast protein complexes by Blue-native polyacrylamide gelelectrophoresis. *Photosynth. Res.* 53, 35-44
- KUSHNIR, S., BABIYCHUK, E., STOROZHENKO, S., DAVEY, M. W., PAPENBROCK, J., DE RYCKE, R., ENGLER, G., STEPHAN, U. W., LANGE, H., KISPAL, G., LILL, R. & VAN MONTAGU, M. (2001) Mutation of the mitochondrial ABC transporter *Sta1* leads to dwarfism and chlorosis in the *Arabidopsis* mutant *starik*. *Plant Cell* 13, 89-100
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685
- LAND, T. & ROUAULT, T. A. (1998) Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Mol. Cell* 2, 807-815
- LANG, T. & KESSLER, D. (1999) Evidence for cysteine persulfide as reaction product of l-cyst(e)ine C-S-lyase (C-DES) from *Synechocystis*. *J. Biol. Chem.* 274, 189-195
- LEEGOOD, R. C. & MALKIN, R. (1986) Isolation of sub-cellular photosynthetic systems. In: HIPKINS, M. F. & BAKER, N. R., eds., *Photosynthetic energy transduction*, 9-26
- LEIBRECHT, I. & KESSLER, D. (1997). A novel L-cysteine/cystine C-S-lyase directing [2Fe-2S] cluster formation of *Synechocystis* ferredoxin. *J. Biol. Chem.* 272, 10442-10447
- LEIGHTON, J., & SCHATZ, G. (1995) An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO J.* 14, 188-195
- LEON, S., TOURAINÉ, B., BRIAT, J. F. & LOBREAUX, S. (2002) The *AtNFS2* gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a NifS-like plastidial cysteine desulphurase. *Biochem. J.* 366, 557-564
- LEON, S., TOURAINÉ, B., RIBOT, C., BRIAT, J. F. & LOBREAUX, S. (2003) Iron-sulphur cluster assembly in plants: distinct NFU proteins in mitochondria and plastids from *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* 371, 823-830
- LICHTENTHALER, H. K. (1987) Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Meth. Enzymol.* 148, 350-382

- LILL, R., DEKERT, K., KAUT, A., LANGE, H., PELZER, W., PROHL, C. & KISPAL, G. (1999) The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Biol. Chem.* 380, 1157-1166
- LILL, R. & KISPAL, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *TIBS* 25, 352-356
- LOTTSPEICH, F. & ZORBAS, H. (ed. 1998) *Bioanalytik*. Akademischer Verlag GmbH Heidelberg, Berlin
- LOTTSPEICH, F. (1999) Proteome analysis: A pathway to the functional analysis of proteins. *Angew. Chem. Int. Ed.* 38, 2476-2492
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275
- MAHON, P. & DUPREE, D. (2001) Quantitative and reproducible two-dimensional gel analysis using Phoretix 2D Full. *Electrophoresis* 22, 2075-2085
- MATSUI, N. M., SMITH-BECKERMAN, D. M. & EPSTEIN, L. B. (1999A) Staining of preparative 2-D gels. Coomassie blue and imidazole-zinc negative staining. *Methods Mol. Biol.* 112, 307-311
- MATSUI, N. M., SMITH-BECKERMAN, D. M., FICHMANN, J. & EPSTEIN, L. B. (1999B) Running preparative carrier ampholyte and immobilized pH gradient IEF gels for 2-D. *Meth. Mol. Biol.* 112, 211-219
- MAY, M. J. & LEAVER, C. (1993) Oxidative stimulation of glutathione synthesis in *Arabidopsis thaliana* suspensions cultures. *Plant Physiol.* 103, 621-627
- MÉCHIN, V., CONSOLI, L., LE GUILLOUX, M. & DAMERVAL, C. (2003) An efficient solubilization buffer for plant proteomics focused in immobilized pH gradients. *Proteomics* 3, 1299-1302
- MEYER, H. E. (2003) Proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 945
- MILLAR, A. H., LIDDELL, A. & LEAVER, C. J. (2001A) Isolation and subfractionation of mitochondria from plants. *Meth. Cell Biol.* 65, 53-74
- MILLAR, A. H., SWEETLOVE, L. J., GIEGE, P. & LEAVER, C. J. (2001B) Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 127, 1711-1727
- MILLAR, A. H. & HEAZLEWOOD, J. L. (2003) Genomic and proteomic analysis of mitochondrial carrier proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 131, 443-453
- MOLLOY, M. P. (2000) Two-dimensional electrophoresis of membrane proteins using immobilized pH gradients. *Anal. Biochem.* 280, 1-10

- MOORE, A. L., FRICAUD, A.-C., WALTERS, A. J. & WHITEHOUSE, D. G. (1993) Isolation and purification of functionally intact mitochondria from plant cells. *Meth. Mol. Biol.* 19, 133-139
- MÜHLENHOFF, U. & LILL, R. (2000) Biogenesis of iron-sulfur proteins in eukaryotes: a novel task of mitochondria that is inherited from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* 1459, 370-382
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiol.* 15, 473-497
- NAKAI, Y., YOSHIHARA, Y., HAYASHI, H., & KAGAMIYAMA, H. (1998) cDNA cloning and characterization of mouse nifS-like protein, m-Nfs1: mitochondrial localization of eukaryotic NifS-like proteins. *FEBS Lett.* 433,143-148
- NEUBURGER, M., JOURNET, E. P., BLIGNY, R., CARDE, J. P. & DOUCE, R. (1982) Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of percoll. *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 312-323
- NEUHOFF, V., STAMM, R. & EIBL, H. (1985) Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: a systematic analysis. *Elektrophoresis* 6, 427-448
- NEUHOFF, V., AROLD, N., TAUBE, D. & EHRHARDT, W. (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262
- O'FARRELL, P. H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 4007-4021
- ONG, S. E. & PANDEY, A. (2001) An evaluation of the use of two-dimensional gel electrophoresis in proteomics. *Biomol. Eng.* 18, 195-205
- ORTIZ, M. L., CALERO, M., FERNANDEZ-PATRON, C., PATRON, C. F., CASTELLANOS, L. & MENDEZ, E. (1992) Imidazole-SDS-Zn reverse staining of proteins in gels containing or not SDS and microsequence of individual unmodified electroblotted proteins. *FEBS Lett.* 296, 300-304
- PAPENBROCK, J., MISHRA, S., MOCK, H.-P., KRUSE, E., SCHMIDT, E. K., PETERSMANN, A., BRAUN, H.-P. & GRIMM, B. (2001) Impaired expression of the plastidic ferrochelatase by antisense RNA synthesis leads to a necrotic phenotype of transformed tobacco plants. *Plant J.* 28, 41-50

- PATTON, W. F. & BEECHEM, J. M. (2002) Rainbow's end: the quest for multiplexed fluorescence quantitative analysis in proteomics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 6, 63-69
- PATTON, W. F. (2002) Detection technologies in proteome analysis. *J. Chromat. B* 771, 3-31
- PELTIER, J. B., FRISO, G., KALUME, D. E., ROEPSTORFF, P., NILSSON, F., ADAMSKA, I. & VAN WIJK, K. J. (2000) Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins. *Plant Cell* 12, 319-341
- PELTIER, J. B., EMANUELSSON, O., KALUME, D. E., YTTERBERG, J., FRISO, G., RUDELLA, A., LIBERLES, D. A., SODERBERG, L., ROEPSTORFF, P., VON HEIJNE, G. & VAN WIJK, K. J. (2002) Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction. *Plant Cell* 14, 211-236
- PENG, J. & GYGI, S. P. (2001) Proteomics: the move to mixtures. *J Mass Spectrom* 36, 1083-91
- PERTOFT, H. (2000) Fractionation of cells and subcellular particles with Percoll. *J. Biochem. Meth.* 44, 1-30
- PETERS, J. W., FISHER, K. & DEAN, D. R. (1995) Nitrogenase structure and function: a biochemical-genetic perspective. *Annu. Rev. Microbiol.* 49, 335-366
- PILON-SMITS, E. A., GARIFULLINA, G. F., ABDEL-GHANY, S., KATO, S., MIHARA, H., HALE, K. L., BURKHEAD, J. L., ESAKI, N., KURIHARA, T. & PILON, M. (2002) Characterization of a NifS-like chloroplast protein from *Arabidopsis*. Implications for its role in sulfur and selenium metabolism. *Plant Physiol.* 130, 1309-1318
- PRIME, T. A., SHERRIER, D. J., MAHON, P., PACKMAN, L. C. & DUPREE, P. (2000) A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*. *Electrophoresis* 21, 3488-3499
- PYKE, K. A. (1999) Plastid division and development. *Plant Cell* 11, 549-556
- RABILLOUD, T., BLISNIK, T., HELLER, M., LUCHE, S., AEBERSOLD, R., LUNARDI, J. & BRAUN-BRETON, C. (1999) Analysis of membrane proteins by two-dimensional electrophoresis: Comparison of the proteins extracted from normal *Plasmodium falciparum*-infected erythrocyte ghosts. *Electrophoresis* 20, 3603-3610
- RABILLOUD, T. (2000) Detecting proteins separated by 2-D gel electrophoresis. *Anal. Chem.* 72, 48-55.
- RABILLOUD, T. (2002) Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: Old, old fashioned, but still climbs up the mountain. *Proteomics* 2, 3-10

- RICHTER, G. (1998) *Stoffwechselfysiologie der Pflanzen*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory Manual*, Ed 2. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- SANTONI, V., DOUMAS, P., ROUQUIE, D., MANSION, M., RABILLOUD, T. & ROSSIGNOL, M. (1999A) Large scale characterization of plant plasma membrane proteins. *Biochimie* 81, 655-661
- SANTONI, V., RABILLOUD, T., DOUMAS, P., ROUQUIÉ, D., MANSION, M., KIEFFER, S., GARIN, J. & ROSSIGNOL, M. (1999B) Towards the recovery of hydrophobic proteins on two-dimensional electrophoresis gels. *Electrophoresis* 20, 705-711
- SANTONI, V., KIEFER, S., DESCLAUX, D., MASSON, F. & RABILLOUD, T. (2000A) Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoresis properties. *Electrophoresis* 21, 3329-3344
- SANTONI, V., MOLLOY, M. & RABILLOUD, T. (2000B) Membrane proteins and proteomics: Un amour impossible? *Electrophoresis* 21, 1054-1070
- SARTO, C., VALSECCHI, C. & MOCARELLI, P. (2002) Renal cell carcinoma: Handling and treatment. *Proteomics* 11, 1627-1629
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamid gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379
- SCHÄGGER, H. & VON JAGOW, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 233-231
- SCHEELE, G. A. (1975) Two-dimensional gel analysis of soluble proteins. Characterization of guinea pig exocrine pancreatic proteins. *J. Biol. Chem.* 250, 5375-5385
- SCHUBERT, M. ET AL. (2002) Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 277, 8354-65
- SEIGNEURIN-BERNY, D., ROLLAND, N., CHAPEL, A., GARIN, J. & JOYARD, J. (1999) Differential extraction of hydrophobic proteins of chloroplast envelope membranes: a subcellular-specific proteomic approach to identify rare intrinsic membrane proteins. *Plant. J.* 19, 217-228
- SICKMANN, A., REINDERS, J., WAGNER, Y., JOPPICH, C., ZAHEDI, R., MEYER, H. E., SCHÖNFISCH, B., PERSCHIL, I., CHACINSKA, A., GUIARD, B., REHLIND, P., PFANNER,

- N. & MEISINGER, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 23, 1-6
- SINGH, P., JÄNSCH, L., BRAUN, H.-P. & SCHMITZ U. K. (2000) Resolution of mitochondrial and chloroplast membrane protein complexes from green leaves of potato on blue-native polyacrylamide gels. *Indian J. Biochem. & Biophys.* 37, 59-66
- STOSCHECK, C. M. (1990) Guide to protein purification. *Meth. Enzymol.* 182, 50-68
- SUCKAU, D., RESEMANN, A., SCHUERENBERG, M., HUFNAGEL, P., FRANZEN, J. & HOLLE, A. (2003) A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics. *Anal. Bioanal. Chem.* 376, 952-965
- SYMONS, G. M. & REID, J. B. (2003) Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta* 216, 422-431
- TAKAHASHI, Y., MITSUI, A., HASE, T. & MATSUBARA, H. (1986) Formation of the iron-sulfur cluster of ferredoxin in isolated chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 2434-2437
- TAKAHASHI, Y., MITSUI, A. & MATSUBARA, H. (1991) Formation of the Fe-S cluster of ferredoxin in lysed spinach chloroplasts. *Plant Physiol.* 95, 97-103
- TAKETANI, S., KAKIMOTO, K., UETA, H., MASAKI, R. & FURUKAWA, T. (2003) Involvement of ABC7 in the biosynthesis of heme in erythroid cells: interaction of ABC7 with ferrochelatase. *Blood* 101, 3274-3280
- TANG, X., NAKATA, Y., LI, H.-O., ZHANG, M., GAO, H., FUJITA, A., SAKATSUME, O., OHTA, T. & YOKAYAMA, K. (1994) Pistil-specific and ethylene-regulated expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase genes in petunia flowers. *Nucl. Acids Res.* 22, 2857-2858
- THE ARABIDOPSIS GENOM INITIATIVE (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796-815
- THIELLEMENT, H., BAHRMANN, N., DAMERVAL, C., PLOMION, C., ROSSIGNOL, M., SANTONI, V., DE VIENNE, D. & ZIVY, M. (1999) Proteomics for genetic and physiological studies in plants. *Electrophoresis* 20, 2013-2026
- TONGE, R., SHAW, J., MIDDLETON, B., ROWLINSON, R., RAYNER, S., YOUNG, J., POGNAN, F., HAWKINS, E., CURRIE, I. & DAVISON, M. (2001) Validation and development of fluorescence two-dimensional differential gel electrophoresis proteomics technology. *Proteomics* 1, 377-396
- UNLU, M., MORGAN, M. E. & MINDEN, J. S. (1997) Difference gel electrophoresis: A single gel method for detecting changes in protein extracts. *Electrophoresis* 18, 2071-2077

- VAN WIJK, K. J. (2001) Challenges and prospects of plant proteomics. *Plant Physiol.* 126, 501-508
- VICKERY, L. E., SILBERG, J. J. & TA, D. T. (1997) Hsc66 and Hsc20, a new heat shock cognate molecular chaperone system from *Escherichia coli*. *Protein Sci.* 6, 1047-1056
- VOSS, T. & HABERL, P. (2000) Observations on the reproducibility and matching efficiency of two-dimensional electrophoresis gels: Consequences for comprehensive data analysis. *Electrophoresis* 21, 3345-3350
- WILKINS, M. R., WILLIAMS, K. L., APPLE, R. D. & HOCHSTRASSER, D.F. (eds.1997) *Proteom research: New frontiers in functional genomics*. Springer Verlag, Berlin
- WILM, M., SHEVCHENKO, A., HOUTHAEVE, T., BREIT, S., SCHWEIGER, L., FOTSIS, T. & MANN, M. (1996) Femtomole sequencing of proteins from polyacrylamide gels by nano-electrospray mass spectrometry. *Nature* 379 (6564), 466-469
- WOLLENBERG, M., BERNDT, C., BILL, E., SCHWENN, J. D. & SEIDLER, A. (2003) A dimer of the FeS cluster biosynthesis protein IscA from cyanobacteria binds a [2Fe2S] cluster between two protomers and transfers it to [2Fe2S] and [4Fe4S] apo proteins. *Eur. J. Biochem.* 270, 1662-1671
- ZABROUSKOV, V., GIACOMELLI, L., VAN WIJK, K. J. & MCLAFFERTY, F. W. (2003) A new approach for plant proteomics: characterization of chloroplast proteins of *Arabidopsis thaliana* by top down mass spectrometry. *Mol. Cell Proteomics* Sep 22, online vorab publiziert
- ZHENG, L., WHITE, R. H., CASH, V. L., JACK, R. F. & DEAN, D. R. (1993) Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2754-2758
- ZHENG, L., CASH, V. L., FLINT, D. H. & DEAN, D. R. (1998) Assembly of iron-sulfur clusters. Identification of an *iscSUA-hscBA-fdx* gene cluster from *Azotobacter vinelandii*. *J. Biol. Chem.* 273, 13264-13272

## Publikationen

1. HAUSMANN, N., WERHAHN, W., HUCHZERMAYER, B., BRAUN, H.P., PAPENBROCK, J. (2003A) How to document the purity of mitochondria prepared from green tissue of tobacco, pea and *Arabidopsis thaliana*. *Phyton*, 43, 215-229
2. HAUSMANN, N., HUBEL, H., PAPENBROCK, J. (2003B) Investigation of the Fe-S cluster biosynthesis in higher plants. Proceedings of the 5<sup>th</sup> Workshop on Sulfur Transport & Assimilation. Backhuys Publ., The Hague, in Druck
3. HAUSMANN, N., LEMAITRE-GUILLIER, C., VAN DORSSELAER, A., PAPENBROCK, J. Comparison of subcellular protein patterns of wild-type and *starik* plants. In Vorbereitung
4. HAUSMANN, N., BALASUBRAMANIAN, R., NIKIFOROVA V., HÖFGEN, R., PAPENBROCK, J. Microarray analysis of the *starik* mutant and correlation with physiological data. In Vorbereitung

# Danke!

Dem Leiter der Arbeitsgruppe Prof. Dr. A. Schmidt danke ich für seine Bereitschaft, jederzeit Fragen zu diskutieren.

PD Dr. J. Papenbrock danke ich für die Überlassung des Themas dieser Arbeit und die Betreuung. Ihre Anleitung und fachliche Diskussion waren mir eine Hilfe.

Ich möchte mich bei Prof. Dr. H. Lehmann bedanken, dass er die Aufgabe als Gutachter übernommen hat, obwohl ich nicht in seiner Arbeitsgruppe tätig war.

Bei Herrn PD Dr. B. Huchzermeyer (Dr. Hu) möchte ich mich für seine wertvollen Anregungen und Hilfestellungen bedanken.

Pamela von Trzebiatowski (P.v.T.) danke ich für ihr Know-how und ganz besonders für die technische Unterstützung bezüglich meiner kleinen Freunde im Keller. Und natürlich danke ich ihr, dass sie dafür sorgt, dass alles so läuft wie es läuft...

Frau Volker, ihr danke ich nicht nur für die technische Unterstützung, sondern auch für ihren moralischen und ganz besonders menschlichen Beistand (...und VOLKER ET AL. wird folgen-ganz sicher).

Imke danke ich für ihre tatkräftige Unterstützung bei 2D-Gelelektrophorese.

Bei Frau Leye, Frau Klunke, Herrn Krüger und der anderen Frau Hausmann möchte ich mich ganz herzlich bedanken. Ohne diese teilweise Wahnsinns-Anzucht von Pflanzen würden in dieser Arbeit leere Seiten klaffen. Und auf meiner Fensterbank wäre sonst auch gähnende Leere...Danke!

Dr. S. Kushnir danke ich für die Überlassung der *starik*-Mutante.

Dr. M. Hawkesford danke ich für die Durchführung der Elementanalyse.

Dr. C. Lemaitre-Guillier danke ich für die Sequenzanalysen.

Für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper danke ich PD Dr. D. Kessler, Dr. A. Seidler, Prof Dr. R. Lill und Prof. Dr. L. E. Vickery.

Dagmar Lewejohann aus der angewandten Genetik danke ich für Durchführung der BN/SDS-PAGE.

Bei Dr. Wolf Werhahn und Holger Eubel aus dem Institut für angewandte Genetik möchte ich mich für die wertvollen Tips bedanken.

Insgesamt danke ich allen MitarbeiterInnen des Instituts für Botanik für ein angenehmes Arbeitsklima und tatkräftige Hilfe.

Ein besonderer Dank gilt meinem "Herrn Niemann": ich danke Dir für die unglaubliche Geduld und Unterstützung.

Eine Hochschulausbildung habe ich nie als etwas Selbstverständliches angesehen. Daher danke ich meiner Mutter ganz besonders, dass sie mir eine so langwierige Ausbildung ermöglicht und mich dabei in allen Lebenslagen unterstützt hat. Danke, dass Du immer da bist, wenn ich Dich brauche. Dir möchte ich diese Arbeit widmen.

Ohne die moralischen Stützen wäre dies mit Sicherheit ein weiteres unvollendetes Werk geworden... Danke!