

Diplomarbeit

Anja Karolewicz

Biogenese chloroplastidärer Proteinkomplexe

**am Beispiel der Gerste
mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese**



Bachelor + Master
Publishing

Anja Karolewicz

Biogenese chloroplastidärer Proteinkomplexe

am Beispiel der Gerste mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese

ISBN: 978-3-86341-532-7

Druck Diplomica® Verlag GmbH, Hamburg, 2011

Zugl. Universität Fridericiana Karlsruhe (TH), Karlsruhe, Deutschland, Diplomarbeit, 2002

Originaltitel der Abschlussarbeit: Biogenese chloroplastidärer Proteinkomplexe am Beispiel der Gerste mit Hilfe der 2-D-Gelelektrophorese

Dieses Werk ist urheberrechtlich geschützt. Die dadurch begründeten Rechte, insbesondere die der Übersetzung, des Nachdrucks, des Vortrags, der Entnahme von Abbildungen und Tabellen, der Funksendung, der Mikroverfilmung oder der Vervielfältigung auf anderen Wegen und der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen, bleiben, auch bei nur auszugsweiser Verwertung, vorbehalten. Eine Vervielfältigung dieses Werkes oder von Teilen dieses Werkes ist auch im Einzelfall nur in den Grenzen der gesetzlichen Bestimmungen des Urheberrechtsgesetzes der Bundesrepublik Deutschland in der jeweils geltenden Fassung zulässig. Sie ist grundsätzlich vergütungspflichtig. Zuwiderhandlungen unterliegen den Strafbestimmungen des Urheberrechtes.

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in diesem Werk berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, dass solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Die Informationen in diesem Werk wurden mit Sorgfalt erarbeitet. Dennoch können Fehler nicht vollständig ausgeschlossen werden, und die Diplomarbeiten Agentur, die Autoren oder Übersetzer übernehmen keine juristische Verantwortung oder irgendeine Haftung für evtl. verbliebene fehlerhafte Angaben und deren Folgen.

© Diplomica Verlag GmbH

<http://www.diplom.de>, Hamburg 2011

Printed in Germany

Danksagung

Danken möchte ich besonders Prof. Dr. Hans-Peter Braun, welcher mich hervorragend betreute und immer Zeit für mich hatte.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Claus Buschmann, welcher die Aufgabe des Korreferenten übernahm.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	9
1.2	Chloroplastidäre Proteinkomplexe.....	12
1.3	Grundlagen zur Analyse chloroplastidärer Proteinkomplexe	14
1.4	Zielsetzung	17
2	Material und Methoden	19
2.1	Material.....	19
2.1.1	Chemikalien.....	19
2.1.2	relevante Geräte	19
2.1.3	Versuchsorganismus.....	19
2.2	Methoden.....	20
2.2.1	Pflanzenanzucht	20
2.2.2	Belichtung.....	20
2.2.3	Chloroplasten- bzw. Etioplastenisolierung.....	20
2.2.4	Mitochondrienisolierung	21
2.2.5	BN-PAGE	23
2.2.6	Tricin-SDS-PAGE als zweite Geldimension für BN-Gele.....	29
2.2.7	Coomassie-colloidal Färbung von Proteingelen:	32
2.2.8	Auswertung und Identifizierung.....	32
3	Ergebnisse	33
3.1	Präparation von Organellen aus ergrünender Gerste	33
3.2	Zweidimensionale Auftrennung plastidärer Proteinkomplexe mittels BN-/ Tricin-SDS-PAGE.....	34
3.3	Identifikation der Proteinkomplexe und deren Untereinheiten	34
3.4	Kinetik beim Auf- und Abbau von Proteinkomplexen bei der Transformation von Etioplasten in Chloroplasten	50

4	Diskussion.....	55
4.1	Plastidenisolierung.....	55
4.2	Proteinfärbung mit Coomassie Blue.....	56
4.3	Vergleich der Ergebnisse mit der Literatur.....	57
4.3.1	Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen.....	57
4.3.2	Fazit.....	60
4.4	Vorteile der BN-PAGE gegenüber vergleichbarer Technik.....	61
5	Zusammenfassung.....	62
6	Literatur.....	65
7	Anhang.....	68
7.1	Abkürzungen.....	68
7.2	Glossar.....	70

1 Einleitung

Pflanzliche Organismen sind aus einer großen Zahl der verschiedensten organischen Verbindungen aufgebaut. Sie sind in der Lage, den für die Synthese dieser Verbindungen benötigten Kohlenstoff durch Fixierung von Kohlendioxid zu gewinnen. Die Energie hierzu beziehen sie aus der elektromagnetischen Strahlung der Sonne im Bereich von etwa 400nm - 700nm. Der entsprechende Prozess wird als Photosynthese bezeichnet, welche bei eukaryotischen Zellen in den Chloroplasten stattfindet. Die pflanzlichen Organismen sind zur Produktion organischer Substanzen aus rein anorganischen Bausteinen befähigt. Die gesamte auf der Erde vorhandene organische Substanz wird durch diesen Prozess gebildet.

Chloroplasten als Photosyntheseorganellen

Die Chloroplasten sind membranreiche Organellen in Zellen von Algen, Moosen, Farnen und höheren Pflanzen. Sie können in Form und Größe variieren, erscheinen aber typischerweise als 4 bis 10µm lange Ellipsoide mit einer Dicke von etwa 1 µm, von denen es pro Zelle zwischen 1-1000 gibt. Abbildung 1 zeigt eine elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gersten-Chloroplasten.

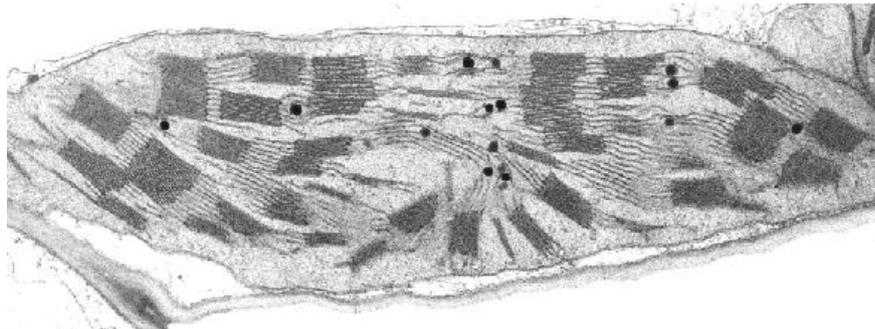


Abbildung 1: Dünnschnitt durch einen Chloroplasten der Gerste. Die Form und Anordnung der Grana ist für normal ausgebildete Chloroplasten typisch. Die dunklen Kreise im Bild sind sog. Plastoglobuli. Grana (Thylakoidstapel) können bis zu 25 Thylakoide enthalten [35].

Chloroplasten haben eine äußere Membran, welche durch den Intermembranraum von der inneren Membran getrennt ist. Beide Membranen zusammen werden als Envelope bezeichnet. Die innere Membran umschließt das Stroma, eine konzentrierte Lösung von Enzymen, die zudem DNA, RNA sowie Ribosomen enthält. Letztere sind an der Synthese verschiedener Chloroplastenproteine beteiligt. Das Stroma umgibt seinerseits ein drittes Kompartiment, das Thylakoid. Thylakoide entstehen durch Einstülpungen und anschließende Abschnürungen der inneren Membran und werden in Grana- und Stromathylakoide (gestapelte und nicht gestapelte Bereiche) eingeteilt. Ein Chloroplast enthält etwa 10-100 Granastapel. Diese bestehen aus Lipiden und Proteinen, wobei der Proteinanteil über 50% liegt [23]. Die Proteinkomplexe liegen der Membran auf oder sind in sie eingebettet. Chlorophyll und andere Photosynthesepigmente sind locker an Proteinkomplexe gebunden.

Neben der Thylakoidmembran können sich noch Plastoglobuli und Stärkekörner im Stroma befinden. Die beiden Envelope-Membranen haben einen Abstand von ca. 3nm zueinander. Die äußere Membran ist relativ durchlässig und besteht aus einer Doppellage von Phospholipid- Molekülen und Glycolipiden, in die an manchen Stellen auch Proteine

eingebaut sind. Der Anteil der Proteine ist jedoch viel niedriger und der molekulare Aufbau viel einfacher als bei der inneren Membran. Diese ist die eigentliche selektive Barriere, die darüber entscheidet, welche Stoffe in die Chloroplasten aufgenommen werden und welche diese verlassen können. In der Pflanze kommen mehrere Arten von Plastiden vor, welche aus den Proplastiden hervorgehen. In Geweben, welche der Photosynthese dienen sollen, werden sie unter Lichteinfluss zu Chloroplasten. In Abbildung 2 ist diese Entwicklung dargestellt.

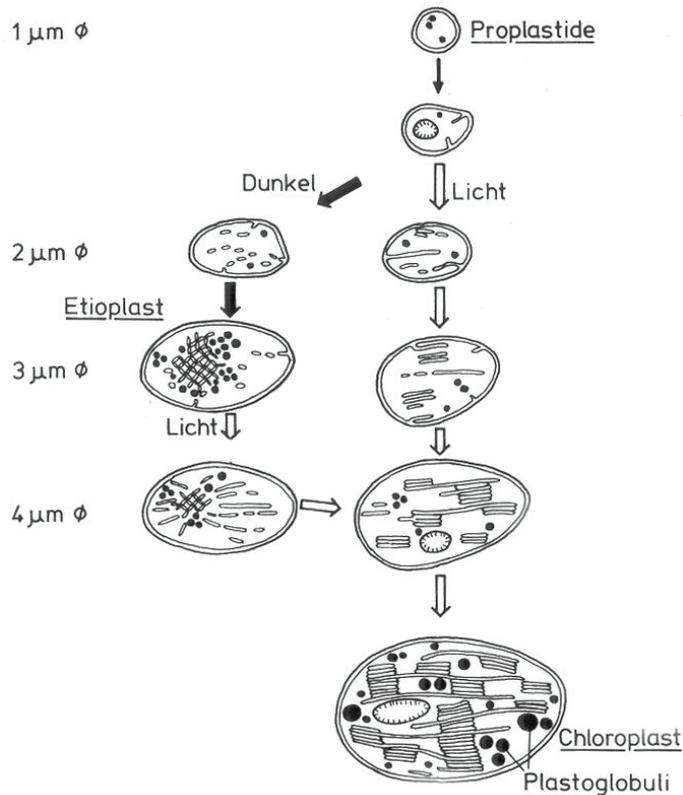


Abbildung 2: Entwicklung eines Proplastiden in einen Etioplasten bzw. Chloroplasten [21], verändert.

Lässt man Keimlinge im Dunkeln wachsen, so bilden sich stattdessen Etioplasten, welche eine andere Struktur als die Chloroplasten aufweisen. An Stelle der Thylakoide entsteht ein gitterartiger Prolamellarkörper, welcher hauptsächlich aus einem protochlorophyllidhaltigen Proteinkomplex besteht. Die zahlreichen Plastoglobuli dienen als Lipidspeicher [21]. Bei Belichtung werden aus den Plastoglobuli und dem Prolamellarkörper die photochemisch aktiven Thylakoide aufgebaut und Protochlorophyllid, bzw. Protochlorophyll wird in Chlorophyll umgewandelt. Innerhalb weniger Minuten nach Beginn der Belichtung setzt begrenzt die Photosyntheseaktivität ein [20]. Für die vollständige Transformation werden allerdings einige Stunden benötigt.