
Identifizierung und Charakterisierung von AFG1L1

einer dual-lokalisierten, Calmodulin-bindenden
AAA⁺-ATPase aus *A. thaliana*



Dissertation der Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Johanna Bussemer

München, 18.Dezember 2008

Dissertation eingereicht am: 18. Dezember 2008

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Februar 2009

Erstgutachter: Prof. Dr. U. Vothknecht

Zweitgutachter: Prof. Dr. J. Nickelsen

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, dass die vorliegende Dissertation von mir selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt wurde.

Erklärung

Diese Dissertation wurde keiner weiteren Prüfungskommission weder in Teilen noch als Ganzes vorgelegt. Ich habe nicht versucht, anderweitig eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

München, den 18. Dezember 2008

Johanna Bussemer

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1 Einleitung | 1 |
| 1.1 Proteintransport in Mitochondrien und Chloroplasten | 1 |
| 1.1.1 Dualer Proteinimport in Mitochondrien und Chloroplasten | 3 |
| 1.2 AAA ⁺ -ATPasen | 4 |
| 1.3 Das Calciumsignalnetzwerk der Zelle | 6 |
| 2 Material | 8 |
| 2.1 Chemikalien und Saatgut | 8 |
| 2.2 Enzyme, Kits, Vektoren und Oligonukleotide | 8 |
| 2.3 Bakterienstämme und Medien | 9 |
| 2.4 Membranen, Größenmarker, Säulenmaterial | 9 |
| 2.5 Antiseren | 10 |
| 3 Methoden | 11 |
| 3.1 Molekularbiologische Methoden | 11 |
| 3.1.1 Standardmethoden | 11 |
| 3.1.2 DNA-Gelelektrophorese | 11 |
| 3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion und Klonierungsstrategie | 11 |
| 3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i> | 12 |
| 3.2 Biochemische Methoden | 12 |
| 3.2.1 SDS-PAGE | 12 |
| 3.2.2 Coomassie-Färbung | 13 |
| 3.2.3 Silberfärbung | 13 |
| 3.2.4 Western Blot und Immundekoration von Proteinen | 13 |
| 3.2.5 Proteinbestimmung | 14 |
| 3.3 Zellbiologische Methoden | 14 |
| 3.3.1 Isolierung intakter Chloroplasten aus <i>A. thaliana</i> | 14 |
| 3.3.2 Fraktionierung von <i>A. thaliana</i> Chloroplasten | 15 |
| 3.3.3 Isolierung der extrinsischen Thylakoidproteinfraktion von <i>A. thaliana</i> | 15 |
| 3.3.4 Isolierung von Chloroplasten aus <i>P. sativum</i> | 16 |
| 3.3.5 Isolierung von Mitochondrien aus <i>P. sativum</i> | 16 |
| 3.3.6 Isolierung von <i>N. tabacum</i> Protoplasten und transiente Transformation | 17 |
| 3.4 Heterologe Expression rekombinanter Proteine | 18 |
| 3.5 Chromatographische Methoden | 18 |
| 3.5.1 Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose | 18 |
| 3.5.2 Affinitätschromatographie an Microcystin-Agarose | 18 |
| 3.5.3 Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Agarose | 19 |
| 3.5.4 Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose | 19 |
| 3.5.5 Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose | 20 |
| 3.6 <i>In vitro</i> Transkription | 20 |

| | |
|--|-----------|
| 3.7 <i>In vitro</i> Translation | 20 |
| 3.8 <i>In vitro</i> Importexperimente in isolierte Chloroplasten | 21 |
| 3.8.1 <i>In vitro</i> Import in Chloroplasten | 21 |
| 3.8.2 Proteasebehandlung von Chloroplasten | 21 |
| 3.8.3 Inhibierung des Proteinimportes durch Ophiobolin A | 22 |
| 3.8.4 Konkurrenz des Proteinimportes mit pSSU | 22 |
| 3.8.5 Fraktionierung von Chloroplasten nach dem Import | 22 |
| 3.9 <i>In vitro</i> Importexperimente in isolierte Mitochondrien | 22 |
| 3.9.1 <i>In vitro</i> Import in Mitochondrien | 22 |
| 3.9.2 Proteasebehandlung von Mitochondrien | 23 |
| 3.9.3 Inhibierung des Proteinimportes durch Valinomycin | 23 |
| 3.9.4 Konkurrenz des Proteinimportes mit pF ₁ β | 23 |
| 3.9.5 Fraktionierung von Mitochondrien nach dem Import | 23 |
| 3.10 <i>In vitro</i> dualer Import in Chloroplasten und Mitochondrien | 24 |
| 3.11 Autoradiographie | 24 |
| 3.12 Quervernetzungsexperimente mit rekombinantem AFG1L1 | 25 |
| 3.13 Co-Immunopräzipitation | 25 |
| 3.14 Computeranalyse | 26 |
| 3.15 Fluoreszenzmikroskopie | 27 |
| 4 Ergebnisse | 28 |
| 4.1 Isolierung Calmodulin-bindender Proteine durch Affinitätschromatographie | 28 |
| 4.1.2 Charakterisierung der durch Affinitätschromatographie identifizierten Calmodulin-bindenden Proteine mittels GFP-Fusion | 30 |
| 4.2. Charakterisierung von AFG1L1 | 33 |
| 4.2.1 Sekundärstrukturanalyse von AFG1L1 | 33 |
| 4.2.2 Untersuchung der Sublokalisierung von AFG1L1 mittels Vorhersageprogrammen | 38 |
| 4.3 Import von pAFG1L1 in Chloroplasten | 40 |
| 4.3.1 Zeitabhängiger Import von pAFG1L1 | 40 |
| 4.3.2 Inhibierung des Importes von pAFG1L1 mit Ophiobolin A | 42 |
| 4.3.3 Konkurrenz des Importes von pAFG1L1 mit pSSU | 43 |
| 4.3.4 Sublokalisierung von mAFG1L1 in Chloroplasten | 44 |
| 4.4 Import von pAFG1L1 in Mitochondrien | 46 |
| 4.4.1 Zeitabhängiger Import von pAFG1L1 | 46 |
| 4.4.2 Inhibierung des Importes von pAFG1L1 mit Valinomycin | 47 |
| 4.4.3 Konkurrenz des Importes von pAFG1L1 mit pF ₁ β | 49 |
| 4.4.4 Sublokalisierung von mAFG1L1 in Mitochondrien | 50 |
| 4.5 Prozessierung des Signalpeptids und Dualer Import von pAFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien | 52 |
| 4.6 Immunologischer Nachweis von AFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien | 55 |

| | |
|---|------------|
| 4.7 Calmodulin-Bindung von AFG1L1 | 58 |
| 4.7.1 Calmodulin Pull-down Assay | 58 |
| 4.7.2 Quervernetzung von AFG1L1 mit EDC | 59 |
| 4.7.3 Identifizierung und Charakterisierung der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 | 61 |
| 4.8 Untersuchungen zur Komplexbildung von AFG1L1 | 67 |
| 4.9 Identifizierung von Interaktionspartnern von AFG1L1 | 70 |
| 4.10 Das AFG1L1 Homolog AFG1L2 (At4g28070) | 72 |
| 4.10.1 Charakterisierung von AFG1L2 durch Sequenzanalyse | 72 |
| 4.10.2 Charakterisierung der subzellulären Lokalisierung von AFG1L2 durch Vorhersageprogramme und GFP-Fusion | 74 |
| 4.10.3 Charakterisierung der subzellulären Lokalisierung von AFG1L2 durch <i>in vitro</i> Import in Chloroplasten und Mitochondrien | 75 |
| 4.11 Identifizierung von Komponenten des chloroplastidären Vesikeltransportes | 77 |
| 4.11.1 Calmodulin | 77 |
| 4.11.2 Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen | 78 |
| 5 Diskussion | 82 |
| 6 Zusammenfassung | 89 |
| 7 Abstract | 90 |
| 8 Abkürzungen | 91 |
| 9 Literatur | 93 |
| 10 Publikationen | 99 |
| 11 Lebenslauf | 100 |
| 12 Danksagung | 101 |
| 13 Anhang | 102 |

1 Einleitung

Chloroplasten und Mitochondrien haben sich nach der Endosymbiontentheorie aus photosynthetischen Cyanobakterien bzw. α -Proteobakterien entwickelt, die von einer einfachen eukaryotischen Zelle durch Phagozytose aufgenommen wurden (Mereschkowsky, 1905; Margulis, 1970). In beiden Organellen laufen neben der für die Zelle überlebenswichtigen Photosynthese und Atmungskette weitere wichtige metabolische Prozesse ab. Da sich die Funktionen in den Organellen in Abhängigkeit vom Gewebetyp und Entwicklungsstadium der Zelle sowie den Umgebungseigenschaften unterscheiden, müssen sie streng reguliert werden. Eine Koordination zwischen der Funktion der Organellen und den Bedürfnissen der umgebenden Zelle kann beispielsweise durch Abstimmung der Proteinzusammensetzung in den Organellen erfolgen, etwa durch Anpassung der Synthese und des Imports von kern-kodierten Chloroplasten- und Mitochondrienproteinen. Darüber hinaus können regulatorische Proteine in unterschiedlichen Isoformen exprimiert werden. Auf kurzfristige Änderungen hingegen kann über das Signalnetzwerk der Zelle, beispielsweise über Calcium/Calmodulin, durch direkte Regulierung der Enzymaktivität reagiert werden.

1.1 Proteintransport in Mitochondrien und Chloroplasten

Im Zuge der Entwicklung vom Endosymbionten zum Zellorganell Chloroplast bzw. Mitochondrium wurde der Großteil des ursprünglichen Genoms beider Organellen in den Nukleus der Wirtszelle transferiert (Martin and Herrmann, 1998). Somit werden etwa 99 % der chloroplastidären und mitochondrialen Proteine an zytosolischen Ribosomen synthetisiert und anschließend post-translational in die Organellen importiert (Leister, 2003).

Mitochondrien sind aufgrund ihres endosymbiotischen Ursprungs von einer Doppelmembran, der äußeren und inneren Mitochondrienmembran, umgeben. In diese eingebettet befinden sich die Translokationskomplexe für den Import von mitochondrialen Proteinen, die an zytosolischen Ribosomen translatiert wurden. Die Proteine werden vom TOM Komplex (Translocase of the Quter membrane of Mitochondria) durch die äußere Membran transloziert (Milenkovic et al., 2007). Protei-

ne der äußeren Membran werden danach über den SAM Komplex (Sorting and Assembly Machinery) in die Membran inseriert, während Proteine des Intermembranraumes durch Interaktion mit Mia40 assembliert werden (Hell, 2008). Etwa die Hälfte aller mitochondrialen Proteine wird mit Hilfe abspaltbarer N-terminaler Sequenzverlängerungen, Präsequenzen genannt, importiert. Diese umfassen etwa 20-50 Aminosäuren und liegen als positiv geladene amphipatische α -Helices vor (Schatz and Dobberstein, 1996). Außerdem beinhalten sie meist aliphatische Aminosäuren wie Leucin und Alanin (Peeters and Small, 2001). Proteine mit Präsequenz werden über den TIM23 Komplex (Translocase of the Innner membrane of Mitochondria) entweder lateral in die innere Membran inseriert oder durch das Zusammenspiel von TIM23 und PAM Komplex (Presequence translocase-Associated Motor) in die Matrix transloziert. Nach der Translokation wird die nun überflüssige Präsequenz von der Mitochondrialen Prozessierungspeptidase MPP entfernt (Gakh et al., 2002). Über einen zweiten Translokationskomplex der inneren Membran, TIM22, werden bestimmte Carrierproteine dieser Membran inseriert, die keine Präsequenz besitzen (Bolender et al., 2008). Der Import von mitochondrialen Proteinen ist im allgemeinen von cytosolischen Chaperonen und ATP sowie im Fall von Proteinen, die entweder über oder in die innere Mitochondrienmembran transloziert werden, zusätzlich vom Membranpotential $\Delta\Psi$ dieser Membran abhängig (Schleyer et al., 1982; Neupert and Herrmann, 2007).

Auch der Chloroplast ist durch seinen endosymbiotischen Ursprung von zwei Membranen, der äußeren und der inneren Hüllmembran, umgeben. Fast alle im Chloroplasten lokalisierten Proteine importieren mit Hilfe abspaltbarer, N-terminaler Sequenzverlängerungen, der Transitsequenzen. Diese sind meist 20-150 Aminosäuren lang und liegen in wässriger Umgebung als „random-coil“ Struktur vor (Emanuelsson and von Heijne, 2001). Transitsequenzen besitzen einen hohen Anteil der hydroxylierten Aminosäuren Serin und Threonin und weisen eine geringe Anzahl saurer Aminosäuren auf (Peeters and Small, 2001). Der Import fast aller chloroplastidärer Proteine mit Transitpeptid erfolgt mittels des „Generellen Importwegs“ über die Proteintranslokationskomplexe TOC (Translocon of the Outer envelope of Chloroplasts) in der äußeren Membran und TIC (Translocon of the Innner envelope of Chloroplasts) in der inneren Membran (Soll and Schleiff,

2004). Im Stroma wird anschließend die Transitsequenz der Vorstufenproteine von der Stromalen Prozessierungspeptidase SPP abgespalten, so dass die maturen Proteine entstehen (VanderVere et al., 1995). Proteine der äußeren Hüllmembran werden zumeist direkt von der cytosolischen Seite in die Membran inseriert (May and Soll, 1998; Qbadou et al., 2003). Einige Proteine der inneren Hüllmembran wie Tic32 besitzen keine Transitsequenz und benutzen einen alternativen, nicht vollständig aufgeklärten Importweg (Nada and Soll, 2004). Die Translokation der chloroplastidären Vorstufenproteine wird vielfältig durch Phosphorylierung, cytosolische und stromale Chaperone sowie GTP- und ATP-Hydrolyse reguliert (Stahl et al., 1999; Soll and Schleiff, 2004; Martin et al., 2006). Darüber hinaus findet sowohl eine Redox-Regulation durch Komponenten des TIC Komplexes als auch eine Regulation durch Calcium/Calmodulin statt (Caliebe et al., 1997; Kuchler et al., 2002; Chigri et al., 2005).

Viele der Komponenten der Photosynthese und Atmungskette werden nicht nur vom Genom der Wirtszelle, sondern auch vom Genom der Organellen selbst kodiert. Somit müssen die Untereinheiten nach ihrer Translation an unterschiedlichen Orten räumlich und zeitlich koordiniert zusammengefügt werden. Allein aus dieser Tatsache wird ersichtlich, dass der Proteinimport zwingend ein hochregulierter Prozess sein muss.

1.1.1 Dualer Proteinimport in Mitochondrien und Chloroplasten

Chloroplasten entstanden in eukaryotischen Zellen, die schon Mitochondrien besaßen. Obwohl dadurch ein System für die Translokation mitochondrialer Vorstufenproteine vorhanden war, entwickelte sich ein weiteres, unabhängiges System für den Import in Chloroplasten. Während die Importapparate von Mitochondrien und Chloroplasten mechanistisch recht analog sind, gibt es in Bezug auf die beteiligten Proteine kaum Homologien (Peeters and Small, 2001). Um „Mistrageting“ zu vermeiden, wurden die mitochondrialen Präsequenzen in Pflanzen angepasst (Macasev et al., 2000). Es existiert aber eine steigende Zahl von Proteinen, die von den Translokasen beider Organellen erkannt und importiert werden (Creissen et al., 1995; Small et al., 1998). Die Proteine nutzen dabei entweder eine „twin targeting“ Sequenz, die im Genom aus hintereinander liegenden kodierten chloroplastidären und mitochondrialen Präsequenzen besteht. Dabei können durch

alternativen Start der Transkription oder Translation sowie durch alternatives Spleißen aus einem Gen zwei Proteine generiert werden. Das eine Protein wird anschließend in den Chloroplasten importiert, während das andere in das Mitochondrium transloziert (Pujol et al., 2007). Die andere Möglichkeit der dualen Lokalisierung von Proteinen ist durch eine so genannte „ambiguous“ Targetsequenz gegeben. Dabei werden wahrscheinlich unterschiedliche Bereiche innerhalb ein und desselben Signalpeptids eines einzelnen Proteins von den Translokasen sowohl der Chloroplasten als auch der Mitochondrien als Importsignal erkannt (Peeters and Small, 2001). Die meisten Proteine, die mittels eines solchen Signals dual in beide Organellen translozieren, sind an der Genexpression beteiligt. Dazu sind die Aminoacyl-tRNA Synthetasen zu zählen. Bemerkenswert ist dabei, dass von insgesamt 24 Mitgliedern dieser Proteinfamilie 17 dual in Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert sind (Duchene et al., 2005). Ein weiteres Beispiel stellt eine RNA Polymerase aus *A. thaliana* dar (Hedtke et al., 2000). Andere dual-lokalisierte Proteine wie Glutathion Reduktase und Ferrochelatase-I dienen dem Schutz vor oxidativem Stress (Creissen et al., 1995; Chow et al., 1997).

1.2 AAA⁺-ATPasen

Die Umwandlung chemisch gespeicherter Energie in biologische Aktivität durch die Hydrolyse von ATP ist ein wichtiger zellulärer Prozess. Eine Gruppe von ATPasen, die diese Reaktion katalysiert, sind die AAA⁺-ATPasen (ATPases Associated with a variety of cellular Activities) (Kunau et al., 1993). AAA⁺-ATPasen unterscheiden sich von anderen P-loop NTPasen durch eine charakteristische 200 bis 250 Aminosäuren lange AAA-Domäne. Diese besteht aus fünf α -Helices und fünf β -Strängen, die keilförmig angeordnet sind, und aus fünf weiteren α -Helices, die einen partiellen Deckel formen. Die AAA-Domäne ist essentiell für die Bindung und Hydrolyse von ATP und enthält alle dafür notwendigen Struktureigenschaften wie die Walker A und B Motive sowie die Sensoren 1 und 2 und einen Arginin-Finger (Walker et al., 1982; Neuwald et al., 1999). Nicht nur strukturell stellen diese AAA⁺-ATPasen eine Besonderheit dar, denn sie nutzen die Energie, die durch die Bindung und/oder Hydrolyse von ATP frei wird, um Konformationsänderungen hervorzurufen. Diese sind nicht nur auf die ATPasen selbst beschränkt, sondern

können auch auf deren Substrate weitergeleitet werden. Dadurch kommt es zu den vielfältigsten Remodellierungen der Zielproteine wie beispielsweise der Disassemblierung oder Entfaltung (Frickey and Lupas, 2004; Iyer et al., 2004). Neben der AAA-Domäne besitzen die AAA⁺-ATPasen zusätzliche Domänen, die ihnen ermöglichen, mit einer Vielzahl von Substraten zu interagieren und vor allem eine Vielzahl von zellulären Funktionen auszuüben. Dazu zählen generelle Prozesse in allen Organismen wie der Proteinabbau und die DNA Replikation sowie spezialisierte Funktionen wie die homo- und heterotypische Membranfusion und die Microtubuli-Disassemblierung in Eukaryoten (Erdmann et al., 1991; Frickey and Lupas, 2004; Hanson and Whiteheart, 2005). Um ihre biologisch aktive Form zu erlangen, assemblieren AAA⁺-ATPasen in Oligomere (Hanson and Whiteheart, 2005). Oligomerisierung kann zum einen zu einer kooperativen ATP-Hydrolyse führen (Hattendorf and Lindquist, 2002). Es entsteht dadurch aber auch eine zentrale Pore im Inneren des Hexamers, durch die viele AAA⁺-ATPasen ihre Substrate schleusen können (Hinnerwisch et al., 2005).

Die Disassemblierung von Proteinkomplexen durch AAA⁺-ATPasen ist für die Aufrechterhaltung zellulärer Membransysteme sehr wichtig. Ein Vertreter der AAA⁺-ATPasen namens NSF (N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein) ist eine zentrale Komponente des eukaryotischen Vesikeltransports (Block et al., 1988). NSF vermittelt zusammen mit seinem Adaptorprotein α -SNAP (soluble NSF-adaptor protein) die Disassemblierung von membran-assoziierten helikalen Proteinen, den SNARE-Komplexen (α -SNAP Receptors). Diese sind *in-cis* auf der gleichen Membran als sehr stabiler Komplex lokalisiert. Die durch die Disassemblierung generierten freien SNAREs können anschließend mit den SNAREs einer anderen Membran assoziieren. Dies stellt eine wichtige Voraussetzung für die Fusion zweier Membranen dar (Ungermann et al., 1998).

1.3 Das Calciumsignalnetzwerk der Zelle

Pflanzliche Organismen sind ständig einer Vielzahl von in- und externen Reizen wie Licht, Hormonen sowie weiteren abiotischen und biotischen Stressfaktoren ausgesetzt (Clapham, 2007). Die Wahrnehmung dieser Signale resultiert in der Synthese von sogenannten Sekundären Botenstoffen wie beispielsweise Calciumionen. Das Calcium-Signalnetzwerk der eukaryotischen Zelle beruht auf der folgenden Arbeitsweise. Durch die synchronisierte Aktivität von Membrankanälen, Pumpen und Transportern wird das Calciumsignal generiert. Die daraus resultierende Änderung der intrazellulären Calciumkonzentration wird anschließend durch Calcium-bindende Proteine wahrgenommen. Diese Proteine geben das Calciumsignal daraufhin durch Bindung an ihre spezifischen Zielproteine weiter. Somit kommt es zu einer zellulären Antwort auf das Calciumsignal (Reddy and Reddy, 2004). Ein wichtiges, ubiquitär in Eukaryoten verbreitetes Calcium-bindendes Protein ist Calmodulin (Zielinski, 1998). Dieses 16 kDa große, azide Protein ist in der Lage, bis zu vier Calciumionen zu binden. Die Ionen sind dabei paarweise an den beiden globulären Enden des Proteins koordiniert und werden über eine sehr flexible α -Helix miteinander verbunden (Day et al., 2002). Diese erlaubt es Calmodulin, eine Vielzahl an Konformationen anzunehmen und dadurch mit einer hohen Anzahl an Zielproteinen zu interagieren (McCormack et al., 2005). Obwohl Calmodulin selbst sehr stark konserviert ist, zeigen die Bindedomänen der Substrate eine extreme Variabilität (Rhoads and Friedberg, 1997). Charakteristisch für die oftmals 20 Aminosäuren lange Bindedomäne ist, dass sie eine positiv geladene und amphiphile α -Helix ausbildet (O'Neil and DeGrado, 1990). Innerhalb dieser Domäne gibt es konservierte hydrophobe Aminosäuren, die für die Interaktionen von Calmodulin mit seinen Zielproteinen mittels hydrophober Wechselwirkung essentiell sind (Reddy and Reddy, 2004).

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass Calmodulin an chloroplastidären Prozessen beteiligt ist. So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die Translokation von Vorstufenproteinen in den Chloroplasten von Calmodulin abhängig ist (Chigri et al., 2005; Chigri et al., 2006). Dies eröffnet die Möglichkeit, dass der Chloroplast als Organell prokaryotischen Ursprungs in das eukaryotische Calcium-Signaltransduktionsnetzwerk der Zelle eingebunden wurde. Ein weiterer Calmodu-

lin-regulierter Prozess ist der chloroplastidäre Vesikeltransport (Westphal et al., 2001). Durch Inhibitorstudien konnte gezeigt werden, dass Calmodulin an der Fusion von Vesikeln der inneren Chloroplastenhüllmembran mit der Thylakoidmembran beteiligt ist. Darüber hinaus wirken an diesem Transportsystem Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen und GTPasen mit.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des chloroplastidären Vesikeltransportsystems durch die Identifizierung von involvierten Komponenten, insbesondere solcher Proteine, die über Calmodulin reguliert werden.

2 Material

2.1 Chemikalien und Saatgut

Alle Chemikalien wurden von höchstmöglicher Qualität von namhaften Herstellern bezogen. Spezielle Chemikalien stammten von folgenden Firmen: Rinderhirn-Calmodulin von Alexis (Grüneberg, Deutschland); die Quervernetzungsreagenzien 1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und Sulfo-N-Hydroxysulfosuccinimid (Sulfo-NHS) von Pierce (Bonn, Deutschland); der radioaktiv markierte Aminosäurenmix aus ³⁵S-Methionin/Cystein mit spezifischer Aktivität von 1175 Ci/mmol von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland); Valinomycin von Merck (Schwallbach, Deutschland); Ophiobolin A und Fluphenazin Dihydrochlorid von Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland); Microcystin-LR von Biomol (Hamburg, Deutschland); N-Decyl-β-D-Maltosid (DM) von Glycon (Luckenwalde, Deutschland); Complete Protease Inhibitor Cocktail und Thermolysin von Roche (Mannheim, Deutschland). Samen von *A. thaliana* L. cultivar „Columbia-0“ und von *P. sativum* L., cultivar „Arvika“ wurden verwendet. T-DNA-Insertionslinien wurden über The European Arabidopsis Stock Centre NASC (Loughborough, Großbritannien) bezogen.

2.2 Enzyme, Kits, Vektoren und Oligonukleotide

Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme, DNA-Polymerasen und weitere Enzyme zur Manipulation von DNA wie DNase I stammten von Roche (Mannheim, Deutschland), Fermentas (St. Leon-Roth, Deutschland), Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland), Eppendorf (Hamburg, Deutschland) und New England Biolabs (Boston, USA). T4-Ligase stammte von Fermentas und MMLV-RT-Transkriptase von Promega (Mannheim, Deutschland). Zur DNA-Isolierung wurde das Kit Fast-Plasmid-Mini von Eppendorf (Hamburg, Deutschland) verwendet. Für DNA-Isolierung in großen Mengen wurde das Nucleobond AX Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) genutzt. Die DNA-Isolierung aus Agarosegelen wurde mit dem Nucleospin Extract II Kit ebenfalls von Macherey-Nagel durchgeführt. RNA wurde aus *A. thaliana* mit Hilfe des Plant RNeasy Plant Mini Kits von Qiagen (Hil-

den, Deutschland) isoliert, cDNA für die Klonierungen wurde mit dem SmartRace cDNA Amplification-Kit von Clontech-Takara (Saint-Germain-en-Laye, Frankreich) revers transkribiert. Zum Abbau der pflanzlichen Zellwand wurden Mazerase und Cellulase von Serva (Heidelberg, Deutschland) verwendet. Die Plasmid-Vektoren pSP65 (Transkription und Translation) von Promega (Madison, USA), pET21.d (C-terminaler Hexa-Histidin-Anhang) von Stratagene (La Jolla, USA) und pOL-LP (C-terminaler GFP-Anhang) von Dr. J. Meurer (LMU München, Deutschland) wurden benutzt. Oligonukleotid-Primer wurden von Operon (Köln, Deutschland) und Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) synthetisiert.

2.3 Bakterienstämme und Medien

Die *E. coli* Stämme JM-109 von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland), BL21(DE3) von Novagen (Madison, USA) und BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL von Stratagene (La Jolla, USA) wurden benutzt. Alle *E. coli* Stämme wurden in LB-Medium (1 % Trypton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) angezogen (Sambrook and Russel, 2001). Für die stabile *A. thaliana* Transformation wurde *A. tumefaciens* GV3101::pMP90RK eingesetzt.

2.4 Membranen, Größenmarker, Säulenmaterial

Nitrozellulose-Membranen (Protran BA83; 0,2 μm) wurden von Schleicher & Schüll (Dassel, Deutschland), PVDF-Membranen (Polyvinylfluorid; Hybond-PVDF) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) und Blotpapier von Macherey Nagel (Düren, Deutschland) bezogen. Für die denaturierende SDS-PAGE wurde der „Low Molecular Weight Marker“ bestehend aus α -Lactalbumin (14 kDa), Trypsin-Inhibitor (20 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Glycerinaldehyd-3-Dehydrogenase (36 kDa), Hühnerei-Albumin (45 kDa), Rinderserumalbumin (66 kDa) und β -Galactosidase (116 kDa), von Sigma-Aldrich verwendet. Für die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit EcoRI und HindIII geschnittene λ -Phagen DNA von Fermentas als Größenstandard verwendet. Für den Calmodulin-Pull-Down-Assay sowie für die Affinitätschromatographie wurde Calmodulin-Agarose von Sigma-Aldrich und GE Healthcare (München, Deutschland) verwendet. Die ProteinA Sepharose für Co-Immunopräzipitation stammte ebenfalls von

GE Healthcare. Die Microcystin-Agarose stammte von Millipore (Billerica, USA), für die Kopplung an Fluphenazin Dihydrochlorid wurde Epoxid-aktivierte Sepharose 4B von GE Healthcare verwendet. Für die Aufreinigung von rekombinantem Protein mit Hexa-Histidin-Anhang mittels Affinitätschromatographie wurde Ni²⁺-NTA-Agarose von Qiagen benutzt.

2.5 Antiseren

Der primäre polyklonale Antikörper gegen AFG1L1 (α -AFG1L1) wurde gegen heterolog in *E. coli* exprimiertes und aufgereinigtes matures Protein von *A. thaliana* ohne das 60 Aminosäuren lange Transitpeptid von der Firma Biogenes (Berlin, Deutschland) in Kaninchen erzeugt. Der primäre polyklonale Antikörper gegen TOPP2 (α -PP) wurde ebenfalls von Biogenes erzeugt. Die polyklonalen Antikörper α -SSU, α -Tic62, α -Tic110 stammen aus der Sammlung von J. Soll, α -AOX und α -VDAC stammen von J. Whelan. Die sekundären Antikörper gekoppelt an Alkaline Phosphatase oder Meerrettich-Peroxidase (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-AP/HRP-Konjugat sowie Ziege-Anti-Maus-IgG-HRP) wurden von Sigma-Aldrich bezogen.

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Standardmethoden

Die folgenden Standardmethoden wurden nach Sambrook durchgeführt (Sambrook and Russel, 2001): die Anzucht von Bakterienkulturen, das Anlegen von Stammkulturen, die Phenol/Chlorophorm Extraktion von DNA und deren Präzipitation mit Ethanol oder Isopropanol. Kompetente *E. coli* Stämme wurden hergestellt wie beschrieben (Hanahan, 1983). Restriktionen und Ligationen erfolgten nach den Angaben der Hersteller der Enzyme oder Kits. Die Plasmidisolierung erfolgte durch alkalische Lyse mit SDS (Sambrook and Russel, 2001) oder mit Kit nach den Angaben des Herstellers. Die Aufreinigung von PCR-Produkten und DNA-Fragmenten aus Agarosegelen erfolgten ebenfalls nach Herstellerangaben. Die Transformation der JM-109, BL21(DE3) und BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL Bakterienstämme erfolgte wie beschrieben (Pope and Kent, 1996).

3.1.2 DNA-Gelelektrophorese

Agarosegele (1-2 % NEEO Ultra Agarose, 0,5 µg/ml Etidiumbromid, 0,5 x TBE) in 0,5 x TBE (45 mM Tris-Borat, 1 mM EDTA) wurden zur elektrophoretischen Auftrennung von DNA, die mit 6 x-Ladepuffer (0,125 % Bromphenolblau, 0,125 % Xylencyanol FF, 0,175 % Orange G, 30 % Glycerin) versetzt wurde, benutzt. Zur DNA-Mengenbestimmung wurde die DNA nach Auftrennung mit den bekannten Mengen des λ -Phagen-DNA-Standards verglichen oder photometrisch bei 260 nm gemessen.

3.1.3 Polymerase-Ketten-Reaktion und Klonierungsstrategie

Die Polymerase-Ketten-Reaktion wurde zur Amplifikation ausgesuchter DNA-Sequenzen sowie zum Einführen von Restriktionsschnittstellen angewandt und erfolgte nach Sambrook und nach Angaben der Enzymhersteller (Sambrook and Russel, 2001). Nach Denaturierung der DNA für 30 s bei 96 °C erfolgte die Hybridisierung für 1 min bei einer Temperatur, die 5 °C unter der Schmelztemperatur

der Oligonukleotid-Primer lag, gefolgt von einer Synthetisierungsphase bei 72 °C für 3 min. Dieser Zyklus wurde 25-35 mal wiederholt. Um die Klonierung von DNA-Fragmenten in Vektoren zu ermöglichen, wurden mittels PCR die jeweils passenden Schnittstellen für Restriktionsenzyme eingeführt (Saiki et al., 1988). Für die Klonierungen wurde entweder cDNA, die aus genomischer RNA revers transkribiert wurde, oder genomische DNA aus *A. thaliana* als Matrize benutzt. Die Klonierung des AFG1L1-Konstruktes ohne die Aminosäuren 141 bis 161 erfolgte durch „overlap extension PCR“. Alle Klone wurden durch Sequenzierung (SeqLab, Göttingen, Deutschland sowie Sequenzierservice des Department I Biologie der LMU, München, Deutschland) überprüft. Im Anhang (Kapitel 13) sind alle für diese Arbeit erzeugten Konstrukte verzeichnet.

3.1.4 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

A. thaliana Blätter wurden in 200 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris, pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,5 % SDS) mit einer Kugelmühle zerkleinert, bei 21 °C für 3-5 min inkubiert und bei 12000 g für 5 min zentrifugiert. 150 µl des die DNA enthaltenden Überstandes wurden in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde mit 150 µl Isopropanol durch anschließende Zentrifugation bei 18000 g für 15 min präzipitiert. Das entstandene DNA-Pellet wurde in 100 µl ddH₂O rekonstituiert und 1/30 davon in einer PCR-Reaktion eingesetzt.

3.2 Biochemische Methoden

3.2.1 SDS-PAGE

Proteine wurden mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach der Methode von Lämmli aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Proteine wurden in SDS-Solubilisierungspuffer (125 mM Tris/HCl, pH 6,8, 10 % (v/v) β-Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerin, 4 % (w/v) SDS und 0,01 % Bromphenol) aufgenommen, 2 min bei 96 °C denaturiert und anschließend in 8-15 %igen Trenngelen mit einem Verhältnis von Acrylamid zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid von 30:0,8 aufgetrennt.

3.2.2 Coomassie-Färbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das SDS-Gel für 15-20 min in Coomassie-Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure, 0,18 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R250) inkubiert und anschließend mit Entfärbelösung (40 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure und 3 % (v/v) Glycerin) entfärbt, bis der Hintergrund klar und die Proteine gut sichtbar waren. Die Gele wurden mehrfach in ddH₂O gewaschen und anschließend bei 80 °C unter Vakuum getrocknet.

3.2.3 Silberfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurde das Gel für 60 min in Fixierlösung (40 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure und 3 % (v/v) Glycerin) inkubiert und anschließend mit Silbernitrat gefärbt (Blum, 1987). Dazu wurde das Gel dreimal für 20 min in 50 % Ethanol und danach für 1 min in Vorbehandlungslösung (0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃) unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in ddH₂O für jeweils 20 s wurde das Gel für 20 min mit der Färbelösung (0,2 % (w/v) AgNO₃, 0,028 % (v/v) Formaldehyd) inkubiert und noch zweimal in ddH₂O für je 20 s gewaschen. Abschließend erfolgte die Behandlung in Entwicklerlösung (37,5 % (w/v) Na₂CO₃, 0,028 % Formaldehyd und 0,0075 % Na₂S₂O₃), bis Banden zu sehen waren. Die Reaktion wurde mit Fixierlösung gestoppt und die Gele anschließend mehrfach in ddH₂O gewaschen, bevor sie bei 80 °C unter Vakuum getrocknet wurden.

3.2.4 Western Blot und Immundekoration von Proteinen

Nach der „Semi Dry Blot“-Methode von Khyse-Andersen wurden elektrophoretisch aufgetrennte Proteine auf Nitrozellulose- oder PVDF-Membran bei einer Stromstärke von 0,8 mA cm⁻² für 60 min immobilisiert (Kyhse-Andersen, 1984). Die PVDF-Membran wurde nach Angaben des Herstellers vorbehandelt. Durch die Reaktion der Proteine mit polyklonalen Antikörpern erfolgte die spezifische Identifizierung des Antigens. Mit Hilfe eines enzymgekoppelten sekundären Antikörpers (alkalische Phosphatase AP oder Meerrettich-Peroxidase HRP) gekoppelt an Anti-Kaninchen-IgG wurde die Reaktion schließlich detektiert. Nach dem Transfer der

Proteine wurde die Membran anschließend mit Ponceaulösung (0,5 % Ponceau S, 1 % HAc) behandelt, um den Größenstandard identifizieren zu können. Nach der Absättigung der Membran für 60 min in Magermilchpuffer (1 % (w/v) Magermilchpulver, 50 mM Tris/HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl und 0,01 % (v/v) Tween 20), wurde sie 1-16 h mit dem entsprechenden spezifischen Antikörper inkubiert. Nachdem die Membran dreimal für 10 min in Magermilchpuffer gewaschen und mit dem sekundären Antikörper (1:10000 Verdünnung in Magermilchpuffer) für 60 min inkubiert wurde, erfolgte das Entfernen nicht-gebundener Phosphatase- bzw. Peroxidase-Konjugat-Antikörper durch dreimaliges Waschen für 10 min in Magermilchpuffer. Für die Reaktion mit dem sekundären Antikörper gekoppelt an Alkaline Phosphatase wurde die Membran kurz in Entwicklerlösung (100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂, 100 mM Tris/HCl, pH 9,5) äquilibriert. Danach erfolgte die Farbreaktion der Protein-Antikörper-Bindung mit 0,003% (w/v) 4-Nitrotetrazoliumchlorid Blauhydrat (NBT) und 0,017% (w/v) 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) in Entwicklerlösung. Durch Überführen des Blots in 5 mM EDTA wurde die Reaktion gestoppt. Die Entwicklung der Reaktion mit dem sekundären Antikörper gekoppelt an Meerrettich-Peroxidase wurde mittels ECL Kit von GE Healthcare durchgeführt.

3.2.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinmengen erfolgte wie beschrieben (Bradford, 1976) und dem ProteinEssayKit von Bio-Rad (München, Deutschland). Dazu wurde die zu bestimmende Proteinlösung nach Angaben des Herstellers mit dem Bradford-Reagenz gemischt und 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gegen den Blindwert gemessen. Die Proteinmenge wurde anhand einer mit Rinder-Serumalbumin erstellten Eichkurve bestimmt.

3.3 Zellbiologische Methoden

3.3.1 Isolierung intakter Chloroplasten aus *A. thaliana*

Chloroplasten wurden aus 4-6 Wochen alten Blättern von *A. thaliana*, die in einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden unter fluoreszierendem Licht bei 100-120 µE auf Erde angezogen wurden, wie beschrieben isoliert (Kunst, 1998).

Dazu wurden ca. 150 g Blätter in 900 ml Homogenisierungspuffer (450 mM Sorbit, 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 20 mM Tricine/KOH, pH 8,4) im Mixer homogenisiert und anschließend durch jeweils zwei Lagen Mull und Gaze filtriert. Das durch Zentrifugation bei 1400 g für 5 min erhaltene Chloroplastenpellet wurde in 20 ml Puffer B (300 mM Sorbit, 5 mM MgCl₂, 2,5 mM EDTA, 20 mM Tricine/KOH, pH 7,6) aufgenommen und zur Abtrennung kaputter Chloroplasten auf einen linearen Percollgradienten (0-50 % Percoll in Puffer B) geladen. Die intakten Chloroplasten, die sich in der unteren der beiden durch Zentrifugation bei 12000 g für 6 min entstandenen Banden befanden, wurden abgenommen und anschließend dreimal in Puffer B gewaschen.

3.3.2 Fraktionierung von *A. thaliana* Chloroplasten

Für die Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose erfolgte die Fraktionierung von *A. thaliana* Chloroplasten wie beschrieben (Kunst, 1998) durch Lyse der Organellen in TE-Puffer (10 mM Tris, pH 8,0, 1 mM EDTA) und anschließende Auftrennung über einen Saccharose-Gradienten (1,2; 1,0 und 0,46 mM Saccharose in TE-Puffer). Nach Zentrifugation bei 36000 g für 120 min wurden die Chloroplasten in stromale Proteine, die dem Gradienten auflagen, in Hüllmembranproteine, die sich in der Zwischenschicht von 1,0 und 0,46 mM Saccharose des Gradienten befanden, und pelletierte Thylakoidproteine aufgetrennt. Für alle anderen Versuche wurden die Chloroplasten von *A. thaliana* (und auch von *P. sativum*) osmotisch in 50 mM HEPES, pH 7,6 auf Eis lysiert. Zentrifugation bei 3000 g für 10 min pelletierte die Thylakoidmembranen. Der durch die erste Zentrifugation entstandene Überstand, der stromale Proteine und Hüllmembranproteine enthielt, wurde bei 256000 g für 10 min zentrifugiert, um beide Fraktionen voneinander zu trennen. Die Hüllmembranen und Thylakoidmembranproteine wurden anschließend jeweils zweimal in TE-Puffer bzw. HEPES gewaschen.

3.3.3 Isolierung der extrinsischen Thylakoidproteinfraktion von *A. thaliana*

Die Thylakoidmembranen wurden in 500 mM NaCl in 25 mM HEPES/KOH, pH 7,6 aufgenommen und für 60 min auf Eis inkubiert. Die extrinsische Thylakoidpro-

teinfraktion wurde durch Zentrifugation bei 30000 g für 15 min als Überstand erhalten.

3.3.4 Isolierung von Chloroplasten aus *P. sativum*

Die Isolierung intakter Chloroplasten aus 9-12 Tage alten Blättern von *P. sativum*, die in einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei einer Lichtstärke von $250 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ auf Vermiculit in einer Klimakammer angezogen wurden, erfolgte wie beschrieben (Waegemann, 1991). Dazu wurden 200 g Erbsenblätter mit 300 ml Isolationsmedium (330 mM Sorbitol, 20 mM Mops, 13 mM Tris, 3 mM MgCl_2 , 0.1 % (w/v) BSA) im Mixer homogenisiert und durch vier Lagen Mull und eine Lage Gaze filtriert. Das durch Zentrifugation bei 1500 g für 1 min erhaltene Chloroplastenpellet wurde in 1 ml Waschmedium (330 mM Sorbitol, 50 mM Hepes/KOH, pH 7,6, 3 mM MgCl_2) aufgenommen und auf einen Percollgradienten (40 % und 80 % in 330 mM Sorbitol, 50 mM Hepes/KOH, pH 7,6) geladen. Intakte Chloroplasten, die sich in der unteren der beiden durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 min entstanden Banden befanden, wurden zweimal in Waschmedium gewaschen. Nachdem sie anschließend in 200 μl des gleichen Mediums aufgenommen wurden, verblieben sie bis zur Verwendung im Dunklen auf Eis. Die Chlorophyllkonzentration der isolierten Chloroplasten wurde anschließend nach Arnon bestimmt (Arnon, 1949).

3.3.5 Isolierung von Mitochondrien aus *P. sativum*

Die Isolierung intakter Mitochondrien aus 9-12 Tage alten Blättern von *P. sativum*, die in einem Licht/Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei einer Lichtstärke von $250 \mu\text{mol Photonen}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{sec}^{-1}$ auf Vermiculit in einer Klimakammer angezogen wurden, erfolgte wie beschrieben (Fang et al., 1987). Dazu wurden 400 g Erbsenblätter mit 400 ml Isolationsmedium (300 mM Saccharose, 25 mM Tetranatrium-Pyrophosphat, 2 mM EDTA, 10 mM KH_2PO_4 , pH 7,5 1 % (w/v) PVP-40, 1 % (w/v) BSA, 20 mM Ascorbat) mit einem Mörser homogenisiert und durch vier Lagen Mull filtriert. Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 2500 g für 5 min entfernt. Der die Mitochondrien enthaltende Überstand wurde bei 17400 g für 20 min zentrifugiert. Das so erhaltene Mitochondrienpellet wurde mit Waschmedium

(300 mM Saccharose, 10 mM TES, pH 7,5, 0,1 % (w/v) BSA) gewaschen und beide Zentrifugationsschritte wurden wiederholt. Das Mitochondrienpellet wurde auf einen linearen Percollgradienten (0-4,4 % PVP-40 in 28 % Percoll) geladen. Intakte Mitochondrien, die sich in der oberen der beiden durch Zentrifugation bei 35000 g für 40 min entstandenen Banden befanden, wurden anschließend zweimal in Waschpuffer gewaschen, bevor sie in Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt wurden.

3.3.6 Isolierung von *N. tabacum* Protoplasten und transiente Transformation

Für die nach Koop modifizierte, semi-sterile transiente Transformation von *N. tabacum* cultivar „petite Havana“ Protoplasten wurden diese wie folgt isoliert (Koop et al., 1996). Tabakblätter von 3-4 Wochen alten Pflanzen, die auf B5-modifiziertem Medium (Gamborg et al., 1976) wuchsen, wurden zerkleinert und mit 1 % Cellulase und 0,3 % Mazerase für 2-3 h bei $21\text{ }^{\circ}\text{C}$ unter leichtem Schütteln in F-PIN Medium (Murashige und Skoog Mineralsalze mit PC-Vitaminen (200 mg/l Myo-inositol, 1,0 g/l Thiamin-HCl, 2,0 g/l Ca-Panthotenat, 2,0 mg/l Nikotinsäure, 2,0 mg/l Pyridoxin-HCl, 0,02 mg/l Biotin), 1,0 mg/l 6-Benzylaminopurin, 0,1 mg/l α -Naphthylelessigsäure, 20 mM MES/KOH, pH 5,8, 130 g/l Saccharose; 550 mOsm, mit Saccharose eingestellt) inkubiert. Die Suspension wurde anschließend durch 100 μm Gaze filtriert, mit F-PCN Medium (MS Mineralsalze und Vitamine wie für F-PIN, 20 mM MES/KOH, pH 5,8, 80 g/l Glucose; 550 mOsm, mit Glucose eingestellt) überschichtet und bei 70 g für 10 min zentrifugiert. Die intakten Protoplasten, die sich in der Zwischenschicht des Gradienten befanden, wurden abgenommen und in Transformationsmedium (15 mM MgCl_2 , 0,1 % MES/KOH, pH 5,8, 500 mM Mannitol; 550 mOsm, mit Mannitol eingestellt) gewaschen und bei 50 g für 2 min pelletiert. Die Suspension wurde durch Auszählen der Protoplasten mittels Fuchs-Rosenthal Zählkammer mit Transformationsmedium auf $5 \cdot 10^6$ Protoplasten/ml eingestellt. Anschließend wurde die Transformation mit 50 μg DNA (in 20 mM MES, pH 5,6), 100 μl Protoplasten-Suspension und 125 μl PEG-Lösung (40 % PEG 1500, 70 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 550 mM Mannitol/KOH, pH 9,75) pro Ansatz durchgeführt. Nach 7,5 min Inkubationszeit wurden 125 μl F-PCN Medium zugegeben und für weitere 2 min inkubiert. Nach dem Verdünnen

der Suspension in 2,4 ml F-PCN Medium wurde der Ansatz für 16-24 h im Dunklen bei 21 °C inkubiert und die GFP-Fluoreszenz anschließend detektiert.

3.4 Heterologe Expression rekombinanter Proteine

Die heterologe Proteinexpression von mAFG1L1₆₀₋₄₉₇ und mAFG1L1_{Δ141-161} erfolgte in *E.coli* BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL mit 100 µg/ml Ampicillin und 34 µg/ml Chloramphenicol als Selektionsantibiotika, während alle anderen Konstrukte in *E.coli* BL21(DE3) mit 100 µg/ml Ampicillin als Selektionsantibiotikum exprimiert wurden (Sambrook and Russel, 2001). Die Bakterien wurden bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀=0,6-0,8 angezogen und anschließend wurde die Überexpression mit 1 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte für alle Konstrukte für 3 h bei 37 °C. Die heterologe Proteinexpression von pSSU und pF_{1β} erfolgte wie beschrieben (Waegemann and Soll, 1996).

3.5 Chromatographische Methoden

3.5.1 Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose

Die extrinsische Thylakoidproteinfraktion wurde in 25 mM Hepes/KOH, pH 7,6 auf 150 mM NaCl eingestellt, während die stromale Proteinfraktion mit ebenfalls 25 mM Hepes/KOH, pH 7,6 auf 30 mM Saccharose eingestellt wurde. Nachdem beiden Fraktionen CaCl₂ zur Endkonzentration von 0,1 mM zugegeben wurde, erfolgte die Inkubation mit 100 µl Calmodulin-Agarose für 16 h bei 4 °C unter leichtem Schütteln. Das Säulenmaterial wurde durch Zentrifugation bei 500 g für 2 min gesammelt und dreimal mit dem zehnfachen Säulenvolumen des Calmodulin-Bindungspuffers (25 mM Hepes/KOH, pH 7,6, 150 mM NaCl, 0.1 mM CaCl₂) gewaschen. Spezifisch an die Calmodulin-Agarose gebundene Proteine wurden mit 2 % SDS eluiert. Die verschiedenen Fraktionen wurden durch SDS-PAGE und anschließende Silber-Färbung analysiert.

3.5.2 Affinitätschromatographie an Microcystin-Agarose

Isolierte Chloroplasten von *A. thaliana* wurden mit 1 % Decylmaltosid in Hepes-Puffer (50 mM Hepes-KOH, pH 7,6, 0,1 mM PMSF, 1 mM Benzamidin, 0,1 %

β -Mercaptoethanol) für 20 min auf Eis solubilisiert. Die durch Zentrifugation bei 21000 g für 10 min bei 4 °C erhaltene Fraktion der gesamten löslichen Chloroplastenproteine wurde anschließend für 16 h mit 200 μ l Microcystin-Agarose unter leichtem Schütteln bei 4 °C inkubiert. Das Säulenmaterial wurde zuerst viermal mit zehnfachem Säulenvolumen mit Hepes-Puffer und anschließend einmal im gleichen Puffer mit 500 mM NaCl gewaschen. Bevor gebundene Proteine mit Überschuss an exogenem Microcystin (200 μ M) in Hepes-Puffer eluiert wurden, erfolgte ein weiterer Waschschrift in Hepes-Puffer ohne NaCl. Die Eluate wurden anschließend lyophilisiert, in kleinem Volumen rekonstituiert und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

3.5.3 Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Agarose

Um die Fluphenazin-Sepharose herzustellen, wurde Fluphenazin Dihydrochlorid an Epoxid-aktivierte Sepharose 4B von GE Healthcare nach Herstellerangaben gekoppelt. Stromale Proteine von *A. thaliana* wurden gegen T-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 7,5, 4 mM CaCl₂) dialysiert und anschließend für 10 min bei 82 °C denaturiert. Nach Zentrifugation bei 48000 g für 30 min bei 4 °C wurde der hitzestabile Überstand der stromalen Proteine mit 100 μ l Fluphenazin-Sepharose für 16 h bei 4 °C inkubiert. Das Säulenmaterial wurde danach dreimal mit zehnfachem Säulenvolumen T-Puffer gewaschen. Gebundene Proteine wurden anschließend mit 5 mM EGTA im T-Puffer ohne Calcium von der Matrix eluiert. Die Elutionsfraktionen wurden vereint, lyophilisiert, in kleinem Volumen rekonstituiert und mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

3.5.4 Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose

Die heterolog exprimierten AFG1L1-Konstrukte sowie TOPP2, pSSU und pF₁ β waren mit einem C-terminalen Hexa-Histidin-Anhang versehen, mit dem sie mittels Affinitätschromatographie an Ni²⁺-NTA-Agarose von Qiagen aufgereinigt werden konnten. Alle Proteine wurden nach Angaben des Herstellers unter denaturierenden Bedingungen in 8 M Harnstoff aufgereinigt. An die Matrix gebundene Proteine wurden durch Erniedrigung des pH-Wertes eluiert.

3.5.5 Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose

Das Volllängenprotein AFG1L1 sowie die verkürzten AFG1L1-Konstrukte wurden wie unter 3.5.4 beschrieben aufgereinigt. Der Pull-down Assay wurde modifiziert nach beschriebener Methode (Wang et al., 2005) durchgeführt mit jeweils 20 µg Protein, das mit 10 mM Tris pH 7,5 auf 4 M Harnstoff eingestellt wurde. Die Proteinsuspension wurde in der Anwesenheit von 0,1 mM CaCl₂ mit 20 µl Calmodulin-Agarose für 90 min bei 4 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Säulenmaterial wurde durch Zentrifugation bei 500 g für 2 min gesammelt und dreimal mit dem zehnfachen Säulenvolumen im Pull-down-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 50 mM NaH₂PO₄, 4 M Harnstoff, 0,1 mM CaCl₂) gewaschen. Spezifisch an die Calmodulin-Agarose gebundene Konstrukte wurden kompetitiv mit 10 µM Calmodulin im Pull-down-Puffer eluiert. Für calcium-unabhängige Anbindung an die Säulenmatrix wurde der Assay mit 5 mM EDTA/EGTA statt CaCl₂ im Pull-down-Puffer durchgeführt. Als Kontrolle wurde die Anbindung mit SSU oder Tic32 unter gleichen Bedingungen durchgeführt (Chigri et al., 2006).

3.6 *In vitro* Transkription

Die in pSP65 klonierten Konstrukte wurden mit einem geeigneten Restriktionsenzym für 60 min bei 37 °C linearisiert und anschließend mit Phenol/Chloroform extrahiert, mit Ethanol präzipitiert und in ddH₂O rekonstituiert. Die *in vitro* Transkription erfolgte im 50 µl Ansatz mit Transkriptionspuffer und mit 5 µg linearisierter Plasmid-DNA, 100 U SP6-Polymerase, 50 U RNase Inhibitor, 10 mM DTT, 0,05 (w/v) BSA, 0,5 mM m⁷-Guanosin (5') ppp (5') Guanosin (CAP) und je 0,5 mM ATP, CTP und UTP. Dem Ansatz wurde nach 15 min Inkubation bei 37 °C 1,2 mM GTP zugegeben und für weitere 90 min inkubiert. Aliquots der mRNA wurden für die *in vitro* Translation eingesetzt oder bei -80 °C aufbewahrt.

3.7 *In vitro* Translation

Die *in vitro* Translation von mRNA wurde im zellfreien Kaninchen-Reticulocytenlysat von Roche nach Herstellerangaben durchgeführt. Der Translationsansatz enthielt Reticulocytenlysat, Translationsmix, 150 µCi radioaktiv-markiertes ³⁵S-Me-

thionin/Cystein-Gemisch, sowie die durch Testtranslationen ermittelte, optimale Konzentration von mRNA. Das radioaktiv markierte Protein wurde anschließend in Aliquots bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ aufbewahrt und vor dem Einsatz in den *in vitro* Importstudien bei 256000 g für 10 min zentrifugiert, um Aggregate zu entfernen.

3.8 In vitro Importexperimente in isolierte Chloroplasten

3.8.1 In vitro Import in Chloroplasten

In einer $100\text{ }\mu\text{l}$ Standard-Importreaktion in Importpuffer (330 mM Sorbit, 50 mM Hepes/KOH, $\text{pH } 7,6$, 3 mM MgSO_4 , 10 mM Methionin, 10 mM Cystein, 20 mM Kaliumglukonat, 10 mM NaHCO_3 , $0,2\text{ \%}$ (w/v) BSA, 3 mM ATP) wurden $2-7\text{ \%}$ mit ^{35}S -markierte Vorstufenproteine (Translationsprodukte) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Chloroplasten äquivalent zu $10\text{ }\mu\text{g}$ Chlorophyll gestartet und für 20 min bei $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Licht inkubiert. Für Zeitreihenexperimente betrug die Inkubationszeit $0-30\text{ min}$. Über einen Percollgradienten (40 \% (v/v) Percoll in 330 mM Sorbit, 50 mM Hepes/KOH, $\text{pH } 7,6$) wurden die Chloroplasten anschließend durch Zentrifugation bei 3000 g für 5 min reisoliert und in Waschmedium I (330 mM Sorbit, 50 mM Hepes/NaOH, $\text{pH } 7,6$, 3 mM MgCl_2) gewaschen. Die Chloroplasten wurden anschließend entweder für die Proteasenachbehandlung in Waschmedium II (siehe 3.8.2) oder für die Auftrennung über SDS-PAGE in SDS-Solubilisierungspuffer aufgenommen.

3.8.2 Proteasebehandlung von Chloroplasten

Nach abgeschlossener Importreaktion wurden die Chloroplasten in Waschmedium II (330 mM Sorbit, 50 mM Hepes/KOH, $\text{pH } 7,6$, $0,5\text{ mM}$ CaCl_2) aufgenommen und mit $100\text{ }\mu\text{g/ml}$ Thermolysin für 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 mM EDTA wurden die Chloroplasten durch Zentrifugation bei 4500 g für 5 min pelletiert und anschließend zweimal in Waschmedium III (330 mM Sorbit, 50 mM Hepes/KOH, $\text{pH } 7,6$, 5 mM EDTA) gewaschen.

3.8.3 Inhibierung des Proteinimportes durch Ophiobolin A

Um den Import von Vorstufenproteinen über die innere Hüllmembran der Chloroplasten zu inhibieren, wurde dem Importansatz 100 μM Ophiobolin A zugegeben und für 30 min bei 25 °C vorinkubiert, bevor der Import durch Zugabe des Translationsproduktes gestartet wurde (Chigri et al., 2005).

3.8.4 Konkurrenz des Proteinimportes mit pSSU

Das rekombinante und unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigte Vorstufenprotein pSSU wurde für 16 h bei 4 °C gegen den SSU-Dialysepuffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0, 125 mM NaCl, 10 % Glycerin) dialysiert und anschließend einer Proteinbestimmung nach Bradford unterzogen. pSSU wurde so vorbereitet in einer Konzentrationsreihe von 0-15 μM als Kompetitor zum Importansatz gegeben. Der Import wurde nach Standardbedingungen durchgeführt.

3.8.5 Fraktionierung von Chloroplasten nach dem Import

Die Chloroplasten wurden nach der Importreaktion in lösliche Proteine und integrale Membranproteine aufgetrennt, um die Lokalisierung der importierten murenen Proteine zu untersuchen. Dazu wurden die Chloroplasten in 50 mM Hepes/KOH, pH 7,6 aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert, bevor sie für die Trennung bei 256000 g für 10 min zentrifugiert wurden.

3.9 In vitro Importexperimente in isolierte Mitochondrien

3.9.1 *In vitro* Import in Mitochondrien

In einer 100 μl Standard-Importreaktion in Importpuffer (300 mM Saccharose, 50 mM KCl, 10 mM Mops/KOH, pH 7,5, 5 mM KH_2PO_4 , 0,1 % (w/v) BSA, 1 mM MgCl_2 , 1 mM Methionin, 0,2 mM ADP, 0,75 mM ATP, 5 mM Succinat, 5 mM DTT) wurden 2-7 % mit ^{35}S -markierte Vorstufenproteine (Translationsprodukte) eingesetzt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von Mitochondrien äquivalent zu 50 μg Protein gestartet und für 20 min bei 25 °C im Licht inkubiert. Für Zeitreihenexperimente betrug die Inkubationszeit 0-15 min. Die Mitochondrien wurden anschließend durch Zentrifugation bei 10000 g für 15 min pelletiert und zweimal in

Waschmedium (siehe 3.9.2) gewaschen. Die Mitochondrien wurden anschließend entweder für die Proteasenachbehandlung in Waschmedium oder für die Auftrennung über SDS-PAGE in SDS-Solubilisierungspuffer aufgenommen.

3.9.2 Proteasebehandlung von Mitochondrien

Nach abgeschlossener Importreaktion wurden die Mitochondrien in Waschmedium (300 mM Saccharose, 10 mM TES, pH 7,5, 0,1 % (w/v) BSA), das zusätzlich 50 μ M CaCl_2 enthielt, aufgenommen und mit 100 μ g/ml Thermolysin für 20 min auf Eis inkubiert. Nach dem Stoppen der Reaktion durch Zugabe von 10 mM EDTA wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 10000 g für 15 min pelletiert und anschließend zweimal in Waschmedium gewaschen.

3.9.3 Inhibierung des Proteinimportes durch Valinomycin

Um den Import von Vorstufenproteinen über die innere Membran der Mitochondrien zu inhibieren, wurde dem Importansatz 1 μ M Valinomycin zugegeben und für 20 min auf Eis vorinkubiert, bevor der Import durch Zugabe des Translationsproduktes gestartet wurde (Schleyer et al., 1982).

3.9.4 Konkurrenz des Proteinimportes mit $\text{pF}_1\beta$

Das rekombinante und denaturierend in 8 M Harnstoff aufgereinigte Vorstufenprotein $\text{pF}_1\beta$ wurde direkt in einer Konzentrationsreihe von 0-10 μ M als Kompetitor zum Importansatz gegeben. Der Import wurde ansonsten nach Standardbedingungen durchgeführt.

3.9.5 Fraktionierung von Mitochondrien nach dem Import

Die Subfraktionierung wurde nach modifizierter Methode von He durchgeführt (He et al., 2001). Dazu wurden die Mitochondrien nach dem Import in 50 mM HEPES/KOH, pH 7,6 für 30 min auf Eis lysiert und anschließend bei 10000 g für 15 min zentrifugiert, um die Mitoplasten (Mitochondrien ohne OM und IMS) zu pelletieren. Der Überstand, der äußere Membran (OM) und Intermembranraum (IMS) enthielt, wurde bei 100000 g für 30 min zentrifugiert, um die äußere Membran zu pelletieren. Die Mitoplasten wurden wiederum in 50 mM HEPES/KOH,

pH 7,6 aufgenommen und dreimal für 20 s mit 40 s Pausen sonifiziert. Nach Zentrifugation bei 10000 g für 15 min, um noch intakte Mitochondrien bzw. Mitoplasten zu entfernen, wurde der die innere Membran (IM) sowie die Matrix (MTX) beinhaltende Überstand ebenfalls bei 100000 g für 30 min zentrifugiert, um die innere Membran zu pelletieren. Die Membranfraktionen (OM, IM) wurden anschließend in 50 mM Hepes/KOH, pH 7,6 gewaschen.

3.10 *In vitro* dualer Import in Chloroplasten und Mitochondrien

Die Importreaktion wurde durch Zugabe von 7 % (v/v) mit ^{35}S -markiertem Translationsprodukt zum Importansatz mit Chloroplasten (10 μg Chlorophyll) und Mitochondrien (50 μg Protein) in Importpuffer (600 mM Saccharose, 30 mM Hepes/KOH, pH 7,4, 10 mM KH_2PO_4 , 1 % (w/v) BSA, 4 mM MgCl_2 , 4 mM Methionin, 4 mM ATP, 1 mM GTP, 0,2 mM ADP, 5 mM Succinat, 4,5 mM DTT, 10 mM Kaliumacetat, 10 mM NaHCO_3) nach der Methode von Pavlov gestartet (Pavlov et al., 2007). Nach dem Import für 25 min bei 25 °C wurde die Hälfte des Ansatzes mit der Protease Thermolysin behandelt. Dafür wurde diesem Ansatz 50 μg CaCl_2 zugegeben und mit 120 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Thermolysin für 20 min auf Eis inkubiert, bevor die Reaktion durch Zugabe von 10 mM EDTA gestoppt wurde. Chloroplasten und Mitochondrien wurden in beiden Ansätzen anschließend über einen Percollgradienten (4 % (v/v) Percoll in Waschmedium) durch Zentrifugation bei 4500 g für 30 s voneinander getrennt. Die pelletierten Chloroplasten wurden zweimal in ihrem Waschmedium (siehe 3.8.1) gewaschen. Die dem Gradient aufliegenden Mitochondrien wurden in ein neues Eppi überführt, durch Zentrifugation bei 10000 g für 15 min pelletiert und anschließend zweimal in ihrem Waschmedium (siehe 3.9.2) gewaschen.

3.11 Autoradiographie

Nach den Importexperimenten wurden die Chloroplasten bzw. Mitochondrien in SDS-Solubilisierungspuffer aufgenommen und über SDS-PAGE, die anschließend mit Coomassie gefärbt wurde, aufgetrennt. Nach dem Trocknen der Gele wurden diese auf entweder Phosphoimagerplatten oder Röntgenfilmen (Kodak X-Omat AR) für 1-16 Stunden exponiert. Mit dem Phosphoimager FLA-3000 von Fujifilm Europe

(Düsseldorf, Deutschland) wurden die radioaktiven Signale detektiert und durch das Programm AIDA Version 3.52.046 quantifiziert.

3.12 Quervernetzungsexperimente mit rekombinantem AFG1L1

Die Quervernetzung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Arazi für 30 min bei 21 °C (Arazi et al., 1995). Dabei wurde rekombinantes AFG1L1 in einer Konzentration von 4 µM in An- oder Abwesenheit von 8 µM Calmodulin mit 2 mM des 0 Å-Quervernetzungsreagenz 1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimid Hydrochlorid (EDC) und 5 mM Sulfo-*N*-Hydroxysulfosuccinimid (S-NHS) behandelt. Die Quervernetzung wurde dabei entweder in Anwesenheit von Calcium in 50 mM HEPES/KOH, pH 7,6, 0,1 mM CaCl₂ oder im gleichen Puffer mit 5 mM EDTA/EGTA statt Calcium durchgeführt. Die Reaktion wurde anschließend durch Zugabe von SDS-Solubilisierungspuffer gestoppt. Nach Auftrennung über SDS-PAGE wurden die Reaktionsprodukte erfolgte die Analyse mittels Immundekoration mit α-AFG1L1.

3.13 Co-Immunopräzipitation

100 µl eines polyklonalen Antikörpers (siehe 2.8) wurde mit 100 µl ProteinA Sepharose für 1 h unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Matrix mit zehnfachem Säulenvolumen 200 mM Natriumborat, pH 9,0 gewaschen. Das Quervernetzungsreagenz Dimethylpimelimidat wurde zu einer Endkonzentration von 20 mM zugegeben und für 30 min mit dem Säulenmaterial unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 200 mM Ethanolamin, pH 8,0 gestoppt und für weitere 120 min inkubiert. Das so vorbereitete Säulenmaterial wurde anschließend für die Co-Immunopräzipitation verwendet.

Dafür wurden Chloroplasten von *A. thaliana* isoliert und fraktioniert. Die Proteine einer chloroplastidären Subfraktion wurden dann für 3 h bei 21 °C mit der Antikörper-gekoppelten ProteinA Sepharose unter leichtem Schütteln inkubiert. Das Säulenmaterial wurde zuerst dreimal mit dem zehnfachen Säulenvolumen IP-Puffer (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % Nonidet P40) gewaschen. Danach folgte ein Waschschriff mit dem gleichen Puffer ohne Nonidet P40. An-

schließlich wurden die gebundenen Proteine durch 2 % SDS eluiert, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Silberfärbung analysiert.

3.14 Computeranalyse

Die für diese Arbeit genutzten Programme für die Vorhersage der intrazellulären Lokalisierung von Proteinen, von Calmodulin-Bindedomänen und die Proteinsekundärstruktur sind mit ihrem Verwendungszweck und ihrer Adresse in folgender Tabelle angegeben.

Tabelle 1: Liste der benutzten Programme für die intrazelluläre Lokalisierung, die Vorhersage und Modellierung von Calmodulin-Bindedomänen und für die Vorhersage von Sekundärstrukturen

| Name | Verwendung | Adresse |
|---|---|---|
| Predotar (Small, 2004) | Intrazelluläre Lokalisierung | http://urgi.versailles.inra.fr/predotar/predotar.html |
| TargetP (Emanuelsson et al., 2007) | Intrazelluläre Lokalisierung | http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/ |
| iPSORT (Bannai et al., 2002) | Intrazelluläre Lokalisierung | http://hc.ims.u-tokyo.ac.jp/iPSORT/ |
| MitoProtII (Claros and Vincens, 1996) | Intrazelluläre Lokalisierung | http://ihg2.helmholtz-muenchen.de/ihg/mitoprot.html |
| WolfPSORT (Horton et al., 2007) | Intrazelluläre Lokalisierung | http://wolfpsort.org/ |
| MultiLoc (Hoglund et al., 2006) | Intrazelluläre Lokalisierung | http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc/ |
| The Calmodulin Target Database (Yap et al., 2000) | Vorhersage von Calmodulin- Bindemotiven | http://calcium.uhnres.utoronto.ca/ctdb/flash.htm |
| NPS@ (Network Protein Sequence Analysis) (Combet et al., 2000) | Sekundär- struktur- vorhersage | http://npsa-pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=/NPSA/npsa_server.html |
| Phyre (Protein Homology/ Analogy Recognition Engine) (Bennett-Lovsey, 2008) | Sekundär- struktur- vorhersage | http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/~phyre/index.cgi |

3.15 Fluoreszenzmikroskopie

Mit dem Konfokalen Laserscanning Mikroskop TCS-SP5 von Leica (Wetzlar, Deutschland) mit der Software LAS AF wurden die Fluoreszenzsignale detektiert und analysiert.

4 Ergebnisse

Chloroplasten der Landpflanzen besitzen ein Vesikeltransportsystem eukaryotischen Ursprungs (Westphal et al., 2001). Der Nachweis für die Existenz dieses Transportsystems beruht im Wesentlichen auf elektronenmikroskopischen Untersuchungen. Hinweise auf mögliche Komponenten wurden durch Inhibitionsstudien erhalten, jedoch konnte bisher keiner der beteiligten Faktoren auf Proteinebene identifiziert werden. Ziel dieser Arbeit war es, basierend auf den Ergebnissen der Inhibitionsversuche, solche Proteinkomponenten aufzureinigen und zu charakterisieren.

4.1 Isolierung Calmodulin-bindender Proteine durch Affinitätschromatographie

Es wurde postuliert, dass die Fusion der von der inneren Chloroplastenhüllmembran abgeschnürten Vesikel mit der Thylakoidmembran von Calmodulin reguliert wird. Es sollten daher in diesem Teil der Arbeit Komponenten des chloroplastidären Vesikeltransports identifiziert werden, die mit Calmodulin interagieren. Solche Komponenten sollten entweder als lösliche Proteine im Stroma vorliegen oder mit dem Ort der Vesikelfusion, der Thylakoidmembran, assoziiert sein. Um diese Proteine zu identifizieren, wurde eine Affinitätschromatographie mit stromalen Proteinen und extrinsischen Thylakoidmembranproteinen an Calmodulin-Agarose durchgeführt (Bonza et al., 1998; Chigri et al., 2006). Proteine, die Calmodulin binden können, werden in diesem „Pull-down“ Assay spezifisch an den Calmodulin-Liganden der Matrix gebunden. Die Affinitätschromatographie wurde in Anwesenheit von Calcium durchgeführt, da die meisten Proteine calcium-abhängig mit Calmodulin interagieren (Rhoads and Friedberg, 1997). Um die Calmodulin-Zielproteine anschließend von der Säulenmatrix zu eluieren, wurde diese mit 2 % SDS behandelt. Die Proteine in den Eluaten wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert (Abbildung 1).

Wurde die Aufreinigung mit stromalen Proteinen (Abbildung 1a, Spur E) durchgeführt, konnten zwei deutliche Proteinbanden bei etwa 55 kDa und 40 kDa detek-

tiert werden. Darüber hinaus war eine weitere, diffuse Proteinbande bei etwa 16 kDa im Eluat sichtbar. Bei der Aufreinigung mit extrinsischen Thylakoidmembranproteinen (Abbildung 1b, Spur E) konnten ebenfalls zwei deutliche Proteinbanden bei etwa 50 kDa und 40 kDa sowie zwei diffuse Proteinbanden bei etwa 30 kDa und 16 kDa detektiert werden.

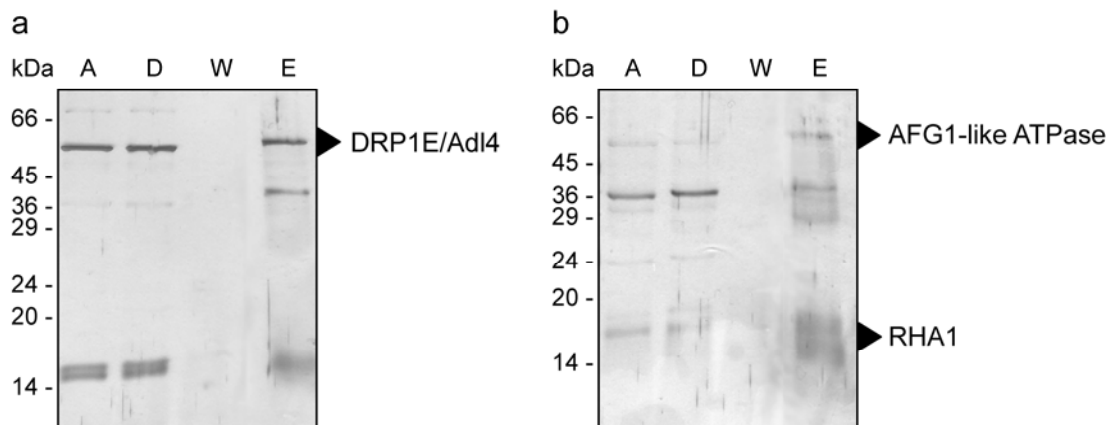


Abbildung 1: Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose

Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose wurde entweder mit (a) stromalen Proteinen oder (b) extrinsischen Thylakoidmembranproteinen durchgeführt. Nach der Elution mit 2 % SDS erfolgte die Analyse der verschiedenen Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung. A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Waschfraktion mit Calmodulin-Bindungspuffer; E: Eluate

Proteine in den oben genannten Gelbereichen wurden aus dem Gel extrahiert und massenspektroskopisch analysiert. Für die 55 kDa Bande des stromalen Eluates (Abbildung 1a, Spur E) konnte eine Masse identifiziert werden, die einem Peptid des Dynamin-related Protein 1E (DRP1E alias Adl4; At3g60190) zugeordnet werden konnte. Für die diffuse Bande im Eluat der extrinsischen Thylakoidmembranfraktion (Abbildung 1b, Spur E) bei etwa 16 kDa ergab die massenspektroskopische Analyse eine Peptidmasse, die auf das Genprodukt von *AT5G45130* passte. Dabei handelt es sich um ein kleine GTPase, die unter der Bezeichnung Rab Homolog 1 bzw. RHA1 bekannt ist. Bei der etwa 50 kDa großen Proteinbande im gleichen Eluat (Abbildung 1b, Spur E) konnten die erhaltenen Peptidmassen

dem Genprodukt von *AT4G30490* zugeordnet werden, das für eine AAA⁺-ATPase namens AFG1-like ATPase Family Protein kodiert. Die anderen Proteine konnten massenspektroskopisch nicht identifiziert werden. In Tabelle 2 sind die isolierten Proteine mit ihrem AGI-Code und den sie identifizierenden Peptidmassen zusammengefasst.

Tabelle 2: Liste der durch Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose identifizierten Calmodulin-bindenden Zielproteine

| Name | AGI-Code | Peptidsequenzen |
|---|-----------|--|
| Dynamamin-related Protein 1E / Adl4 | At3g60190 | TYVDKPNCIILAISPANQDIATSDAIK |
| Rab Homolog 1 / RHA1 | At5g45130 | GAAAAIIVFDITNQASFER |
| AFG1-like ATPase Family Protein / AFG1L1 | At4g30490 | GLYLYGGVGTGK; DLFLPFISLK; LTSAEQGFYFIGK; ISNGELMTGDICQISALR |

4.1.2 Charakterisierung der durch Affinitätschromatographie identifizierten Calmodulin-bindenden Proteine mittels GFP-Fusion

Die drei durch Affinitätschromatographie isolierten Proteine DRP1E/Adl4, RHA1 und AFG1L1 wurden mit dem Grün-fluoreszierenden Protein (GFP) fusioniert, um sie transient in Protoplasten aus Tabak zu exprimieren. Dies stellt eine geeignete Methode dar, um die Lokalisierung der Proteine *in vivo* zu untersuchen und eine mögliche chloroplastidäre Lokalisierung zu verifizieren. Dafür wurden Mesophyll-Protoplasten von *N. tabacum* isoliert. Die jeweilige cDNA, die für die Vollängenformen der Proteine kodiert, wurde in einen geeigneten Vector kloniert, so dass sich C-terminal im gleichen Leserahmen die kodierende Sequenz des GFP anschließt. Eventuell vorhandene N-terminale Transitpeptide sind hierbei nötig für die korrekte Translokation der Proteine. Mit diesen Konstrukten erfolgte dann die transiente Transformation der Protoplasten. Die Fluoreszenzsignale der exprimier-

ten Proteine wurden anschließend mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop detektiert (Abbildung 2).

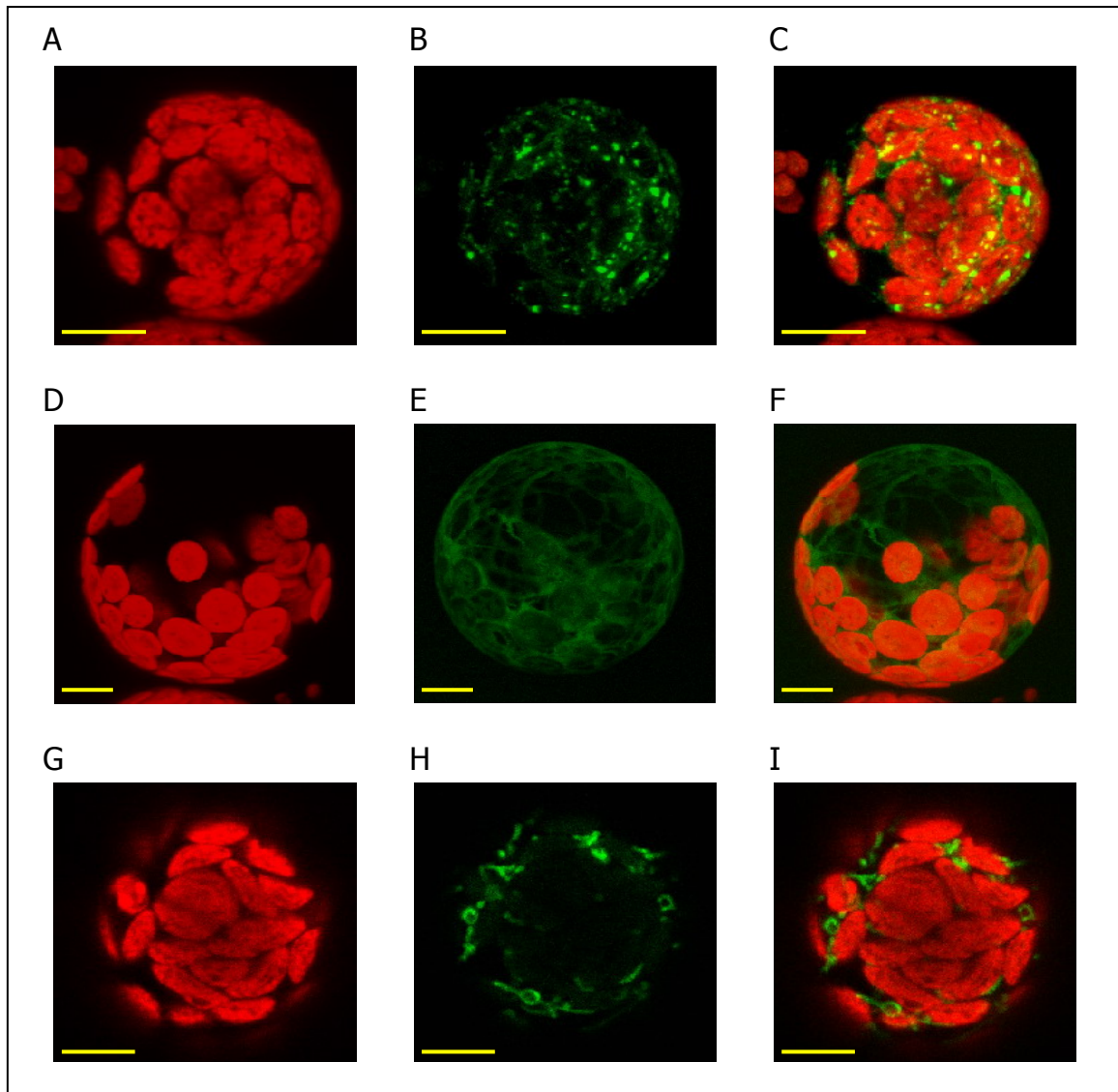


Abbildung 2: Transiente Transformation von *N. tabacum* Protoplasten mit GFP-Fusionsproteinen

Die GFP-Fusionsproteine von DRP1E/Adl4 (A, B, C), RHA1 (D, E, F) und AFG1L1 (G, H, I) wurden transient in Mesophyll-Protoplasten von *N. tabacum* exprimiert. A, D, G: Chlorophyllautofluoreszenz; B, E, H: GFP-Fluoreszenz; C, F, I: Überlagerung beider Signale; der gelbe Balken entspricht 10 µm

Bei den Untersuchungen zeigt sich die Autofluoreszenz der Chlorophylle in den Chloroplasten in Rot und stellt eine guten internen Marker für die Chloroplasten dar (Abbildung 2A, D und G). Die Fluoreszenz des GFP erfolgt im Grünbereich bei 560 nm (Abbildung 2B, E und H) und kann zur besseren Analyse mit der Autofluoreszenz überlagert werden (Abbildung 2C, F und I).

Für die große GTPase DRP1E/Adl4 konnte das GFP-Signal in kleinen, gleichmäßig in der Zelle verteilten Strukturen detektiert werden, die nicht mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten in Korrelation gebracht werden konnten (Abbildung 2B). Es ist daher davon auszugehen, dass die GTPase DRP1E/Adl4 wahrscheinlich nicht in Chloroplasten lokalisiert ist. Das GFP-Signal der kleinen GTPase RHA1 konnte als fragile, netzartige Struktur, die die komplette Zelle durchzieht, detektiert werden (Abbildung 2E). Auch hier gibt es keine Übereinstimmung mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten (Abbildung 2F). Somit wird wahrscheinlich, dass die GTPase RHA1 unter den gegebenen Versuchsbedingungen ebenfalls nicht in Chloroplasten lokalisiert ist. Sie scheint vielmehr mit dem Zytoskelett der Zelle assoziiert zu sein. Das GFP-Signal der ATPase AFG1L1 (Abbildung 2H) konnte in kleinen runden Strukturen detektiert werden, die manchmal miteinander verbunden scheinen und nicht mit der Autofluoreszenz korrelieren (Abbildung 2I). Demnach belegt auch dieser Versuch keine chloroplastidäre Lokalisierung. Durch das GFP-Signal erscheint es jedoch wahrscheinlich, dass die ATPase in einem anderen endosymbiotischen Organell, dem Mitochondrium, lokalisiert ist.

Neben dieser *in vivo* Methode zur Untersuchung der Lokalisierung der Calmodulin-bindenden Proteine wurden *in vitro* Importexperimente in isolierte Chloroplasten durchgeführt. Dabei ergab sich für die große GTPase DRP1E/Adl4 eine leichte Assoziation mit den Oberflächenrezeptoren der Chloroplasten. Dennoch konnte keine eindeutige Translokation des Proteins detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Die kleine GTPase RHA1 hingegen war unter den gegebenen Versuchsbedingungen weder in der Lage, an die Chloroplasten zu binden, noch zu translozieren (Daten nicht gezeigt). Im Gegensatz dazu unterstützten erste Importexperimente mit der ATPase AFG1L1 deren chloroplastidäre Lokalisierung (siehe Kapitel 4.5). Daher wurde dieses Protein in den folgenden Kapiteln genauer untersucht.

4.2. Charakterisierung von AFG1L1

Das Genprodukt von *AT4G30490* ist in der Arabidopsis Information Resource Datenbank (TAIR; <http://www.arabidopsis.org>) als AFG1-like ATPase Family Protein annotiert. Es gibt zwar keine Angaben über den biologischen Prozess, an dem At4g30490 beteiligt sein könnte, aber für seine molekulare Funktion wird eine ATPase Aktivität vorhergesagt. Erstmals wurde ein Protein namens AFG1 in *S. cerevisiae* beschrieben und darin als „ATPase Family Gene“ bezeichnet (Lee and Wickner, 1992). In der gleichen Arbeit wurde ein Sequenzvergleich mit anderen Proteinen durchgeführt. Dadurch konnte gezeigt werden, dass AFG1 vermutlich ATPase Aktivität besitzt. Außerdem zeigt AFG1 Homologie auch über die ATPase Domäne hinaus zur Superfamilie der AAA⁺-ATPasen, zu der auch Sec18p und CDC48p gehören (Lee and Wickner, 1992). Die isolierte AFG1-like ATPase aus *A. thaliana* wird im Folgenden als AFG1-like ATPase 1, kurz AFG1L1, bezeichnet.

4.2.1 Sekundärstrukturanalyse von AFG1L1

Um nun AFG1L1 weiter zu charakterisieren, wurde zunächst untersucht, ob dieses Protein tatsächlich ein Homolog zu AFG1 aus *S. cerevisiae* ist. Dafür wurde mit den Aminosäuresequenzen beider Proteine ein Sequenzvergleich erstellt (BLAST2, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/bl2seq/wblast2.cgi>). Es konnte dadurch gezeigt werden, dass eine Identität von nur etwa 30 % besteht, während ca. 45 % chemisch verwandter Aminosäuren vorliegen. Auf dieser Ebene ist die Homologie von AFG1L1 aus *A. thaliana* zu AFG1 aus *S. cerevisiae* nicht stark ausgeprägt. Außerhalb einiger weniger konservierter Domänen zeichnen sich AAA⁺-ATPasen jedoch weniger durch ihre Homologie auf Ebene der Primärstruktur als durch ihre konservierte Sekundärstruktur aus (Iyer et al., 2004). Daher wurde der weitere Abgleich zwischen AFG1L1 und AFG1 auf struktureller Ebene durchgeführt. Dafür kann eine 200 bis 250 Aminosäuren lange Domäne heran gezogen werden, die alle AAA⁺-ATPasen besitzen. Diese so genannte AAA-Domäne, die nicht nur die Mitglieder dieser Familie charakterisiert, sondern sie auch von anderen P-loop NTPasen unterscheidet (Hanson and Whiteheart, 2005), besteht aus einer speziellen Abfolge von α -Helices und β -Strängen mit charakteristischen Motiven für die Bin-

dung und Hydrolyse von ATP (Walker et al., 1982). Dies sind die Walker A und B Motive, sowie die Sensoren 1 und 2 und ein Arginin-Finger.

Somit wurde nun auf Sekundärstrukturebene untersucht, ob AFG1L1 aus *A. thaliana* ebenfalls eine solche AAA-Domäne mit den benötigten Charakteristika besitzt und sich dadurch eine Homologie zu AFG1 aus *S. cerevisiae* ableiten lässt. Dafür wurde zuerst mit Hilfe der Datenbanken NPS@ und Phyre die Sekundärstruktur beider Proteine analysiert (Abbildung 3). Sowohl für AFG1L1 als auch für AFG1 konnte dabei eine Struktur von fünf α -Helices im Wechsel mit fünf β -Strängen, gefolgt von vier α -Helices modelliert werden (Abbildung 3, α 1-8, β 1-5), welche der typischen AAA-Domäne entspricht. Diese Vorhersage wurde anschließend mit einer Strukturanalyse verschiedener AAA⁺-ATPasen kombiniert (Iyer et al., 2004). Damit konnte die Modulation der AAA-Domäne von AFG1L1 weiter bestätigt werden.

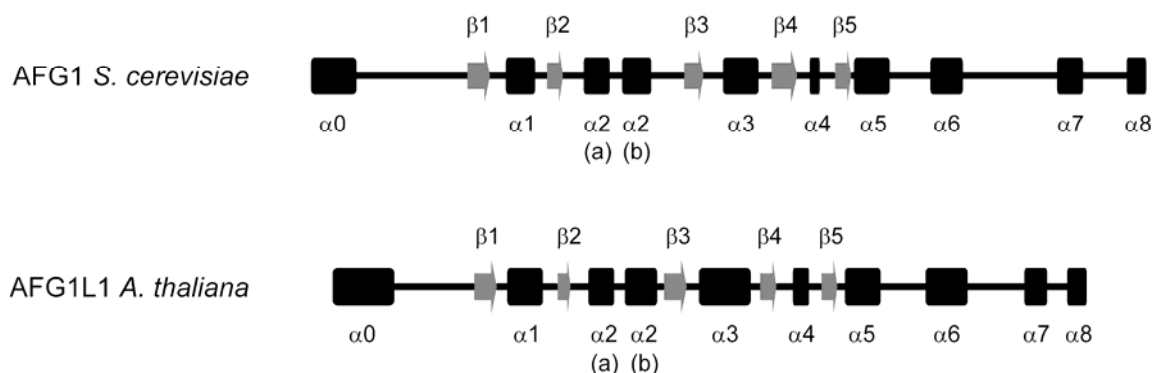


Abbildung 3: Sekundärstrukturvergleich der AAA-Domänen von AFG1 aus *S. cerevisiae* und AFG1L1 aus *A. thaliana*

Ein Modell der Sekundärstruktur der AAA-Domänen von AFG1 aus *S. cerevisiae* und AFG1L1 aus *A. thaliana* wurde nach Iyer (Iyer et al., 2004) und den Datenbanken NPS@ und Phyre erstellt. Dabei ergibt sich für beide Proteine die für AAA⁺-ATPasen charakteristische Abfolge von α -Helices und β -Strängen. α : α -Helix; β : β -Strang

Durch diese Analyse wird ersichtlich, dass AFG1L1 aus *A. thaliana* eine sehr ähnliche Abfolge von α -Helices und β -Strängen aufweist wie AFG1 aus *S. cerevisiae*. Da diese Abfolge charakteristisch für die AAA-Domäne der AAA⁺-ATPasen ist (Hanson and Whiteheart, 2005), lässt sich schlussfolgern, dass auch AFG1L1 tatsächlich zur gleichen Familie der AAA⁺-ATPasen gehört wie AFG1 aus *S. cerevisiae*.

Im weiteren wurde die Sekundärstruktur der AFG1L1 genauer untersucht. C-terminal zur AAA-Domäne (Aminosäuren 109-389) konnten dabei weitere α -Helices und β -Stränge modelliert werden (ab der 390. bis zur 497. Aminosäure). Dabei konnte jedoch nicht die charakteristische Abfolge für die AAA-Domäne beobachtet werden. Deshalb handelt es sich hierbei nicht um eine zweite AAA-Domäne, wie sie für Unterfamilie der AAA-ATPasen mit Sec18p und CDC48p charakteristisch wäre. Auch hier zeigt sich die Homologie zu AFG1 aus Hefe, welches ebenfalls keine zweite AAA-Domäne besitzt. Da diese Domäne keine Homologie zu anderen bekannten Domänen aufweist, wird sie im weiteren als C-terminale Domäne CD bezeichnet (Abbildung 4, CD).

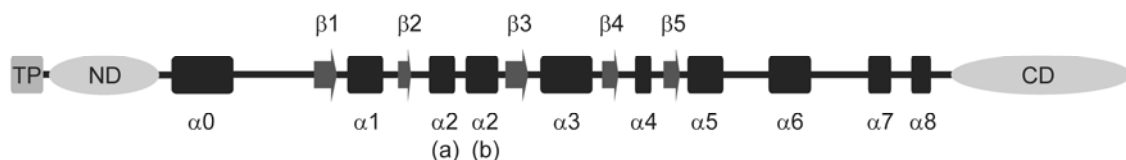


Abbildung 4: Sekundärstruktur von AFG1L1 aus *A. thaliana*

Mit Hilfe der Datenbanken NPS@ und Phyre wurde die Sekundärstruktur von AFG1L1 aus *A. thaliana* untersucht. Die AAA-Domäne ist mit ihrer charakteristischen Abfolge der α -Helices und β -Strängen maßstabsgetreu dargestellt, die N- und C-terminalen Domänen nur schematisch. α : α -Helix; β : β -Strang; ND: N-terminale Domäne; CD: C-terminale Domäne; TP: Transitpeptid

Es konnte darüber hinaus eine weitere Domäne aus drei α -Helices bestimmt werden, die N-terminal zur AAA-Domäne liegt. Diese Domäne umfaßt die Aminosäuren von Position 61 bis 108. Diese Region existiert ebenfalls in allen

AAA⁺-ATPasen. Sie wird als N-terminale Domäne ND (Abbildung 4, ND) bezeichnet und ist oft an der Substratbindung beteiligt (Erzberger and Berger, 2006). Zusätzlich gibt es am N-Terminus des Proteins eine 60 Aminosäuren lange Region, die keine Homologie zu bekannten Proteinen aufweist. Da AFG1L1 aus Chloroplasten isoliert wurde, handelt es sich dabei höchstwahrscheinlich um das Transitpeptid (Abbildung 4, TP).

Nachdem auf Sekundärstrukturebene gezeigt werden konnte, dass das isolierte AFG1L1 aus *A. thaliana* die für die AAA⁺-Superfamilie charakteristische Abfolge der α -Helices und β -Stränge in der AAA-Domäne aufweist, wurde anschließend auf Ebene der Aminosäuren untersucht, ob sich auch die für AAA⁺-ATPasen typischen Motive (Walker A und B, Sensor 1 und 2, Arginin-Finger) identifizieren lassen. Das Walker A Motiv ist durch GXXXXGK[T/S] (X repräsentiert eine beliebige Aminosäure) charakterisiert und interagiert direkt mit den Phosphaten von ATP (Neuwald et al., 1999). Dieses Motiv ist in AFG1L1 ab der 168. Aminosäure mit der Sequenz GGVGTGKT zu finden (Abbildung 5, Walker A). Das Walker B Motiv (hhhhDE) setzt sich aus einer Abfolge von vier hydrophoben Aminosäuren (h), gefolgt von Aspartat (D) und Glutamat (E) zusammen. Aspartat koordiniert Mg²⁺-Ionen, die für die ATP Hydrolyse benötigt werden, und Glutamat aktiviert Wasser für diese Reaktion (Iyer et al., 2004). Auch dieses Motiv (ILLCLDE) kann ab der 226. Aminosäure in AFG1L1 gefunden werden (Abbildung 5, Walker B). C-terminal zum Walker B Motiv schließt sich eine weitere strukturell-konservierte Region an, die als „Second region of homology“ (SRH) bezeichnet wird. Sie ist nicht in allen AAA⁺-ATPasen gleich stark konserviert, wird aber durch bestimmte Elemente wie das N-terminale Sensor 1 Motiv und den C-terminalen Arginin-Finger charakterisiert (Iyer et al., 2004). Das Sensor 1 Motiv besitzt eine polare Aminosäure, die zusammen mit den Aminosäuren des Walker B Motivs mit dem γ -Phosphat von ATP interagiert. Dieses Motiv mit Threonin als polarer Aminosäure ist von der 260. bis zur 268. Aminosäure in AFG1L1 zu finden (Abbildung 5, Sensor 1). Der charakteristische Arginin-Finger, der mit der Nucleotidbindetasche einer anderen AAA-Domäne interagieren kann, befindet sich an Position 292 (Abbildung 5, Arginin-Finger). Nahe dem C-Terminus der AAA-Domäne befindet sich das Sensor 2 Motiv (Position 348 bis 356), dessen Aminosäuren ebenfalls an der Nucleotidbindung beteiligt sind. Die in diesem Motiv

konservierte Aminosäure Arginin kann ebenfalls in AFG1L1 an Position 350 gefunden werden (Abbildung 5, Sensor 2).

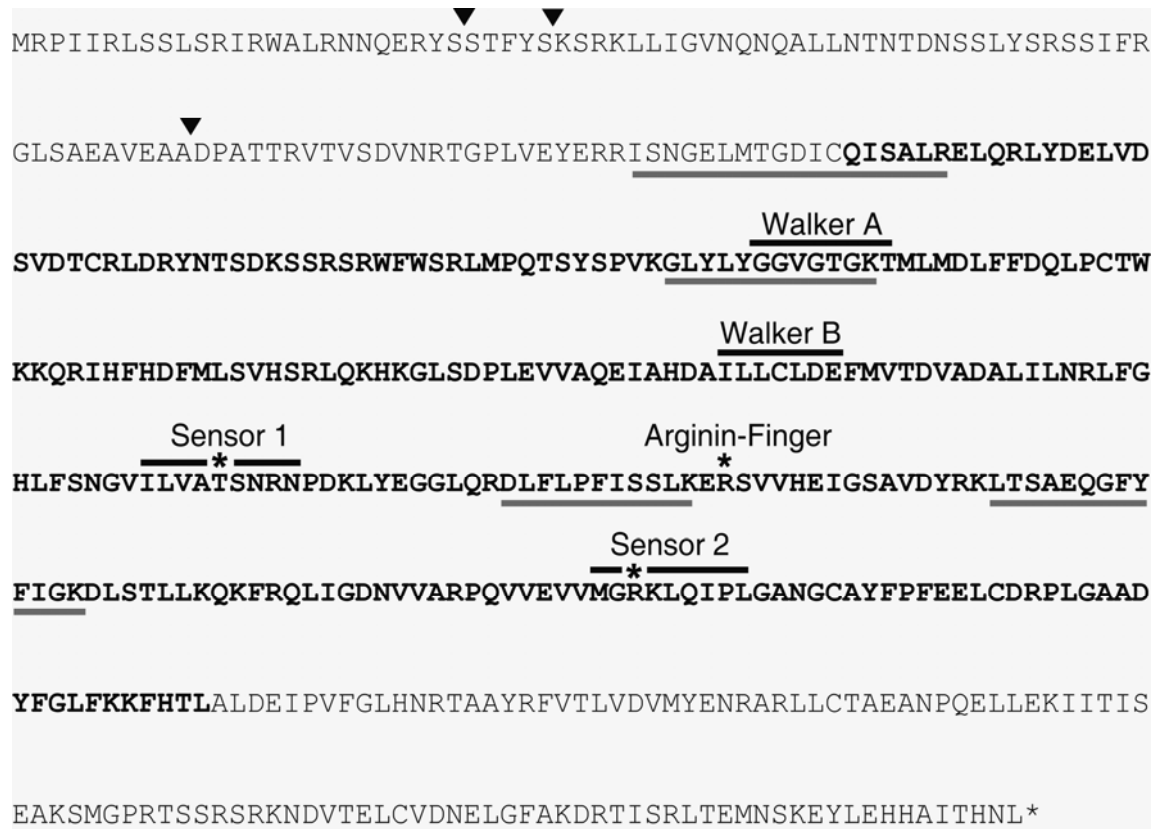


Abbildung 5: Aminosäuresequenz von AFG1L1 aus *A. thaliana*

Dargestellt ist die Aminosäuresequenz von AFG1L1 (Quelle: The Arabidopsis Information Resource) mit den für AAA⁺-ATPasen charakteristischen Motiven (schwarze Balken; *: die dafür essentiellen Aminosäuren). Ebenso sind die Prozessierungsstellen der vorhergesagten Transitpeptide mit einem Pfeil angegeben sowie die aus Massenspektrometrie abgeleiteten Peptidsequenzen (graue Balken). Die AAA-Domäne ist hervorgehoben.

Es konnte somit für AFG1L1 nicht nur die charakteristische Abfolge von α -Helices und β -Strängen der AAA-Domäne identifiziert werden, sondern es konnten darüber hinaus auch alle Motive zur Bindung und Hydrolyse von ATP, die für ATPasen der AAA⁺-Superfamilie ebenfalls essentiell sind, gezeigt werden. Zusammengenommen kann aus den Ergebnissen gefolgert werden, dass es sich bei AFG1L1 um ein Ho-

molog zu AFG1 aus Hefe und um ein Mitglied der Unterfamilie der AFG1-like Proteine der AAA⁺-ATPasen handelt.

4.2.2 Untersuchung der Sublokalisierung von AFG1L1 mittels Vorhersageprogrammen

Durch die Sekundärstrukturanalyse von AFG1L1 konnte gezeigt werden, dass dieses Protein eine N-terminale Sequenzverlängerung aufweist, die in anderen AAA⁺-ATPasen nicht existiert. Da AFG1L1 aus einer Fraktion extrinsischer Thylakoidmembranproteine isoliert wurde, erscheint es möglich, dass diese Sequenz für den Import in Chloroplasten genutzt wird. Um diese Hypothese zu testen, wurde eine bioinformatische Analyse mit Computerprogrammen zur Vorhersage der Sublokalisierung von Proteinen durchgeführt. Diese Programme wurden mit einem großen Datensatz von Proteinen trainiert, die mittels ihrer N-terminalen Transitsequenz in verschiedene Kompartimente eukaryotischer Zellen transloziert werden. Für die Analyse wurden die Programme Predotar, TargetP, iPSORT, MitoProtII, WolfPSORT und MultiLoc verwendet. Eine Zusammenfassung der Analyse ist in Tabelle 3 dargestellt. Das Programm iPSORT postulierte für AFG1L1 prinzipiell eine organelläre Lokalisierung. Aufgrund des isoelektrischen Punktes der potentiellen Präsequenz von 7,202 präferierte das Programm jedoch eine Lokalisierung im Mitochondrium. Dieses Programm gab zusätzlich eine Prognose für die Prozessierungsstelle der Präsequenz. Diese wird mit einer Länge von 30 Aminosäuren vorhergesagt (Abbildung 5, Pfeil 2). Auch das Vorhersageprogramm TargetP sah eine mitochondriale Lokalisierung von AFG1L1 bei mittlerer (Klasse 3) Wahrscheinlichkeit voraus (Klassen 1 bis 5; wobei Klasse 1 die mit der höchsten Zuverlässigkeit ist). Die vorhergesagte Prozessierungsstelle der Präsequenz liegt dabei nach der 25. Aminosäure (Abbildung 5, Pfeil 1). Eine Lokalisierung im Mitochondrium wurde ebenfalls durch das Programm MitoProtII mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,9337 prognostiziert. Die durch dieses Programm definierte Präsequenz hat eine Länge von 73 Aminosäuren (Abbildung 5, Pfeil 3). Auch das Programm Predotar postulierte für AFG1L1 eine mitochondriale Lokalisierung mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,81. WolfPSORT ist das einzige Vorhersageprogramm, das zwar eine Lokalisierung von AFG1L1 in einem endosymbiotischen Organell prognostizierte. Es

konnte aber keine eindeutige Zuordnung treffen, da von den 14 nächsten verwandten Proteinen von AFG1L1 sechs im Chloroplasten und sieben im Mitochondrium lokalisiert sind. Mit einer Wahrscheinlichkeit von 0,39 entschied sich MultiLoc als einziges Programm für eine Lokalisierung von AFG1L1 im Chloroplasten.

Tabelle 3: Untersuchung zur intrazellulären Lokalisierung von AFG1L1 mittels verschiedener Vorhersageprogramme

Die Analyse wurde mit der Sequenz des Volllängenproteins AFG1L1 durchgeführt. Nur die Programme, die eine Lokalisierung in einem Organell vorhersagen, wurden berücksichtigt.

| Programm | Vorhersage der Lokalisierung | | Zuverlässigkeit (Prozessierungsstelle) |
|------------|------------------------------|---------------|---|
| | Chloroplasten | Mitochondrien | |
| iPSORT | | x | 7,20 ^a (30) |
| TargetP | | x | RC 3 ^b (25) |
| MitoProtII | | x | 0,9337 ^c (73) |
| Predotar | | x | 0,81 ^d |
| WolfPSORT | x | x | 6,0 C / 7,0 M ^e |
| MultiLoc | x | | 0,39 ^f |

C: Chloroplasten; M: Mitochondrien; x: positive Lokalisierung; die Länge des Transitpeptids ist in Klammern angegeben; ^a: Grenzwert für Mitochondrien $\geq 6,21$; ^b: Zuverlässigkeitsklasse; ^c/^d/^f: Wahrscheinlichkeit; ^e: Anzahl verwandter Proteine mit chloroplastidärer bzw. mitochondrialer Lokalisierung

Überraschenderweise ergaben die Vorhersageprogramme eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine mitochondriale Lokalisierung von AFG1L1. Dies kann zwar in Einklang mit dem Ergebnis der *in vivo* Lokalisierung durch die Fusion von AFG1L1 mit GFP gebracht werden, steht jedoch im Widerspruch zur Isolierung des Proteins aus einer chloroplastidären Subfraktion. Somit wurde die genaue Lokalisierung von AFG1L1 im Weiteren experimentell durch *in vitro* Importexperimente in isolierte Chloroplasten und Mitochondrien überprüft.

4.3 Import von pAFG1L1 in Chloroplasten

Wie eingangs beschrieben, wurde die AAA⁺-ATPase AFG1L1 aus Chloroplasten von *A. thaliana* isoliert. Da fast alle chloroplastidären Proteine im Kern kodiert werden (Leister, 2003), müssen sie somit nach der Translation an cytosolischen Ribosomen post-translational in den Chloroplasten importiert werden (Soll and Schleiff, 2004). Es wurden deshalb *in vitro* Importexperimente in isolierte Chloroplasten durchgeführt, um die Lokalisierung von AFG1L1 eindeutig zu bestimmen.

4.3.1 Zeitabhängiger Import von pAFG1L1

Zuerst wurde durch *in vitro* Translation mit ³⁵S-Methionin das AFG1L1-Protein radioaktiv markiert synthetisiert (Abbildung 6, TL). Dieses Vorstufenprotein von AFG1L1 inklusive der potentiellen Transitsequenz (pAFG1L1) wurde anschließend in *in vitro* Importstudien in isolierten Chloroplasten von *P. sativum* eingesetzt. Dazu wurde es bei 25 °C unter Standardbedingungen in steigender Dauer mit den Chloroplasten inkubiert (Abbildung 6). Die Hälfte jedes Reaktionsansatzes wurde mit der Protease Thermolysin behandelt, während die andere Hälfte unbehandelt blieb (Abbildung 6, +/-Th). Da Thermolysin unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht membranpermeabel ist, werden nur diejenigen Proteine proteolytisch abgebaut, die oberflächlich an der äußeren Hüllmembran gebunden sind. Proteine hingegen, die in den Chloroplasten importiert wurden, sind vor dem proteolytischen Abbau geschützt.

Nach 0 Minuten Importreaktion von pAFG1L1 in der nicht mit Thermolysin behandelten Probe (Abbildung 6, 0 min, -Th) konnte eine etwa 55 kDa große Bande detektiert werden, deren Intensität mit zunehmender Dauer des Importes zunahm (Abbildung 6, Vergleich 5, 10, 20, 30 min, -Th). Sie verschwand jedoch in den mit Thermolysin behandelten Proben (Abbildung 6, 0, 5, 10, 20, 30 min, +Th). Da diese Bande der Größe des eingesetzten Translationsproduktes von pAFG1L1 (Abbildung 6 TL) entspricht, lässt sich daraus schließen, dass das Vorstufenprotein von AFG1L1 (pAFG1L1) an die Oberflächenrezeptoren der Chloroplasten binden kann.

Neben dem Vorstufenprotein konnte nach 5 min eine weitere, etwa 50 kDa große Bande detektiert werden, deren Stärke ebenfalls mit Dauer des Importes zunahm (Abbildung 6, Vergleich 5, 10, 20, 30 min). Diese neue Bande wurde durch die Behandlung mit Thermolysin im Gegensatz zur Vorstufenform pAFG1L1 nicht degradiert (Abbildung 6, Vergleich -/+Th). Dies deutet darauf hin, dass dieses 50 kDa große Protein im Inneren des Chloroplasten lokalisiert und deshalb vor dem proteolytischen Abbau durch Thermolysin geschützt ist. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um die mature Form von AFG1L1 (mAFG1L1) handelt, deren Transitsequenz nach dem Import abgespalten wurde. Dies stimmt mit der Tatsache überein, dass Vorhersageprogramme für AFG1L1 eine solche Transitsequenz postulieren.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das Vorstufenprotein von AFG1L1 (pAFG1L1) *in vitro* in isolierte Chloroplasten importiert werden kann. Es besitzt für den Import eine Transitsequenz, die nach der Translokation in das Innere des Organells abgespalten wird, wodurch die mature Form von AFG1L1 (mAFG1L1) entsteht.

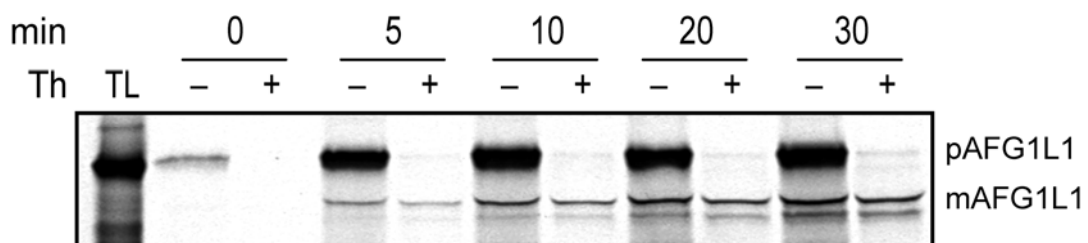


Abbildung 6: Zeitabhängiger Import von pAFG1L1 in Chloroplasten

Der Import in isolierte Chloroplasten (10 µg Chlorophyll) wurde in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem pAFG1L1 für 0-30 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung der Chloroplasten wurde die Hälfte des Ansatzes mit Thermolysin behandelt. Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

4.3.2 Inhibierung des Importes von pAFG1L1 mit Ophiobolin A

Wie durch den zeitabhängigen Import gezeigt werden konnte, besitzt pAFG1L1 eine Transitsequenz, die nach der Translokation im Inneren des Chloroplasten prozessiert wird. Dies deutet darauf hin, dass pAFG1L1 über den „generellen Importweg“ mittels TOC und TIC transloziert wird. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden die Chloroplasten vor dem Import mit Ophiobolin A behandelt. Dies ist ein spezifischer Inhibitor von Calmodulin (Leung *et al.*, 1984) und inhibiert den Import derjenigen chloroplastidären Proteine, die mittels einer Transitsequenz über beide Translokasen, TOC und TIC, importiert werden (Chigri *et al.*, 2005). Ophiobolin A verhindert die Anbindung von Calmodulin an Tic32, eine Komponente des TIC Komplexes, und scheint dadurch den Tic-Komplex zu destabilisieren (Chigri *et al.*, 2006).

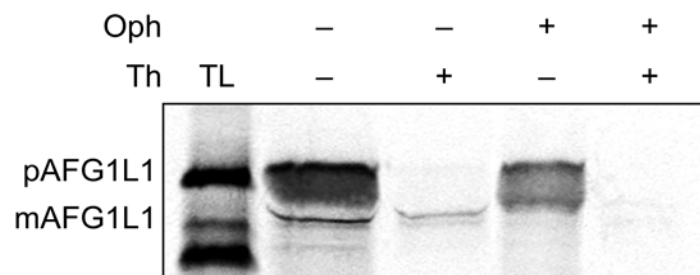


Abbildung 7: Import von pAFG1L1 in mit Ophiobolin A vorbehandelte Chloroplasten

Der Import wurde mit ³⁵S-markiertem pAFG1L1 mit oder ohne Vorbehandlung mit Ophiobolin A (-Oph/+Oph) durchgeführt. Nach Reisolierung der Chloroplasten wurde eine Hälfte des Ansatzes mit Thermolysin behandelt. Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, Oph: Ophiobolin A, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

Das ³⁵S-markierte Vorstufenprotein pAFG1L1 wurde wiederum nach Standardbedingungen mit entweder unbehandelten oder mit für 30 min bei 25 °C mit 100 µM Ophiobolin A (Oph) vorbehandelten Chloroplasten inkubiert (Abbildung 7, +/-

Oph). Die Hälfte der Importansätze wurde anschließend mit Thermolysin behandelt, um nicht-importiertes Vorstufenprotein proteolytisch abzubauen. Wurde der Import mit unbehandelten Chloroplasten durchgeführt, konnte das protease-stabile mature Protein nachgewiesen werden (Abbildung 7, -Oph). Nach Vorbehandlung mit dem Inhibitor (Abbildung 7, +Oph, -Th) konnte das 55 kDa große pAFG1L1 jedoch nur in reduzierter Intensität, das mature AFG1L1 gar nicht detektiert werden (Abbildung 7, +Oph, -/+Th). Somit wurde der Import von pAFG1L1 vollständig durch Ophiobolin A inhibiert. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass das Vorstufenprotein über den „generellen Importweg“ in die Chloroplasten importiert wird.

4.3.3 Konkurrenz des Importes von pAFG1L1 mit pSSU

Nachdem gezeigt werden konnte, dass der Import von pAFG1L1 durch Ophiobolin A auf Höhe der inneren Hüllmembran inhibiert wird, sollte die Translokation von pAFG1L1 mittels des „generellen Importweges“ weiter verifiziert werden. Dazu wurden Konkurrenzexperimente mit einem Überschuss an rekombinantem Vorstufenprotein durchgeführt (Firlej-Kwoka et al., 2008). Das hier verwendete pSSU, die Vorstufenform der kleinen Untereinheit der RuBisCO (Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase), wurde dabei als rekombinantes, nicht radioaktiv-markiertes Protein eingesetzt. Wenn pAFG1L1 den gleichen Importweg wie pSSU nutzt, sollte es zu einer Reduktion bzw. Inhibierung des Importes der AAA⁺-ATPase kommen, da sie mit pSSU um die Rezeptoren des TOC Komplexes konkurriert.

Der Import von pAFG1L1 wurde vergleichend sowohl ohne den Kompetitor (Abbildung 8, 0 µM) als auch in Anwesenheit steigender Konzentrationen von pSSU durchgeführt (Abbildung 8, 2,5-10 µM). Ab einer Konzentration von 2,5 µM des Kompetitors konnten sowohl das 55 kDa große Vorstufenprotein von AFG1L1 als auch das etwa 50 kDa große mature AFG1L1-Protein nur in reduzierter Intensität detektiert werden (Abbildung 8, 2,5 µM). Diese Reduktion beider Proteine verstärkte sich mit steigender Konzentration des Kompetitors (Abbildung 8, Vergleich 5, 7,5, 10 µM). Bei Zugabe von 10 µM rekombinanten pSSU in die Importreaktion konnte das mature AFG1L1 überhaupt nicht mehr detektiert werden.

Die starke Reduktion sowohl der Anbindung der Vorstufenform pAFG1L1 an den Chloroplasten als auch der Bildung des muren AFG1L1 (mAFG1L1) bestätigt, dass pAFG1L1 mit pSSU um den Import in Chloroplasten konkurriert. Dies bestätigt somit, dass die AAA⁺-ATPase mittels des „generellen Importweges“ über die Translokasen der äußeren und inneren Hüllmembran TOC und TIC importiert wird.

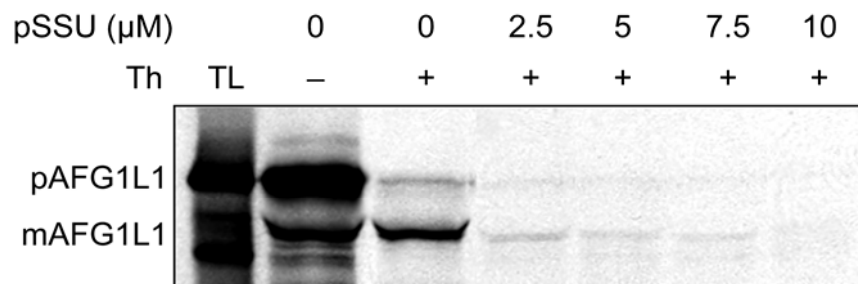


Abbildung 8: Konkurrenz des Importes von pAFG1L1 mit pSSU

Der Import in isolierte Chloroplasten (10 µg Chlorophyll) wurde in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem pAFG1L1 und 0-10 µM pSSU für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung der Chloroplasten wurden diese mit Thermolysin behandelt. Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, pSSU: rekombinantes Vorstufenprotein von SSU, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

4.3.4 Sublokalisierung von mAFG1L1 in Chloroplasten

Die bisherigen Ergebnisse haben gezeigt, dass AFG1L1 tatsächlich im Chloroplasten lokalisiert ist. Der Import alleine lässt aber keine Rückschlüsse auf die Lokalisierung des Proteins innerhalb des Organells zu. Um zu untersuchen, ob das mature Protein mAFG1L1 im Inneren des Chloroplasten als lösliches Protein vorliegt oder ob es sich um ein Membranprotein handelt, wurden die Chloroplasten nach dem Import in eine lösliche und eine Membran-Fraktion aufgetrennt.

Dazu wurden die Chloroplasten nach einem Import unter Standardbedingungen reisoliert und mit Thermolysin behandelt, um das an der äußeren Hüllmembran

gebundene und nicht importierte Vorstufenprotein pAFG1L1 proteolytisch zu entfernen. Anschließend wurde die Fraktionierung in lösliche Proteine und Membranproteine durchgeführt. Das 50 kDa große mature AFG1L1 (mAFG1L1) konnte ausschließlich in der Fraktion der löslichen chloroplastidären Proteine (Abbildung 9, S) detektiert werden, während es in der Membran-Fraktion (Abbildung 9, M) nicht nachgewiesen werden konnte.

Dieses Resultat, in Kombination mit den vorherigen Ergebnissen (4.3.1 bis 4.3.3), macht es naheliegend, dass das mature AFG1L1 ein stromales Protein ist. Weitere Versuche müssen zeigen, wie dies mit der Aufreinigung des Proteins aus einer Fraktion extrinsischer Thylakoidproteine zu vereinbaren ist.

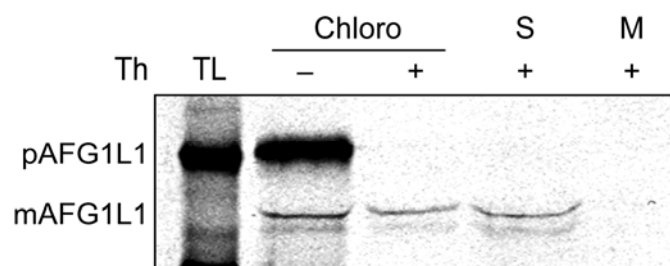


Abbildung 9: Fraktionierung der Chloroplasten nach dem Import mit pAFG1L1

Der Import wurde mit ^{35}S -markiertem pAFG1L1 für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung und Thermolysinbehandlung der Chloroplasten wurden diese lysiert und in lösliche und Membranproteine getrennt. Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, Chloro: Chloroplasten, S: lösliche Proteinfraction, M: Membranproteinfraction, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

4.4 Import von pAFG1L1 in Mitochondrien

Im Gegensatz zu den Importstudien und der Aufreinigung legen die durchgeführten GFP-Fusionsexperimente nahe, dass AFG1L1 *in vivo* in den Mitochondrien von *N. tabacum* Protoplasten lokalisiert ist. Ebenso spricht die bioinformatische Untersuchung zur intrazellulären Lokalisierung von AFG1L1 dafür, dass dieses Protein zusätzlich zur chloroplastidären Lokalisierung auch in Mitochondrien lokalisiert sein könnte. Da auch die meisten mitochondrialen Proteine im Zytosol translatiert werden, müssen sie ebenfalls zurück in das Organell transportiert werden (Milenkovic et al., 2007). Deshalb wurden *in vitro* Importexperimente in isolierte Mitochondrien von *P. sativum* durchgeführt, um genauer zu untersuchen, ob AFG1L1 tatsächlich auch in Mitochondrien lokalisiert ist.

4.4.1 Zeitabhängiger Import von pAFG1L1

Nach der Synthese des Vorstufenproteins von AFG1L1 mit ³⁵S-radioaktiv markiertem Methionin wurde pAFG1L1 zunächst mit steigender Dauer in einer Importreaktion mit isolierten Mitochondrien eingesetzt (Abbildung 10). Die Hälfte jedes Reaktionsansatzes wurde anschließend mit der Protease Thermolysin (Abbildung 10, -/+Th) behandelt, die nur die oberflächlich an der äußeren Membran gebundenen Vorstufenproteine proteolytisch abbaut. Die in das Innere der Mitochondrien importierten, maturen Proteine sind geschützt, da die Protease unter den gegebenen Versuchsbedingungen nicht membranpermeabel ist.

Genau wie im Falle der Chloroplasten konnte auch hier in der nicht mit Thermolysin behandelten Probe (Abbildung 10, 0 min, -Th) nach 0 Minuten eine etwa 55 kDa große Bande detektiert werden, deren Intensität mit ansteigender Dauer des Importes zunahm (Abbildung 10, Vergleich 1; 2,5; 5; 10; 15 min, -Th). Im Gegensatz dazu verschwand sie jedoch in den mit Thermolysin behandelten Proben (Abbildung 10, 0; 1; 2,5; 5; 10; 15 min, +Th). Dies lässt den Schluss zu, dass das Vorstufenprotein von AFG1L1 (pAFG1L1) auch an die Oberflächenrezeptoren der Mitochondrien binden kann. Nach 2,5 min konnte neben dem Vorstufenprotein wiederum eine etwa 50 kDa große Bande detektiert werden. Auch diese Bande nahm mit Dauer des Importes zu (Abbildung 10, Vergleich 5, 10, 15 min) und wurde durch die Behandlung mit Thermolysin nicht beeinflusst (Abbildung 10,

Vergleich -/+Th). Es ist daher davon auszugehen, dass es sich bei dieser Bande um die mature Form von AFG1L1 handelt.

Dieses Ergebnis zeigt, dass pAFG1L1 *in vitro* in das Innere der Mitochondrien importiert werden kann, da es vor der Proteolyse durch Thermolysin geschützt ist. AFG1L1 ist demnach nicht ausschließlich im Chloroplasten, sondern auch in Mitochondrien lokalisiert.

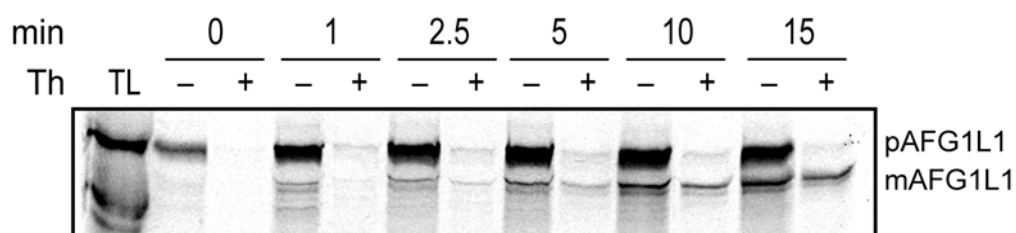


Abbildung 10: Zeitabhängiger Import von pAFG1L1 in Mitochondrien

Der Import in isolierte Mitochondrien (50 µg Protein) wurde in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem pAFG1L1 für 0-15 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung der Mitochondrien wurden diese mit Thermolysin behandelt. Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

4.4.2 Inhibierung des Importes von pAFG1L1 mit Valinomycin

Durch den zeitabhängigen Import von pAFG1L1 in Mitochondrien konnte gezeigt werden, dass das Protein mittels abspaltbarer Präsequenz importiert. Dies lässt vermuten, dass pAFG1L1 über die innere Mitochondrienmembran entweder in die Matrix oder lateral in die Membran transloziert wird. Der Transport von Proteinen über oder in die innere Mitochondrienmembran ist vom Membranpotential $\Delta\Psi$ abhängig. Dadurch wird zum einen das kanal-bildende Protein Tim23 aktiviert, zum anderen übt der elektrochemische Gradient einen elektrophoretischen Effekt auf die positiv geladenen Präsequenzen aus (Truscott et al., 2001; Krayl et al., 2007). Durch diese Abhängigkeit kann der Translokationsweg von pAFG1L1 durch Vorbe-

handlung der Mitochondrien mit Valinomycin untersucht werden. Da dieser membranpermeable Ionencarrier spezifisch Kaliumionen transportiert, kommt es zum Zusammenbruch des Membranpotentials und somit zum Erliegen des Importes derjenigen Proteine, die über oder in die innere Membran transloziert werden (Schleyer et al., 1982).

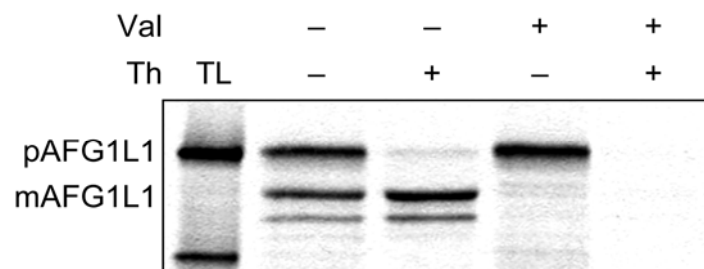


Abbildung 11: Import von pAFG1L1 in mit Valinomycin vorbehandelte Mitochondrien

Der Import in isolierte Mitochondrien (50 µg Protein) wurde mit ³⁵S-markiertem pAFG1L1 in Ab- und Anwesenheit von Valinomycin (-Val/+Val) für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung der Mitochondrien wurde eine Hälfte des Ansatzes mit Thermolysin behandelt. Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, Val: Valinomycin, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

Die Mitochondrien wurden deshalb für 20 min auf Eis mit 1 µM Valinomycin inkubiert, bevor der Import nach Standardbedingungen durch Zugabe des Vorstufenproteins von AFG1L1 gestartet wurde. In der Importreaktion mit unbehandelten Mitochondrien (Abbildung 11, -Val) konnten sowohl das Vorstufenprotein pAFG1L1 als auch das mature, thermolysin-resistente AFG1L1 detektiert werden (Abbildung 11, -Val, +Th). Wurden die Mitochondrien jedoch mit Valinomycin vorbehandelt, konnte das mature AFG1L1 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 11, +Val).

Dieses Ergebnis zeigt, dass die Entstehung des muren AFG1L1 durch die Behandlung der Mitochondrien mit Valinomycin komplett inhibiert wird. Somit ist der Import von pAFG1L1 vom Membranpotential $\Delta\Psi$ abhängig. Daraus kann geschlossen werden, dass pAFG1L1 tatsächlich über oder in die innere Membran der Mitochondrien transloziert wird.

4.4.3 Konkurrenz des Importes von pAFG1L1 mit pF₁β

Auch dieses Ergebnis wurde durch Konkurrenzexperimente mit einem mitochondrialen Vorstufenprotein (pF₁β) untermauert. Die β-Untereinheit des löslichen Teils der mitochondrialen ATP-Synthase (F₁β) besitzt eine 53 Aminosäuren lange Präsequenz, die für den Import mittels des „generellen Importweges“ verantwortlich ist (Dessi et al., 1996; Moberg et al., 2004). Wenn pAFG1L1 ebenfalls über diese Translokasen importiert wird, sollte es mit pF₁β um die Anbindung an die TOM Komplexe konkurrieren. Folglich wird eine Reduktion oder auch komplette Inhibierung der Translokation von pAFG1L1 eintreten.

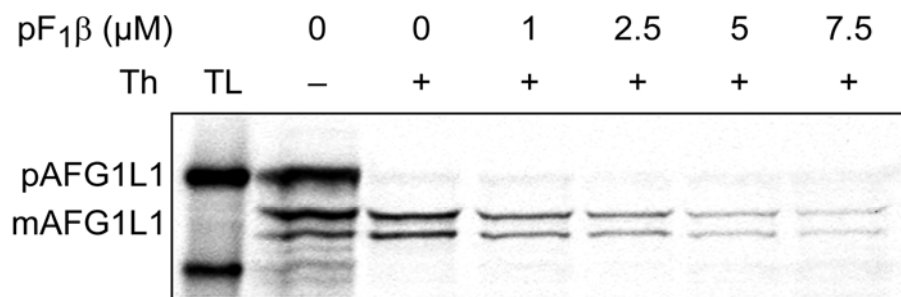


Abbildung 12: Konkurrenz des Importes von pAFG1L1 mit pF₁β

Der Import in isolierte Mitochondrien (50 μg Protein) wurde in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem pAFG1L1 und 0-7,5 μM pF₁β für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung der Mitochondrien wurden diese mit Thermolysin behandelt. Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, pF₁β: rekombinantes Vorstufenprotein von F₁β, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

Dazu wurde der Import wie in der Standardimportreaktion mit pAFG1L1-Vorstufenprotein ohne den rekombinanten Kompetitor pF₁β (Abbildung 12, 0μM) sowie mit steigenden Konzentrationen an pF₁β durchgeführt (Abbildung 12, 1-7,5 μM). War pF₁β im Importansatz vorhanden, wurde bereits bei einer Konzentration von 2,5 μM pF₁β die Menge an gebildetem mAFG1L1 im Vergleich zur Negativkontrolle um etwa 80 % reduziert (Abbildung 12, 2,5 μM); ab 7,5 μM konnte kaum noch mAFG1L1 detektiert werden (Abbildung 12, 7,5 μM).

Dies zeigt, dass es in Anwesenheit des Kompetitors zu einer deutlichen Reduktion der Importeffizienz von pAFG1L1 kommt. Somit kann bestätigt werden, dass pAFG1L1 mittels des „genellen Importweges“ über die TOM und TIM23 Komplexe in Mitochondrien transloziert wird.

4.4.4 Sublokalisierung von mAFG1L1 in Mitochondrien

Neben den Proteinen, die in die Matrix der Mitochondrien transloziert werden, besitzen auch einige integrale Proteine der inneren Membran eine abspaltbare Präsequenz. Diese wird allerdings von einem hydrophoben Sortierungssignal gefolgt, das zum Abstoppen der Translokation im TIM23 Komplex innerhalb der inneren Membran führt und anschließend zum lateralen Entlassen des Proteins (Chacinska et al., 2005). Obwohl ein solches Sortierungssignal in der Präsequenz von pAFG1L1 fehlt, sollte die intra-organelläre Lokalisierung in der Matrix auch experimentell bestätigt werden.

Dafür wurden die Mitochondrien nach dem Import von pAFG1L1 und anschließender Proteasebehandlung in die Proteinfractionen der äußeren und der inneren Membran sowie in die Fraktionen der löslichen Proteine des Intermembranraumes und der Matrix aufgetrennt. In den Fraktionen sowohl der Proteine des Intermembranraumes (Abbildung 13, IMS) als auch der Proteine der äußeren Membran (Abbildung 13, OM) konnte mAFG1L1 nicht detektiert werden. Dagegen konnte der größte Anteil des protease-geschützten mAFG1L1 in der Fraktion der Matrixproteine nachgewiesen werden (Abbildung 13, MTX). Ein kleiner Anteil von mAFG1L1 ist auch in der Fraktion der inneren Membran detektierbar (Abbildung 13, IM). Hierbei handelt es sich höchstwahrscheinlich um eine Kontamination mit Matrixproteinen.

Dieser Versuch lässt den Schluss zu, dass das mature AFG1L1 nicht nur in Chloroplasten, sondern auch in den Mitochondrien als lösliches Protein vorliegt, und zwar in diesem Fall in der Matrix.

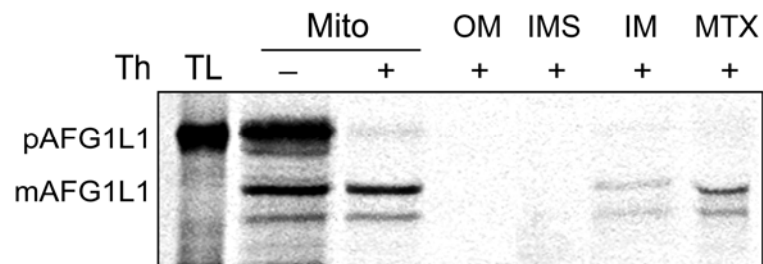


Abbildung 13: Fraktionierung der Mitochondrien nach dem Import mit pAFG1L1

Der Import in isolierte Mitochondrien (50 µg Protein) wurde mit ³⁵S-markiertem pAFG1L1 für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung und Thermolysinbehandlung wurden die Mitochondrien lysiert und fraktioniert. Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, Mito: Mitochondrien, OM: äußere Membran, IMS: Intermembranraum, IM: innere Membran, MTX: Matrix, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

4.5 Prozessierung des Signalpeptids und Dualer Import von pAFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien

Wie gezeigt werden konnte, transloziert AFG1L1 *in vitro* in Chloroplasten und Mitochondrien, wobei jeweils ein Teil des N-terminalen Bereichs des Proteins von den Prozessierungspeptidasen der Organellen entfernt wird. Um das Importverhalten von pAFG1L1 in Bezug auf dessen Prozessierung weiter zu charakterisieren, wurden die separat durchgeführten Importreaktionen in Chloroplasten (Abbildung 14, Chloro) bzw. Mitochondrien (Abbildung 14, Mito) zum direkten Größenvergleich des maturen AFG1L1 auf einem SDS-Gel aufgetrennt.

Dabei zeigte sich, dass das mature AFG1L1, welches in beiden Organellen nach dem Import für 20 min entstand, eine identische Größe von etwa 50 kDa besitzt (Abbildung 14, Vergleich Chloro +Th mit Mito +Th).

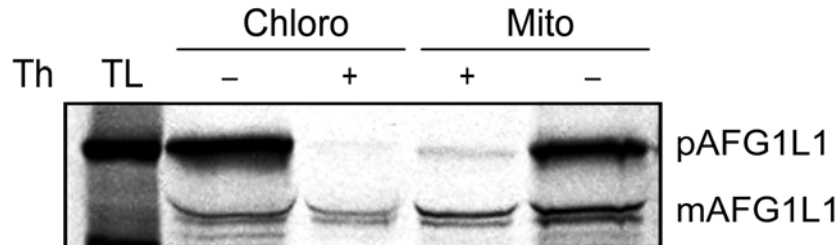


Abbildung 14: Vergleich der Prozessierung von pAFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien

Der Import in entweder isolierte Chloroplasten (10 µg Chlorophyll) oder Mitochondrien (50 µg Protein) wurde in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem pAFG1L1 für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung der Chloroplasten und Mitochondrien wurde eine Hälfte des Ansatzes mit Thermolysin behandelt. Chloro: Chloroplasten, Mito: Mitochondrien, Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

Dieser Größenvergleich des gebildeten muren AFG1L1 lässt den Schluss zu, dass AFG1L1 für seinen Import sowohl in Chloroplasten als auch Mitochondrien wahrscheinlich die gleiche Transit- bzw. Präsequenz benutzt, die darüber hinaus von der stromalen bzw. mitochondrialen Prozessierungspeptidase an identischer Stelle prozessiert wird. Die durch die Importexperimente ermittelte Prozessierungsstelle von pAFG1L1 liegt vermutlich im Bereich der 60. Aminosäure. Das Transitpeptid hat dabei eine Größe von ungefähr 5,5 kDa.

Obwohl der Import von Proteinen spezifisch für das jeweilige Organell ist, können *in vitro* einige chloroplastidäre Proteine in Mitochondrien importiert werden, während die falsche Lokalisierung (so genanntes „Mistargeting“) mitochondrialer Proteine in Chloroplasten bis jetzt nicht beschrieben ist (Hugosson et al., 1995; Lister et al., 2001). Darüber hinaus gibt es jedoch eine stetig steigende Zahl von Proteinen, die zwar als identische Vorstufenproteine exprimiert werden, anschließend aber dual in beide Organellen importiert werden (Creissen et al., 1995; Small et al., 1998).

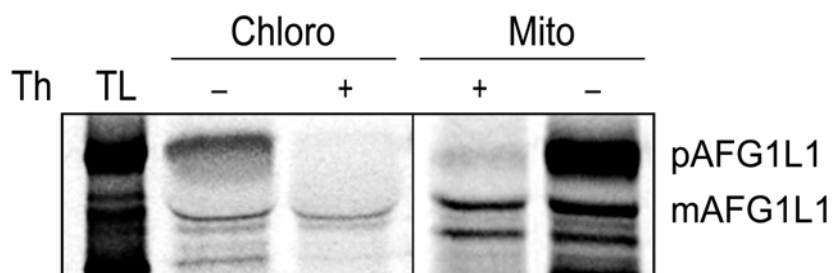


Abbildung 15: Dualer Import von pAFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien

Der duale Import in Chloroplasten (10 µg Chlorophyll) und Mitochondrien (50 µg Protein) wurde in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem pAFG1L1 für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung beider Organellen wurde eine Hälfte jedes Ansatzes mit Thermolysin behandelt. Chloro: Chloroplasten, Mito: Mitochondrien, Th: Thermolysin, pAFG1L1: Vorstufenprotein von AFG1L1, mAFG1L1: mature Form von AFG1L1, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes

Um zu bestätigen, dass es sich beim *in vitro* Import von pAFG1L1 in Mitochondrien nicht um „Mistargeting“ handelt, wurde radioaktiv-translatiertes Vorstufenprotein von AFG1L1 simultan in Chloroplasten und Mitochondrien in einem so genannten „Dual-Import System“ importiert (Pavlov et al., 2007). Dieses System ist für dual-lokalisierte Proteine geeignet, da die Anwesenheit beider Organellen anscheinend das „Mistargeting“ eigentlich chloroplastidärer Vorstufenproteine in Mitochondrien verhindert. Durch Reisolierung der Organellen voneinander nach der Importreaktion kann der Import in beide Organellen anschließend überprüft werden.

Dabei konnte sowohl bei Chloroplasten (Abbildung 15, Chloro, -Th) als auch Mitochondrien (Abbildung 15, Mito, -Th) sowohl die Anbindung des Vorstufenproteins pAFG1L1 als auch das mature AFG1L1 detektiert werden (Abbildung 16). Dies zeigt zum einen, dass das Vorstufenprotein von AFG1L1 in der Lage ist, an beide Organellen anzubinden. Darüber hinaus bestätigt dieser Versuch die tatsächliche duale Lokalisierung von AFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien.

4.6 Immunologischer Nachweis von AFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien

Nachdem Importstudien gezeigt haben, dass AFG1L1 *in vitro* in Chloroplasten und Mitochondrien transloziert werden kann und dort dann als lösliches Protein vorliegt, sollte die subzelluläre Lokalisierung experimentell weiter verifiziert werden. Dazu wurde ein Antiserum gegen die mature Form von AFG1L1 hergestellt und damit isolierte Chloroplasten und Mitochondrien aus *P. sativum* immundekoriert. Um Kontaminationen beider Organellen miteinander auszuschließen, wurde der Aufreinigung ein Percollgradient hinzugefügt. Die Subfraktionierung beider Organellen erfolgte anschließend wie unter 3.8.5 und 3.9.5 beschrieben. Für die Mitochondrien wurden die löslichen Proteine des Intermembranraumes und der Matrix sowie die Proteine der äußeren und inneren Membran vereint, um eine Fraktion von allen löslichen Proteinen (Abbildung 16, Mito S) und allen Membranproteinen (Abbildung 16, Mito M) zu erhalten. Die chloroplastidären und mitochondrialen Gesamtproteine sowie die Subfraktionen der löslichen und Membranproteine beider Organellen wurden danach über SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrocellulosemembran immobilisiert. Anschließend erfolgte die Immundekoration mit dem Antikörper gegen AFG1L1 (α -AFG1L1) und verschiedener anderer Antikörper zur Kontrolle der Reinheit der Fraktionen.

α -AFG1L1 erkannte ein etwa 50 kDa großes Protein in der Gesamtproteinfraktion der Chloroplasten (Abbildung 16, Chloro). Diese Größe stimmt mit dem kalkulierten Molekulargewicht des muren AFG1L1 von 49,6 kDa gut überein. Eine Bande gleicher Größe konnte ebenfalls in der Fraktion der löslichen Proteine der Chloroplasten nachgewiesen werden (Abbildung 16, Chloro S), während das Protein in der Fraktion der chloroplastidären Membranproteine nicht detektiert werden konnte (Abbildung 16, Chloro M). Auch in der Gesamtproteinfraktion der Mitochondrien ließ sich ein etwa 50 kDa großes Protein immundekoriieren (Abbildung 16, Mito). Darüber hinaus konnte eine weitere, etwa 6 kDa kleinere Bande detektiert werden, die wahrscheinlich ein Degradationsprodukt von AFG1L1 darstellt. In der Fraktion der löslichen Mitochondrienproteine (Abbildung 16, Mito S) konnte

ausschließlich diese Bande immundekoriert werden. Auch in der Membranproteinfraktion der Mitochondrien konnte AFG1L1 nicht detektiert werden (Abbildung 16, Mito M).

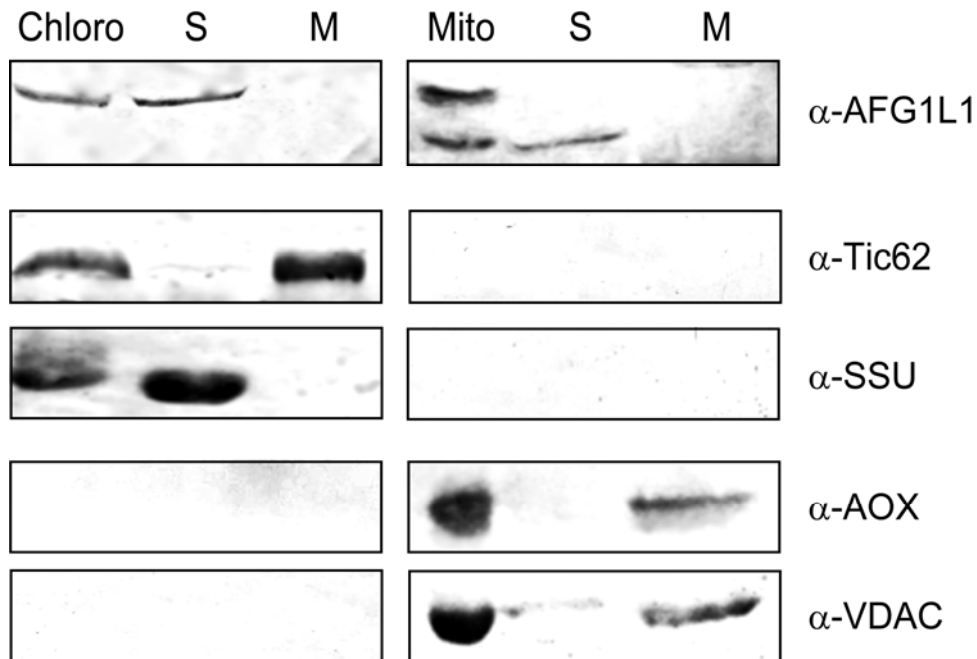


Abbildung 16: Immunlokalisierung von AFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien mittels α -AFG1L1

Gesamtproteine, lösliche Proteine und Membranproteine der Chloroplasten bzw. Mitochondrien aus *P. sativum* wurden nach ihrer Fraktionierung im SDS-Gel aufgetrennt, immobilisiert und mit einem Antikörper gegen AFG1L1 immundekoriert. Zur Kontrolle der Reinheit wurden verschiedene Antikörper gegen chloroplastidäre bzw. mitochondriale Proteine eingesetzt. Chloro: Chloroplasten; Mito: Mitochondrien; S: lösliche Proteinfraktion; M: Membranproteinfraktion

Zur Kontrolle der Reinheit wurden alle Fraktionen mit den Antikörpern α -Tic62, α -SSU, α -VDAC und α -AOX getestet. Der Antikörper gegen Tic62, einer Komponente der Translokase der inneren Chloroplastenhüllmembran, detektierte in der gesamtchloroplastidären Proteinfraktion sowie in der Fraktion der chloroplastidären Membranproteine ein Protein bei etwa 60 kDa, während der Antikörper gegen

SSU, der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase, sowohl in der Fraktion der gesamten Chloroplastenproteine als auch in der löslichen Proteinfraction ein der richtigen Größe entsprechendes Protein bei etwa 14 kDa immundekorierter (Abbildung 16, Chloro S und M). Beide Antikörper detektierten keine Proteine in den Mitochondrienproteinfractionen (Abbildung 16, Mito). Die Antikörper gegen VDAC, einem spannungsabhängigen, anionenselektiven Kanal der äußeren Mitochondrienmembran, und AOX, der Alternativen Oxidase der Mitochondrien, erkannten jeweils ein der korrekten Größe entsprechendes Protein in der Fraktion der gesamten Mitochondrienproteine (Abbildung 16, Mito). Diese Proteine konnten jeweils zusätzlich in den Membranfraktionen, aber nicht in den Fraktionen der löslichen mitochondrialen Proteine immundekorierter werden. Außerdem wurden keine Proteine in den Fraktionen der chloroplastidären Proteine detektiert (Abbildung 16, Mito S und M; Chloro S und M).

Dadurch, dass die Antikörper gegen chloroplastidäre und mitochondriale Markerproteine keine Proteine in dem jeweils anderen Organell immundekorieren konnten, wird ersichtlich, dass die Organellen sehr rein isoliert wurden. Daraus lässt sich schließen, dass das vom Antikörper gegen AFG1L1 in beiden Organellen erkannte Protein nicht auf Kontamination beruht, sondern die tatsächliche duale Lokalisierung von AFG1L1 widerspiegelt. Demnach bestätigt die Immundekoration die durch die Importexperimente ermittelte Lokalisierung von AFG1L1 in den löslichen Fraktionen der beiden endosymbiotischen Organellen.

4.7 Calmodulin-Bindung von AFG1L1

AFG1L1 wurde ursprünglich durch Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose isoliert. Ob es sich bei AFG1L1 tatsächlich um ein Calmodulin-bindendes Protein handelt, sollte im Weiteren experimentell überprüft werden.

4.7.1 Calmodulin Pull-down Assay

Der Calmodulin Pull-down Assay wurde nach modifizierter Methode von Wang an Calmodulin-Agarose durchgeführt (Wang et al., 2005). Dafür wurde matures AFG1L1 ohne die experimentell ermittelte Präsequenz (AFG1L1₆₀₋₄₉₇) heterolog exprimiert und an Ni²⁺-NTA Agarose aufgereinigt. Das rekombinante AFG1L1-Protein wurde anschließend in An- bzw. Abwesenheit von Calcium mit Calmodulin-Agarose inkubiert und nach dem Waschen kompetitiv mit einem Überschuss an exogenem Calmodulin eluiert. Die Fraktionen wurden über SDS-PAGE aufgetrennt und durch Coomassiefärbung analysiert.

War Calcium im Ansatz vorhanden (Abbildung 17, Zeile 1), konnte AFG1L1 weder im Durchlauf der Säule noch im Wasch detektiert werden. Dafür war das Protein in der durch Elution mit Calmodulin erhaltenen Fraktion nachweisbar. Dies zeigt, dass AFG1L1 in Anwesenheit von Calcium in der Lage ist, an Calmodulin-Agarose zu binden. Dass die AAA⁺-ATPase durch einen Überschuss an Calmodulin von der Säule verdrängt wird, zeigt, dass die Bindung an den Liganden und nicht unspezifisch an die Säulenmatrix erfolgt. Wurde Calcium durch EDTA/EGTA substituiert (Abbildung 17, Zeile 2), befand sich AFG1L1 komplett im Durchlauf, aber nicht in der Elutionsfraktion. Dies zeigt, dass die AAA⁺-ATPase nur calcium-abhängig an Calmodulin binden kann.

Als Kontrolle für die Spezifität des Pull-down Assays wurden Tic32, eine Komponente des TIC Komplexes der inneren Chloroplastenhüllmembran, und SSU, die kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase, eingesetzt. Tic32 dient als Positivkontrolle, da die calcium-abhängige Bindung des Proteins an Calmodulin bereits gezeigt wurde (Chigri et al., 2006). Wie erwartet, zeigte Tic 32 das gleiche Verhalten wie AFG1L1 (Abbildung 17, Zeile 3). Bei der Negativkontrolle mit SSU (Abbildung 17, Zeile 4) konnte das Protein trotz Anwesenheit von Calcium nur im Durchlauf, nicht aber in der Elutionsfraktion nachgewiesen

werden. Demnach liegt unter diesen Versuchsbedingungen keine unspezifische Assoziation von Proteinen mit dem Calmodulin-Liganden oder der Matrix vor. Somit kann bestätigt werden, dass AFG1L1 tatsächlich spezifisch und calcium-abhängig mit Calmodulin interagieren kann.

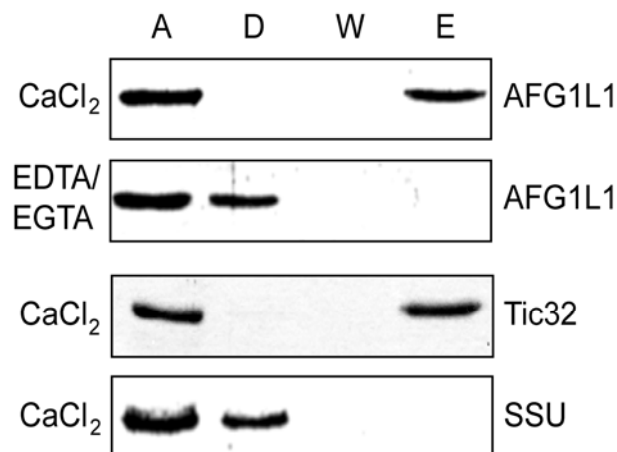


Abbildung 17: Pull-down Assay von AFG1L1 an Calmodulin-Agarose

Rekombinantes AFG1L1 wurde in Anwesenheit von Calcium (CaCl₂) oder in Abwesenheit von Calcium (EDTA/EGTA) mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Nach dem Wasch erfolgte die Elution kompetitiv mit Überschuss an Calmodulin. Zur Kontrolle der calcium-abhängigen Bindung wurden die Proteine Tic32 und SSU verwendet. A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elution

4.7.2 Quervernetzung von AFG1L1 mit EDC

Eine weitere Möglichkeit, die calcium-abhängige Bindung von AFG1L1 an Calmodulin zu bestätigen, stellt die chemische Quervernetzung dieser beiden Proteine nach der Methode von Arazi dar (Arazi et al., 1995). Rekombinantes AFG1L1 wurde dafür mit aufgereinigtem, käuflich erworbenem Calmodulin für zwei Stunden in An- oder Abwesenheit von Calcium inkubiert, bevor der Reaktionsansatz in zwei Hälften geteilt wurde. Die eine Hälfte wurde für 30 min mit dem 0 Å-Quervernetzungsreagenz EDC behandelt, das kovalente Peptidbindungen zwischen Carboxyl- und primären Aminogruppen katalysiert (Abbildung 18, +EDC, Spuren 2, 4

und 6), während die andere Hälfte unbehandelt blieb (Abbildung 18, -EDC, Spuren 1, 3 und 5). Nach der Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE erfolgte die Immundekoration mit dem Antikörper gegen AFG1L1 (α -AFG1L1).

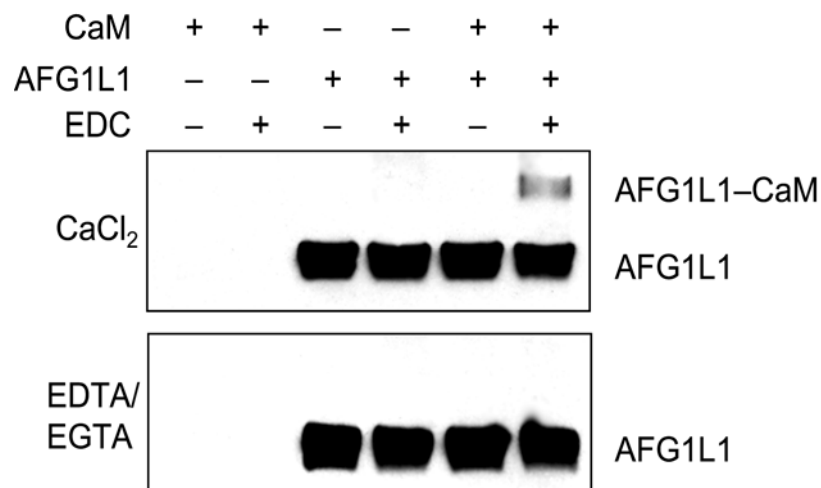


Abbildung 18: Quervernetzung von AFG1L1 mit Calmodulin durch EDC

Rekombinantes AFG1L1-Volllängenprotein (AFG1L1) wurde in Anwesenheit von Calcium (CaCl₂) oder in Abwesenheit von Calcium (EDTA/EGTA) mit dem 0 Å-Quervernetzungsreagenz EDC inkubiert. Nach Abstoppen der Reaktion durch SDS-Solubilisierungspuffer erfolgte die Immundekoration durch α -AFG1L1. CaM: Calmodulin; AFG1L1: AFG1L1-Volllängenprotein; AFG1L1-CaM: Komplex aus AFG1L1 und Calmodulin

Wurde das AFG1L1-Volllängenprotein zusammen mit Calmodulin in Anwesenheit von Calcium (Abbildung 18, CaCl₂, Spuren 5 und 6) inkubiert, konnte in der Fraktion ohne Quervernetzungsreagenz ein Protein bei etwa 50 kDa immundekoriert werden, bei dem es sich um AFG1L1 handelt. War jedoch das Quervernetzungsreagenz im Ansatz vorhanden, konnte neben AFG1L1 ein neues Quervernetzungsprodukt mit einer ungefähren Größe von 65 kDa detektiert werden. Diese durch α -AFG1L1 immundekorierbare Bande entspricht von ihrer Größe her dem Quervernetzungsprodukt des 50 kDa großen AFG1L1 und dem 16 kDa großen Calmodulin. Erfolgte die Inkubierung von AFG1L1 und Calmodulin dagegen in Abwesen-

heit von Calcium (Abbildung 18, EDTA/EGTA, Spuren 5 und 6), konnte sowohl ohne als auch mit Quervernetzungsreagenz ausschließlich AFG1L1 immundekoriert werden. Die Tatsache, dass das Quervernetzungsprodukt aus AFG1L1 und Calmodulin nur in Anwesenheit von Calcium entsteht, lässt den Schluss zu, dass die Bindung von AFG1L1 an Calmodulin ausschließlich calcium-abhängig erfolgen kann. Darüber hinaus lässt die Tatsache, dass die Bindung von AFG1L1 und Calmodulin durch ein 0 Å-Quervernetzungsreagenz katalysiert werden kann, die Vermutung zu, dass sich beide Proteine in enger Nachbarschaft befinden.

Wurden die Quervernetzungsreaktionen als Kontrolle ausschließlich mit Calmodulin (Abbildung 18, CaCl₂ oder EDTA/EGTA, Spuren 1 und 2) oder AFG1L1 (Abbildung 18, CaCl₂ oder EDTA/EGTA, Spuren 3 und 4) durchgeführt, konnte kein Quervernetzungsprodukt bei 65 kDa detektiert werden. Diese Kontrollexperimente bestätigen somit die Spezifität der calcium-abhängigen Bindung von AFG1L1 an Calmodulin.

4.7.3 Identifizierung und Charakterisierung der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1

Nachdem die calcium-abhängige Bindung von AFG1L1 an Calmodulin in zwei unabhängigen Experimenten gezeigt werden konnte, sollte diejenige Domäne innerhalb von AFG1L1 identifiziert werden, die die Bindung an Calmodulin vermittelt.

Dafür wurden neben dem maturen AFG1L1 (AFG1L1₆₀₋₄₉₇) verschiedene verkürzte Konstrukte von AFG1L1 hergestellt. Dazu gehörten zwei C-terminal verkürzte Konstrukte. Das erste umfasste die komplette AAA-Domäne (siehe Abbildung 19b, AAA-Domäne) und endete direkt vor der C-terminalen Domäne (Abbildung 19b, CD) hinter der 380. Aminosäure (AFG1L1₆₀₋₃₈₀). Das zweite Konstrukt endete hinter der 292. Aminosäure innerhalb der AAA-Domäne (AFG1L1₆₀₋₂₉₂). Zusätzlich wurden mehrere N-terminal verkürzte Konstrukte hergestellt. Eines begann direkt nach der N-terminalen Domäne (Abbildung 19b, ND) und wird als AFG1L1₁₀₃₋₄₉₇ bezeichnet. Ein zweites begann mit der 133. Aminosäure (AFG1L1₁₃₃₋₄₉₇) und ein drittes mit der 159. Aminosäure (AFG1L1₁₅₉₋₄₉₇). Alle diese AFG1L1-Konstrukte wurden heterolog exprimiert und an Ni²⁺-NTA Agarose aufgereinigt. Anschließend

wurden sie im Pull-down Assay an Calmodulin-Agarose in Anwesenheit von Calcium getestet.

Wie bereits zuvor zeigte sich eine Bindung von AFG1L1 (AFG1L1₆₀₋₄₉₇) an die Calmodulin-Agarose (Abbildung 19a1). Wurde der Assay mit den C-terminal verkürzten AFG1L1-Konstrukten AFG1L1₆₀₋₃₈₀ (Abbildung 19a2) und AFG1L1₆₀₋₂₉₂ (Abbildung 19a3) durchgeführt, konnten beide Proteine ebenfalls jeweils in den Elutionsfraktionen detektiert werden. Demnach sind beide Konstrukte in der Lage, an Calmodulin zu binden. Daraus folgt, dass sich die Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 weder in der C-terminalen Domäne noch im C-terminalen Bereich der AAA-Domäne befindet.

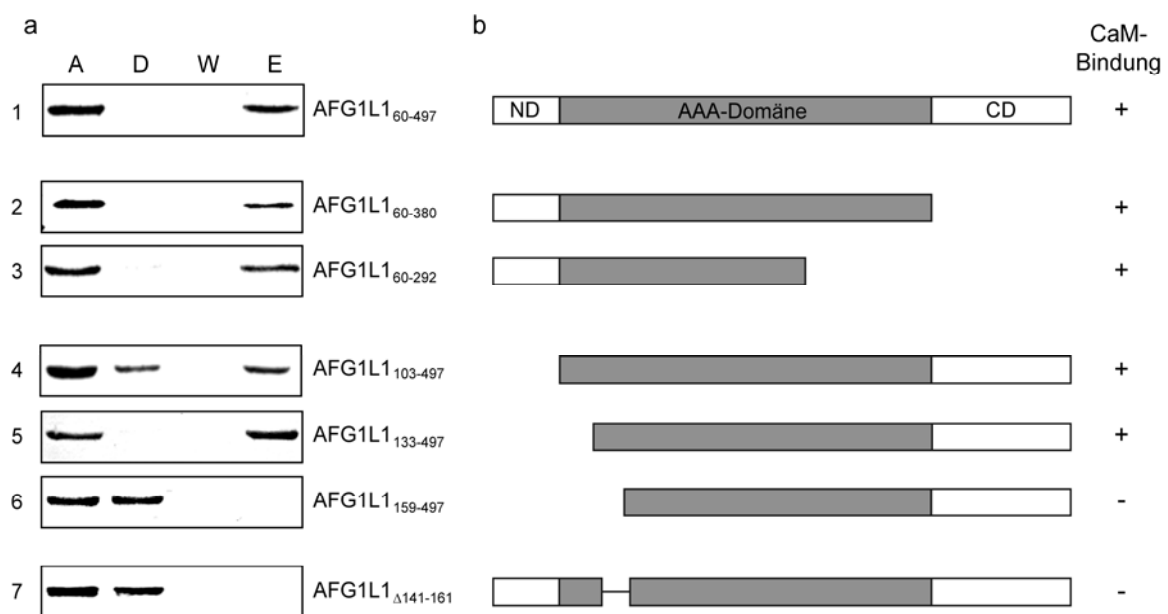


Abbildung 19: Pull-down Assay von AFG1L1-Konstrukten an Calmodulin-Agarose

a: Verschiedene rekombinante AFG1L1-Konstrukte wurden in Anwesenheit von Calcium mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Nach dem Wasch erfolgte die Elution kompetitiv mit Überschuss an Calmodulin. b: Schematische Struktur von AFG1L1 und den verkürzten AFG1L1-Konstrukten. Die Indexzahlen von AFG1L1 geben die Positionen der Aminosäuren an. A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Wasch mit Pull-down Puffer; E: Elution; ND: N-terminale Domäne; CD: C-terminale Domäne; CaM: Calmodulin; +: Bindung des Konstruktes an Calmodulin; -: keine Bindung des Konstruktes an Calmodulin

Anschließend wurde die N-terminale Domäne untersucht, da diese in einigen AAA⁺-ATPasen für die Interaktion mit Zielproteinen verantwortlich ist (Erzberger and Berger, 2006). Wurde der Pull-down Assay mit dem AFG1L1-Konstrukt (AFG1L1₁₀₃₋₄₉₇) ohne die N-terminale Domäne (Abbildung 19b, ND) durchgeführt, konnte dieses Protein wiederum in der Elutionsfraktion detektiert werden (Abbildung 19a4). Dies bedeutet, dass die Bindedomäne auch nicht in der N-terminalen Domäne von AFG1L1 lokalisiert ist.

Nachdem auch die N-terminale Domäne von AFG1L1 als Calmodulin-Bindedomäne ausgeschlossen werden konnte, wurde die AAA⁺-ATPase weiter N-terminal verkürzt. Das 30 Aminosäuren kürzere Konstrukt AFG1L1₁₃₃₋₄₉₇ (Abbildung 19a5) konnte wiederum in der Fraktion der Elution detektiert werden. Dagegen konnte das um noch weitere 26 Aminosäuren verkürzte Konstrukt AFG1L1₁₅₉₋₄₉₇ (Abbildung 19a6) im Durchlauf, aber nicht in der Elution nachgewiesen werden. Dieses Resultat legt nahe, dass der Bereich zwischen der 133. (Leucin) und der 159. (Prolin) Aminosäure die gesamte oder doch zumindest einen signifikanten Anteil der Calmodulin-Bindestelle darstellt (Abbildung 20).

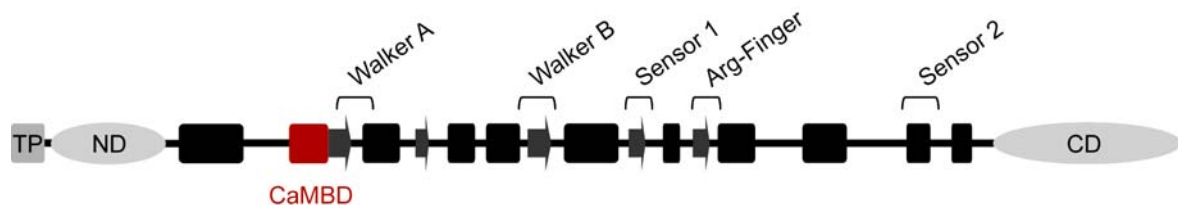


Abbildung 20: Identifizierung der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1

Schematische Darstellung der Sekundärstruktur von AFG1L1. Die Lage der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 ist durch eine rote Box angegeben. Die schwarzen Boxen und grauen Pfeile stellen die α -Helices bzw. β -Stränge der AAA-Domäne dar. TP: Transitpeptid; ND: N-terminale Domäne; CD: C-terminale Domäne; CaMBD: Calmodulin-Bindedomäne

Nachdem der Bereich zwischen Leu₁₃₃ und Pro₁₅₉ als mögliche Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 identifiziert werden konnte, sollte dieser nun genauer charakterisiert werden. Obwohl Calmoduline selber eine außergewöhnlich starke

Sequenzhomologie untereinander aufweisen, sind die Calmodulin-Bindedomänen (CaMBD) ihrer Zielproteine nicht besonders hoch konserviert (Rhoads and Friedberg, 1997). Der Vergleich bekannter CaMBD konnte jedoch einige generelle Charakteristika darstellen. So bildet die Bindestelle oft eine 20 Aminosäuren lange amphiphile α -Helix aus, die meistens eine positive Nettoladung aufweist und über eine moderate Hydrophobizität verfügt (O'Neil and DeGrado, 1990).

Für die weitere Analyse der Bindedomäne von AFG1L1 wurde daher das „Helical Wheel Applet“ (<http://cti.itc.virginia.edu/~cmg/Demo/wheelApp.html>) herangezogen. Damit wurde der Bereich der potentiellen Calmodulin-Bindedomäne zwischen der 130. und 163. Aminosäure untersucht (Abbildung 21a). Es konnte ab der 144. Aminosäure eine charakteristische amphiphile α -Helix mit positiver Nettoladung von +3 modelliert werden, die N-terminal direkt vor dem β 1-Strang mit angrenzendem Walker A Motiv endet (Abbildung 21b). Deshalb wurde anschließend ein weiteres Konstrukt von AFG1L1 hergestellt, dem die Aminosäuren von Position 141 bis 161 fehlen (AFG1L1 $_{\Delta 141-161}$). In dem damit durchgeführten Pull-down Assay (Abbildung 19a7) konnte dieses AFG1L1-Konstrukt nur im Durchlauf, nicht aber in der Elution detektiert werden. Demnach war dieses Konstrukt nicht in der Lage, an Calmodulin zu binden. Die Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 konnte somit weiter eingegrenzt und auf den Bereich zwischen der 141. und 161. Aminosäure festgelegt werden.

Da mehr als 80 % der Interaktionen zwischen Calmodulin und seinen Zielproteinen hydrophober Natur sind, gibt es innerhalb der amphiphilen α -Helices konservierte hydrophobe Aminosäuren (Zielinski, 1998). Die Anordnung dieser Aminosäuren ermöglicht die Einteilung in verschiedene Motivklassen, die von der Calmodulin Target Datenbank wie folgt angegeben werden: das 1-10-Motiv mit der Unterklasse 1-5-10, das 1-14-Motiv mit den Unterklassen 1-8-14 und 1-5-8-14 und die 1-12- und 1-16-Motive. Die Zahlen geben dabei die Positionen der konservierten hydrophoben Aminosäuren an, die restlichen Aminosäuren sind beliebig. Bei einer Analyse der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 konnten zwei mögliche Motive identifiziert werden: das 1-10- und das 1-14-Motiv (Abbildung 21c). Damit erfüllt dieser Sequenzbereich alle Voraussetzungen für eine Calmodulin-Bindedomäne.

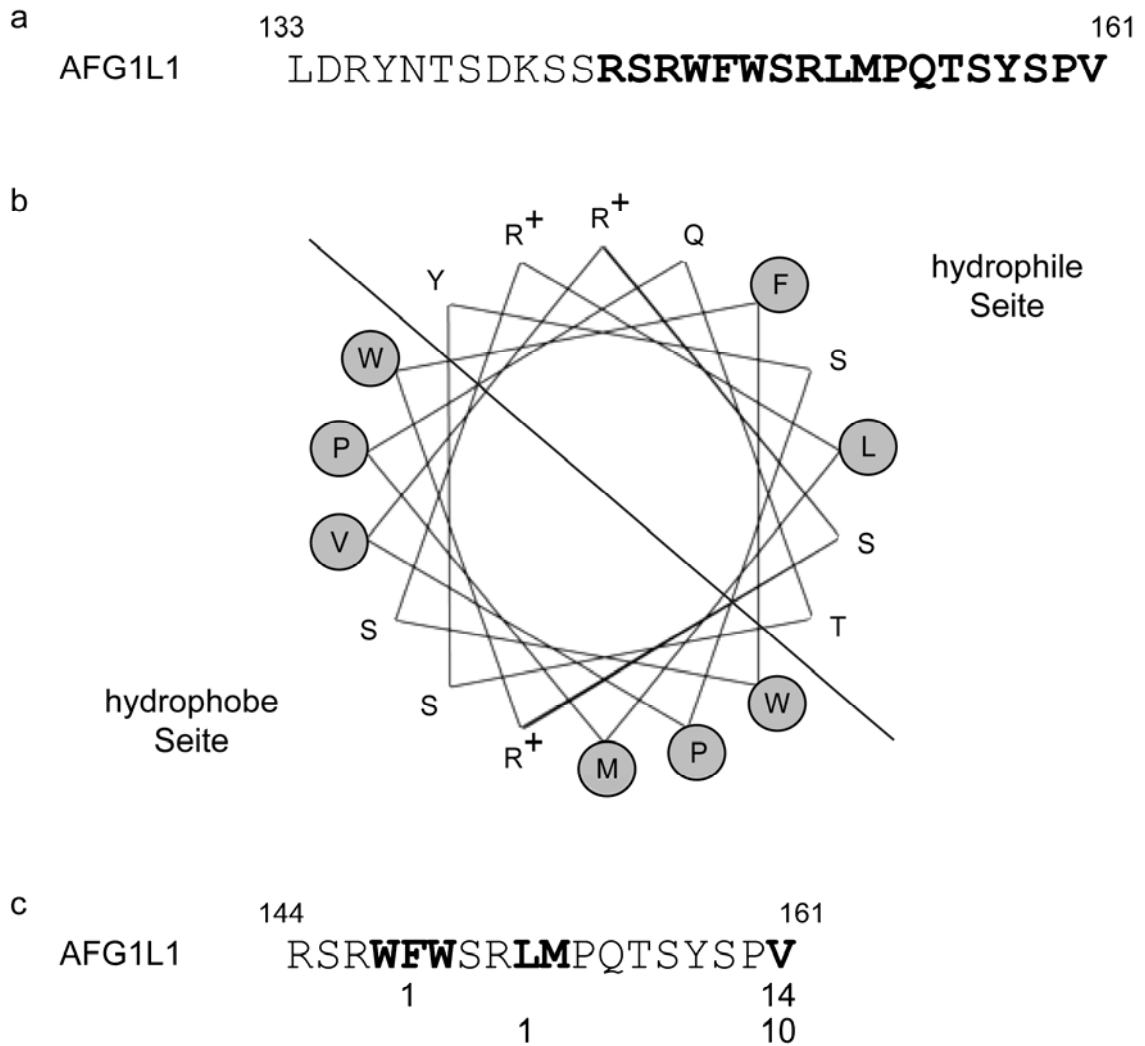


Abbildung 21: Charakterisierung der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1

a: Die Sequenz von AFG1L1 zwischen der 133. und 161. Aminosäure. Der Abschnitt der Sequenz, für den eine amphiphile α -Helix modelliert werden konnte, ist hervorgehoben. b: Mit dem „helical wheel“ Programm wurde diese Helix graphisch dargestellt. Die hydrophoben Aminosäuren sind grau hinterlegt, die positiv geladenen Aminosäuren sind mit einem + markiert. c: Die Aminosäuresequenz der potentiellen Calmodulin-Bindedomäne. Die hydrophoben Aminosäuren sind hervorgehoben und die möglichen Motive unterhalb der Sequenz dargestellt.

Anschließend wurde die Calmodulin-Bindedomäne durch Sequenzvergleiche mit pflanzlichen und nicht-pflanzlichen Homologen sowie mit einem weiteren AFG1-Homolog aus *A. thaliana* (AFG1L2, siehe Kapitel 4.10) und AFG1 aus *S. cerevisiae*

analysiert (Abbildung 22). Dabei zeigte sich für die pflanzlichen Homologe aus *P. trichocarpa* und *V. vinifera* eine starke Konservierung der Calmodulin-Bindedomäne. Durch diesen Abgleich ließ sich jedoch keine eindeutige Entscheidung zugunsten des 1-10- oder des 1-14-Motivs treffen, da auch hier beide Motive zu finden sind. Der Sequenzvergleich mit den nicht-pflanzlichen Organismen, mit AFG1L2 aus *A. thaliana* und AFG1 aus *S. cerevisiae*, zeigte für die Calmodulin-Bindedomäne so gut wie keine Homologie. Ausschließlich der Bereich des β 1-Stranges und des angrenzenden Walker A Motivs ist in allen Proteinen stark konserviert. Dies lässt die Hypothese zu, dass es sich bei der calcium-abhängigen Bindung von AFG1L1 an Calmodulin um ein Pflanzen-spezifisches Charakteristikum handeln könnte.

| | | Calmodulin-Bindedomäne | Walker A |
|-------------------------------|-----|-------------------------------------|----------|
| <i>A. thaliana</i> AFG1L1 | 144 | RSRWFWSRLMPQTSYSPVKGLYLYGGVGTGKT | |
| <i>P. trichocarpa</i> AFG1L1 | 138 | RSRWLWSRLMPQS SYSP I KGLYLYGGVGTGKT | |
| <i>V. vinifera</i> AFG1L1 | 142 | RSRWLWSRFIPQS SYSPVKGLYLYGGVGTGKT | |
| <i>A. thaliana</i> AFG1L2 | 121 | RSNWFWNKFVSHSSVSPVKGLYLYGGVGTGKT | |
| <i>S. cerevisiae</i> AFG1 | 109 | NIGAYVDVSKIG--NSIPRGVYLYGDVGC GKT | |
| <i>H. sapiens</i> AFG1L1 | 117 | NIEAEGLFSKLF SRSKPPRGLYVYGDVGTGKT | |
| <i>D. melanogaster</i> AFG1L1 | 104 | DPNAG-----SHAPQGLYLYGSVGVGKT | |

Abbildung 22: Sequenzvergleich der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 mit anderen Organismen

Sequenzvergleich der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 mit der entsprechenden Region aus anderen pflanzlichen Organismen wie *P. trichocarpa* (ABK95418), *V. vinifera* (CAN65875) und *A. thaliana* (AFG1L2, At4g28070) und mit der entsprechenden Region aus anderen nicht-pflanzlichen Organismen wie *S. cerevisiae* (NP_010862), *H. sapiens* (EAW48377) und *D. melanogaster* (NP_610780). Die zu AFG1L1 identischen Aminosäuren sind schwarz, die homologen grau hinterlegt.

4.8 Untersuchungen zur Komplexbildung von AFG1L1

Wie gezeigt werden konnte, gehört AFG1L1 zur Superfamilie der AAA⁺-ATPasen. Es ist über fast alle AAA⁺-ATPasen bekannt, dass sie in Oligomere assemblieren, um ihre biologisch aktive Form zu erlangen (Hanson and Whiteheart, 2005). Die dabei gebildeten Hexamere erfüllen zwei Funktionen. Zum einen kommen durch die Oligomerisierung die ATP-Bindestellen der AAA-Domänen in räumliche Nähe. Dies kann zu einer kooperativen ATP-Hydrolyse führen (Hattendorf and Lindquist, 2002). Zum anderen entsteht eine zentrale Pore im Inneren des Hexamers, durch die die Substrate mancher AAA⁺-ATPasen geschleust werden können (Hinnerwisch et al., 2005). Im weiteren Verlauf der Arbeit sollte untersucht werden, ob AFG1L1 als AAA⁺-ATPase ebenfalls die Fähigkeit zur Oligomerisierung besitzt. Da außerdem im letzten Kapitel gezeigt werden konnte, dass AFG1L1 calcium-abhängig an Calmodulin bindet, sollte analysiert werden, ob eine eventuelle Oligomerisierung von AFG1L1 durch Bindung an Calmodulin reguliert wird.

Zum Nachweis der Oligomerisierung wurden Quervernetzungsversuche mit rekombinantem AFG1L1 durchgeführt. Das Protein wurde entweder alleine oder in Kombination mit exogenem Calmodulin jeweils in An- bzw. Abwesenheit von Calcium inkubiert. Nach Teilung des Reaktionsansatzes wurde die eine Hälfte quervernetzt, während die andere unbehandelt blieb. Die Quervernetzung wurde mit dem 0 Å-Quervernetzungsreagenz EDC (1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid Hydrochlorid) durchgeführt. Nach dem Abstoppen der Reaktion mit SDS-Solubilisierungspuffer und Auftrennung der Proteine über SDS-PAGE erfolgte der Nachweis der Quervernetzung durch Immunodekoration mit einem Antikörper gegen AFG1L1 (α -AFG1L1).

Wurde rekombinantes AFG1L1 alleine in einem Reaktionsansatz in Abwesenheit von Calcium mit EDC inkubiert (Abbildung 23a, Spur 2), konnte im Wesentlichen das monomere AFG1L1 bei etwa 50 kDa detektiert werden. Neben dem monomeren AFG1L1 konnten im Vergleich zur unbehandelten Probe (Abbildung 23a, Spur 1) noch zwei weitere, ungefähr 100 und 150 kDa große Proteine detektiert werden. Dabei stellt das etwa 100 kDa große Protein wahrscheinlich eine dimere Form von AFG1L1 dar, während es sich bei dem 150 kDa großen Protein vermut-

lich um ein AFG1L1-Trimer handelt. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass AFG1L1 in der Tat die Fähigkeit besitzt, zu oligomerisieren.

Anschließend wurde untersucht, ob diese Oligomerisierung von Calcium beeinflusst wird. Deshalb wurde das rekombinante AFG1L1 alleine in Anwesenheit von Calcium mit EDC inkubiert (Abbildung 23b, Spur 2). Hierbei traten Quervernetzungsprodukte der gleichen Größe und Stärke wie im Ansatz mit EDTA/EGTA auf. Dies lässt den Schluss zu, dass AFG1L1 auch in Anwesenheit von Calcium Dimere bzw. Trimere ausbilden kann. Demnach erfolgt die Oligomerisierung von AFG1L1 calcium-unabhängig.

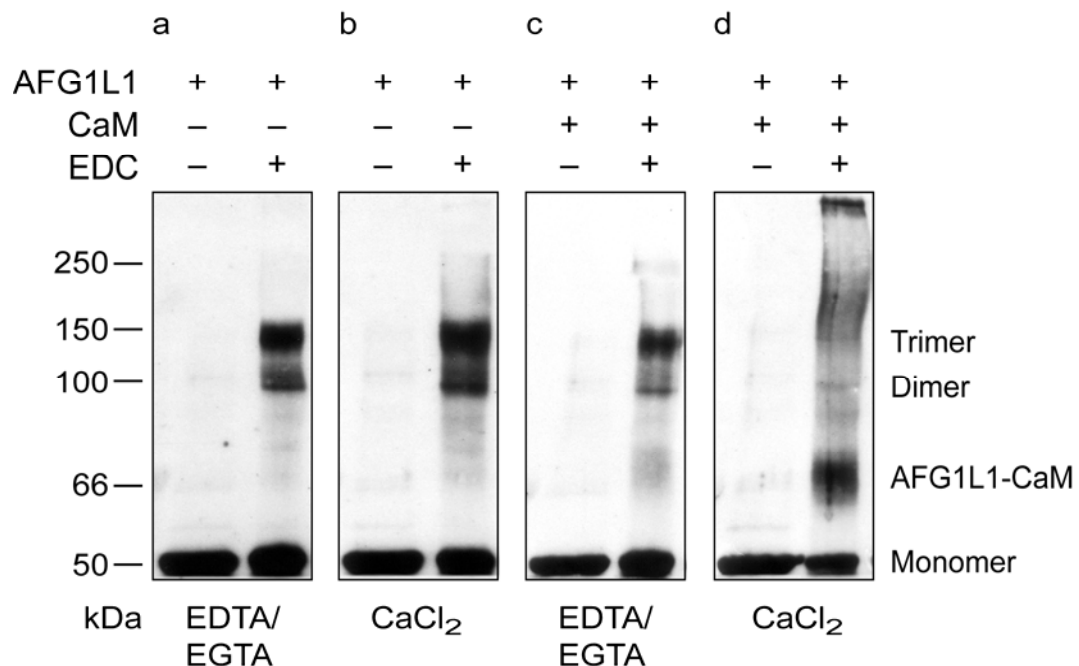


Abbildung 23: Quervernetzung von AFG1L1 mit EDC

Rekombinantes AFG1L1 wurde in An- bzw. Abwesenheit von Calmodulin mit EDC quervernetzt. Die Reaktion wurde entweder mit CaCl₂ oder EDTA/EGTA durchgeführt. Quervernetzungsprodukte wurden durch Immundekoration mit α -AFG1L1 nachgewiesen. AFG1L1: AFG1L1-Volllängenprotein; CaM: Calmodulin; AFG1L1-CaM: Komplex aus AFG1L1 und Calmodulin

Danach sollte untersucht werden, ob die Oligomerisierung von AFG1L1 durch die Bindung an Calmodulin reguliert wird. Erfolgte die Quervernetzungsreaktion in Anwesenheit von Calmodulin und EDTA/EGTA (Abbildung 23c, Spur 2), konnten die gleichen Mono-, Di- und Trimere wie in den Ansätzen ohne Calmodulin immundekoriert werden. Wurde AFG1L1 jedoch mit Calmodulin in Anwesenheit von Calcium mit dem Quervernetzungsreagenz behandelt (Abbildung 23d, Spur 2), konnten die AFG1L1-Di- und Trimere nur mit sehr reduzierter Intensität detektiert werden. Dafür traten neue Quervernetzungsprodukte bei etwa 200 kDa sowie im noch höhermolekularen Bereich auf. Desweiteren konnte bei ca. 65 kDa der calcium-abhängige Komplex aus monomerem AFG1L1 und Calmodulin (siehe Kapitel 4.7.2) immundekoriert werden. Dieses Ergebnis zeigt einen Einfluss der Calmodulin-Bindung auf die AFG1L1 Oligomerisierung. Dabei scheint Calmodulin allerdings keinen inhibierenden Effekt auf die Komplexbildung von AFG1L1 auszuüben. Im Gegenteil scheint die Bindung von Calmodulin an AFG1L1 in Anwesenheit von Calcium die Ausbildung von höhermolekularen Komplexen von AFG1L1 zu begünstigen. Weiterführende *in vivo* Versuche müssen zeigen, in welcher Form AFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien als biologisch aktive Form vorliegt.

4.9 Identifizierung von Interaktionspartnern von AFG1L1

Um mögliche Interaktionspartner von AFG1L1 im Chloroplasten zu identifizieren, wurde eine Co-Immunopräzipitation mit α -AFG1L1 durchgeführt. Diese Untersuchungen könnten einen Hinweis darauf geben, an welchem intra-organellärem, Calmodulin-regulierten Prozess die AAA⁺-ATPase beteiligt ist.

Für die Co-Immunopräzipitation wurde der polyklonale Antikörper gegen AFG1L1 (α -AFG1L1) an ProteinA Sepharose gekoppelt. Mit dem so vorbereiteten Säulenmaterial wurde anschließend eine stromale Proteinfraction aus *P. sativum* inkubiert. Spezifisch an α -AFG1L1 gebundene Proteine wurden mit 2 % SDS von der Matrix eluiert und danach durch Silberfärbung analysiert. Als Kontrolle diente die leere Säulenmatrix (Abbildung 24, S). In diesem Versuch konnten vier Proteinbanden spezifisch angereichert werden, die nicht in der Kontrolle nachzuweisen waren (Abbildung 24, E). Diese Proteinbanden mit einer ungefähren Größe von 16, 29, 40 und 43 kDa wurden nach der Silberfärbung aus dem Gel ausgeschnitten und massenspektroskopisch analysiert. Es wurden für jede der Proteinbanden mehrere Massen identifiziert, die jeweils mindestens 14 Peptiden der folgenden Proteine spezifisch zugeordnet werden konnten: kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (14 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (40 kDa) und RuBisCO Activase (43 kDa).

Diese oligomeren Enzyme üben wichtige Funktionen im Calvinzyklus aus. Ob AFG1L1 somit eine Funktion in der CO₂-Fixierung des Chloroplasten innehat oder an der Oligomerisierung dieser Proteine durch Prozessierung ihrer Untereinheiten beteiligt ist, muss in weiteren Untersuchungen genauer analysiert werden.

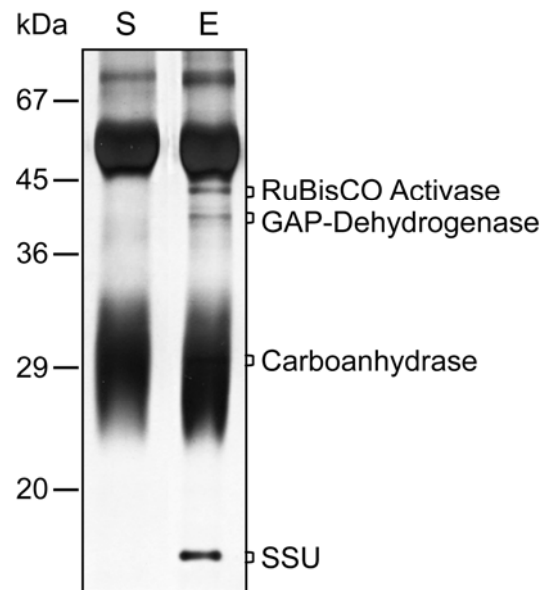


Abbildung 24: Co-Immunopräzipitation stromaler Proteine von *P. sativum*

Nach der Kopplung des Antikörpers gegen AFG1L1 (α -AFG1L1) an ProteinA Sepharose (S) erfolgte die Co-Immunopräzipitation mit stromalen Proteinen von *P. sativum*. Die Elution wurde anschließend mit 2 % SDS durchgeführt. Die Analyse gebundener Proteine erfolgte mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. Die markierten Banden wurden anschließend massenspektroskopisch untersucht. S: α -AFG1L1-gekoppeltes leeres Säulenmaterial; E: Elutionsfraktion

4.10 Das AFG1L1 Homolog AFG1L2 (*At4g28070*)

Phylogenetische Analysen deuten darauf hin, dass AFG1L1 ursprünglich ein mitochondriales Homolog zu AFG1 war und wohl erst im Laufe der Entwicklung eine zusätzliche Funktion im Chloroplasten erhalten hat. Es stellt sich daher die Frage, ob das Protein in den Mitochondrien weiterhin seine ursprüngliche Funktion wahrnimmt oder eine neue Funktion in beiden Organellen erhalten hat. Um diese Frage zu klären, wurde im Genom von *Arabidopsis* nach weiteren Homologen von AFG1 gesucht. Dabei konnte ein 473 Aminosäuren großes Protein namens AFG1-like ATPase Family Protein identifiziert werden, das von *AT4G28070* kodiert wird. Dieses Protein wurde im Folgenden vor allem in Bezug auf seine subzelluläre Lokalisierung charakterisiert und wird im weiteren als AFG1-like ATPase 2, kurz AFG1L2, bezeichnet.

4.10.1 Charakterisierung von AFG1L2 durch Sequenzanalyse

Zuerst wurde untersucht, ob es sich bei AFG1L2 tatsächlich um ein Homolog von AFG1L1 handelt. Dazu wurde ein Abgleich der Aminosäuresequenzen der Vollängenproteine (Quelle: The Arabidopsis Information Database) beider Proteine durchgeführt. Es konnte so gezeigt werden, dass die Proteine zu 70 % identisch sind (Abbildung 25). Lediglich der N-Terminus zeigt eine höhere Heterogenität im Bereich der Präsequenz von AFG1L1. Demnach könnte es sich bei AFG1L2 ebenfalls um eine N-terminale Transitsequenz handeln. AFG1L2 zeigt insbesondere im Bereich der AAA-Domäne eine starke Ähnlichkeit zu AFG1L1. Um dies weiter zu analysieren, wurde die Aminosäuresequenz auf die charakteristischen Motive für die ATP-Bindung und Hydrolyse (für eine ausführliche Beschreibung siehe 4.2) untersucht. Das Walker A Motiv mit der Sequenz GGVGTGKT (Abbildung 25, Walker A) konnte ab der 140. Aminosäure gefunden werden. Ebenso wie das Walker B Motiv ILLCLDE, das mit der 201. Aminosäure beginnt (Abbildung 25, Walker B). Die Sensor 1 und Sensor 2 Motive (Abbildung 25, Sensor 1 und 2) können ebenfalls in den Bereichen von der 231. bis 240. bzw. von der 319. bis 327. Aminosäure identifiziert werden. Der charakteristische Arginin-Finger befindet sich an Position 264 (Abbildung 25, Arginin-Finger).

Neben der gezeigten sehr hohen Sequenzkonservierung der beiden ATPasen konnten für AFG1L2 alle Motive für die ATP-Bindung und -Hydrolyse identifiziert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass AFG1L2 in der Tat ein Homolog von AFG1L1 ist. Somit kann AFG1L2 als Mitglied der Superfamilie der AAA⁺-ATPasen klassifiziert werden.

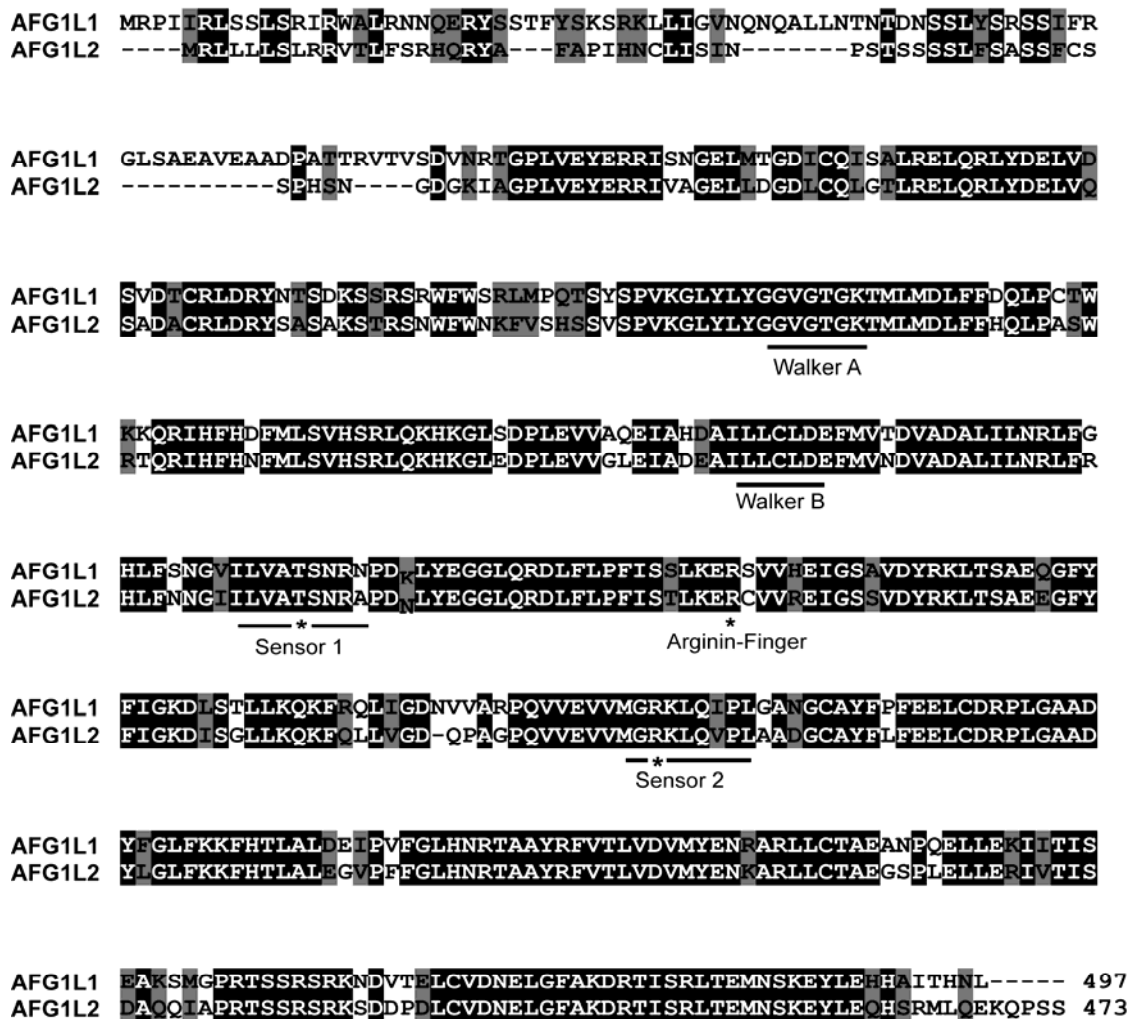


Abbildung 25: Sequenzvergleich von AFG1L1 und AFG1L2

Sequenzvergleich von AFG1L1 (At4g3090) mit AFG1L2 (At4g28070). Beide Sequenzen sind zu 70 % identisch. Die Aminosäuresequenzen beider Proteine stammen von The Arabidopsis Information Resource (www.tair.org). Identische Aminosäuren sind schwarz, homologe grau hinterlegt. Die für AAA⁺-ATPasen charakteristischen Motive sind eingezeichnet (schwarze Balken; *: die dafür essentiellen Aminosäuren)

4.10.2 Charakterisierung der subzellulären Lokalisierung von AFG1L2 durch Vorhersageprogramme und GFP-Fusion

Nachdem AFG1L2 als Homolog von AFG1L1 und Mitglied der AAA⁺-ATPase Familie charakterisiert wurde, sollte die subzelluläre Lokalisierung analysiert werden. Dazu wurde eine bioinformatische Untersuchung mit den Vorhersageprogrammen iPSORT, TargetP, MitoProtII, Predotar, WolfPSORT und MultiLoc durchgeführt. Alle Programme entschieden sich ausnahmslos für eine Lokalisierung von AFG1L2 im Mitochondrium. Ähnlich wie bei AFG1L1 gab es allerdings große Unterschiede in der Vorhersage der Prozessierungsstelle. Die von den Programmen iPSORT, TargetP und MitoProtII prognostizierten Prozessierungsstellen liegen danach bei der 30., 109. bzw. zwölften Aminosäure.

Um diese bioinformatische Analyse *in vivo* zu bestätigen, wurde die cDNA, die für die Vollängenform von AFG1L2 kodiert, in einem Vector mit C-terminalem GFP-Anhang fusioniert. Damit wurden anschließend Mesophyll-Protoplasten von *N. tabacum* transient transformiert. Die Fluoreszenzsignale wurden mit einem konfokalen Laserscanning-Mikroskop detektiert (Abbildung 26).

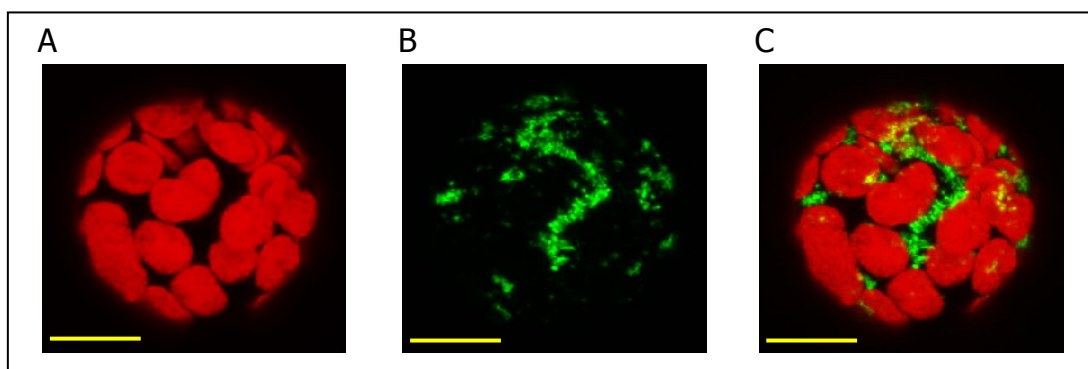


Abbildung 26: Transiente Transformation von *N. tabacum* Protoplasten mit AFG1L2-GFP

Das GFP-Fusionsprotein von AFG1L2 wurde transient in Mesophyll-Protoplasten von *N. tabacum* exprimiert. A: Chlorophyllautofluoreszenz; B: GFP-Fluoreszenz; C: Überlagerung beider Signale; der gelbe Balken entspricht 10 µm

Das GFP-Signal von AFG1L2-GFP (Abbildung 26B) konnte in kleinen runden Strukturen detektiert werden. Abbildung 26A zeigt die chloroplastidäre Autofluoreszenz der AAA⁺-ATPase AFG1L2. Beide Fluoreszenzsignale konnten nicht miteinander korreliert werden (Abbildung 26C). Das GFP-Fluoreszenzmuster lässt jedoch dabei darauf schließen, dass auch AFG1L2 im Mitochondrium lokalisiert ist.

4.10.3 Charakterisierung der subzellulären Lokalisierung von AFG1L2 durch *in vitro* Import in Chloroplasten und Mitochondrien

Nachdem sowohl die bioinformatische Analyse als auch die GFP-Fusion darauf hindeuteten, dass AFG1L2 in Mitochondrien lokalisiert ist, wurde dies anschließend weiter untersucht. Dazu wurden *in vitro* Importexperimente in isolierte Mitochondrien aus *P. sativum* durchgeführt. Darüber hinaus wurde die Translokation von AFG1L2 in isolierte Chloroplasten untersucht. Für die Translokationsexperimente wurde das Volllängenprotein von AFG1L2 (pAFG1L2) zuerst radioaktiv mit ³⁵S-Methionin *in vitro* translatiert. Damit wurde anschließend der Import in entweder isolierte Chloroplasten oder Mitochondrien für 20 min nach Standardbedingungen durchgeführt. Jeweils eine Hälfte des Importansatzes wurde mit der Protease Thermolysin behandelt, um gebundenes, aber nicht importiertes Vorstufenprotein proteolytisch abzubauen.

Für den Import in Chloroplasten konnte in der nicht mit Thermolysin behandelten Probe bei etwa 50 kDa ein radioaktives Protein in geringer Intensität detektiert werden (Abbildung 27, Chloro, -Th). Da es der Größe der Vorstufenform von AFG1L2 (Abbildung 27, Chloro, TL) entspricht, kann davon ausgegangen werden, dass die ATPase zumindest schwach mit den Rezeptoren der äußeren Chloroplastenhüllmembran interagieren kann. Die Vorstufenform pAFG1L2 konnte nach dem Verdau mit Thermolysin nicht weiter nachgewiesen werden. Darüber hinaus konnten keine weiteren Proteine detektiert werden, die eine mature Form von AFG1L2 darstellen. Es ist deshalb davon auszugehen, dass pAFG1L2 nicht in Chloroplasten importiert werden kann.

Bei den Importexperimenten mit Mitochondrien konnte im protease-freien Ansatz (Abbildung 27, Mito, -Th) eine starke Anbindung von pAFG1L2 detektiert werden. Darüber hinaus ist eine zusätzliche, etwa 3 kDa kleinere Bande sichtbar, welche

gegen Proteolyse geschützt ist (Abbildung 27, Mito, +Th). Daraus lässt sich folgern, dass es sich dabei um die importierte mature Form von AFG1L2 (mAFG1L2) handelt. Demnach können die *in vitro* Importexperimente die ausschließliche Lokalisierung von AFG1L2 in Mitochondrien bestätigen.

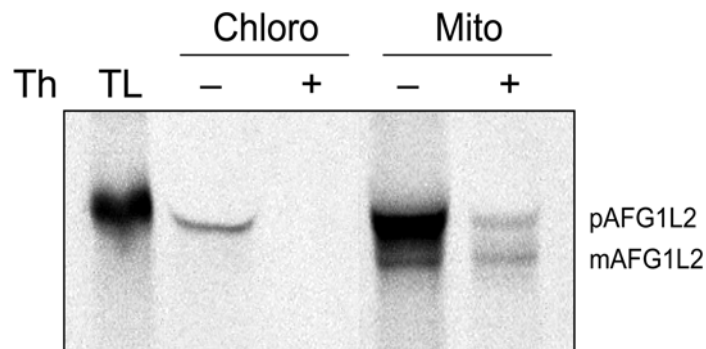


Abbildung 27: Import von pAFG1L2 in Chloroplasten und Mitochondrien

Der Import in isolierte Chloroplasten (10 µg Chlorophyll) oder Mitochondrien (100 µg Protein) wurde in Anwesenheit von ³⁵S-markiertem pAFG1L1 für 20 min bei 25 °C durchgeführt. Nach Reisolierung der Organellen wurde je die Hälfte der Ansätze mit Thermolysin behandelt. Th: Thermolysin, pAFG1L2: Vorstufenprotein von AFG1L2, mAFG1L2: mature Form von AFG1L2, TL: 5 % des eingesetzten Translationsproduktes, Chloro: Chloroplasten, Mito: Mitochondrien

4.11 Identifizierung von Komponenten des chloroplastidären Vesikeltransportes

Inhibitorstudien haben darauf hingewiesen, dass sowohl Calmodulin als auch Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen (PPP) an der Fusion von Vesikeln der inneren Chloroplastenhüllmembran mit der Thylakoidmembran beteiligt sind. Daher sollte in einem weiteren Teil der Arbeit versucht werden, Mitglieder dieser Proteinfamilien im Chloroplasten zu identifizieren.

4.11.1 Calmodulin

Um chloroplastidäre Calmoduline zu identifizieren, wurde eine Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Agarose durchgeführt (Charbonneau and Cormier, 1979). Fluphenazin ist ein calcium-abhängiger Calmodulin-Antagonist, der die Interaktion von Calmodulin mit seinen Zielproteinen hemmt (Hait et al., 1987). Stromale Proteine von *A. thaliana* wurden vor der Inkubation mit der Fluphenazin-Sepharose auf 4 mM CaCl₂ eingestellt und für 10 min bei 82 °C denaturiert. Der hitzestabile Überstand wurde dann mit Fluphenazin-Sepharose inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Elution der gebundenen Proteine durch Substitution des Calciums mit 5 mM EGTA. Die Eluate wurden vereint, lyophilisiert und in kleinem Volumen rekonstituiert. Danach erfolgte die Auftrennung und Analyse über SDS-PAGE und Silberfärbung. Es konnte eine einzelne Bande bei etwa 19 kDa detektiert werden, die aus dem Gel geschnitten und anschließend massenspektroskopisch analysiert wurde (Abbildung 28). Dabei konnten zwei Massen identifiziert werden, die zwei Peptiden des Genproduktes von *AT4G03290* zugeordnet werden konnten. Dabei handelt es sich um ein potentielles calcium-bindendes Protein namens Calmodulin-like Protein 6 (CML6). Um die chloroplastidäre Lokalisierung von CML6 zu verifizieren, wurde das Vollängenprotein zuerst für die transiente Transformation von Mesophyll-Protoplasten von *N. tabacum* mit einem GFP-Anhang C-terminal fusioniert. Das GFP-Signal konnte allerdings im Cytosol und nicht im Chloroplasten detektiert werden (Daten nicht gezeigt). Anschließend durchgeführte *in vitro* Importstudien in isolierte Chloroplasten bestätigten dieses Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

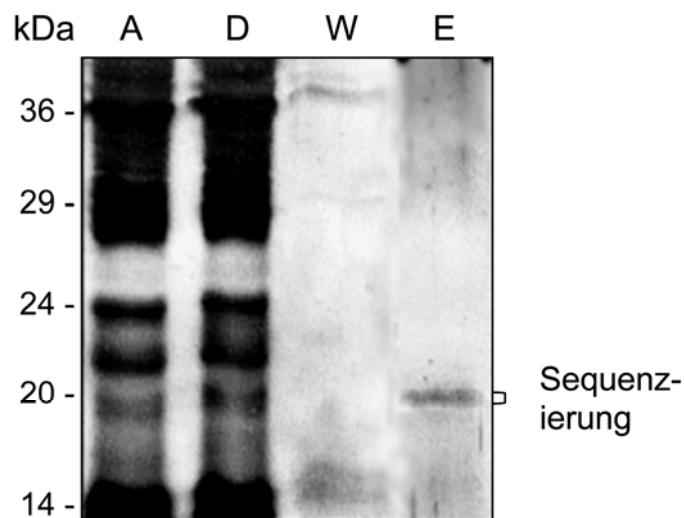


Abbildung 28: Affinitätschromatographie an Fluphenazin-Agarose

Stromale Proteine aus *A. thaliana* wurden nach der Denaturierung bei 82 °C mit Fluphenazin-Agarose inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Elution durch 5 mM EGTA. Die Eluate wurden vereint, lyophilisiert und in einem kleinen Volumen rekonstituiert. Nach der Auftrennung über SDS-PAGE erfolgte die Visualisierung mittels Silberfärbung. Die bei etwa 19 kDa detektierte Bande wurde anschließend massenspektroskopisch analysiert. A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Eluat

4.11.2 Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen

Um mögliche im Chloroplasten lokalisierte Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen (PPP) zu identifizieren, die am chloroplastidären Vesikeltransport beteiligt sein könnten, wurde ein Antikörper (α -PP) gegen den Bereich von der 70. bis 255. Aminosäure einer 312 Aminosäuren langen PP1-Phosphatase namens TOPP2 (At5g59160) hergestellt. Da die beiden PPP-Unterfamilien PP1 und PP2A eine starke Homogenität aufweisen, sollte der polyklonale Antikörper in der Lage sein, Vertreter sowohl beider Unterfamilien als auch verschiedener Isoformen innerhalb der Unterfamilien zu detektieren.

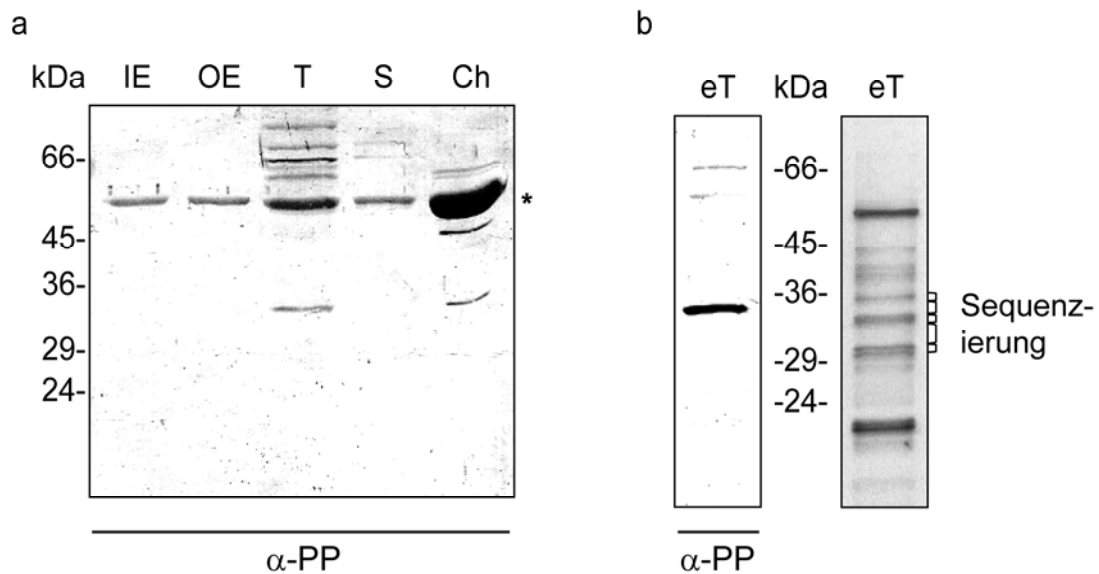


Abbildung 29: Immunlokalisierung von Serin/Threonin-spezifischen Phosphoprotein Phosphatasen

a: Verschiedene chloroplastidäre Subfraktionen sowie Gesamtchloroplasten von *P. sativum* wurden mit α -PP immundekoriert. Bei etwa 35 kDa konnte eine Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatase detektiert werden. * zeigt eine Kontamination durch RuBisCO an. b: Durch Behandlung der Thylakoidmembranen mit 500 mM NaCl wurde die Proteinfraction der extrinsischen Thylakoidmembranen erhalten. Diese wurde ebenfalls immundekoriert (links). Silberfärbung der gleichen Fraktion (rechts) mit Bereichen für die massenspektroskopische Analyse. IE: Proteine der inneren Chloroplastenhüllmembran; OE: Proteine der äußeren Chloroplastenhüllmembran; T: Thylakoidproteine; S: stromale Proteine; Ch: gesamtchloroplastidäre Proteine; eT: extrinsische Thylakoidmembranproteine; α -PP: Antikörper gegen Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen

Zuerst wurden mit dem Antikörper Serin/Threonin-spezifische Protein Phosphatasen in Gesamtchloroplasten und chloroplastidären Subfraktionen von *P. sativum* immundekoriert. Es konnte jeweils ein Protein bei etwa 35 kDa in den Proteinfractionen der Gesamtchloroplasten, der Thylakoidmembranen und der extrinsischen Thylakoidmembranen detektiert werden (Abbildung 29a und b). Da die Immundekoration mit extrinsischen Thylakoidmembranproteinen ein stärkeres Signal hervorrief, wurde diese Proteinfraction aus *A. thaliana* für eine Co-Immunopräzipitationen verwendet. Es konnten dabei drei Banden bei etwa 32, 34 und

36 kDa immundekoriert werden, deren Mengen jedoch für eine massenspektroskopische Analyse nicht ausreichend waren (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurden die extrinsischen Thylakoidmembranproteine von *A. thaliana* über SDS-PAGE aufgetrennt und alle Proteinbanden im Bereich von etwa 30 bis 36 kDa anschließend massenspektroskopisch analysiert (Abb. 29). Die dabei erhaltenen Massen konnten Peptiden der Serin/Threonin-spezifischen Protein Phosphatasen TOPP4 (At2g39840), TOPP6 (At5g43380), TOPP8 (At5g27840), PP2A (At1g10430) und PP2A4 (At3g58500) zugeordnet werden.

Daneben wurde eine andere Methode zur Identifizierung von Protein Phosphatasen mittels Affinitätschromatographie an Microcystin-LR-Agarose genutzt (Meek et al., 1999). Microcystin-LR ist ein spezifischer Inhibitor von sowohl PP2A- als auch PP1-Phosphatasen (Honkanen et al., 1994). Für die Chromatographie wurden Gesamtchloroplasten von *A. thaliana* mit 1 % Decylmaltosid auf Eis solubilisiert. Die nach Zentrifugation erhaltene lösliche Proteinfraction wurde anschließend mit Microcystin-LR-Agarose inkubiert. Gebundene Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen wurden nach dem Waschen mit einem Überschuss an Microcystin-LR kompetitiv von der Matrix eluiert. Die Proteine wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Silberfärbung analysiert. So konnte eine einzelne Proteinbande bei etwa 35 kDa detektiert werden (Abbildung 30). Diese wurde aus dem Gelbereich ausgeschnitten und massenspektroskopisch analysiert. Wiederum konnten so mehrere Massen identifiziert werden, die Peptiden von TOPP5 (At3g46820), TOPP7 (At4g11240), TOPP8 (At5g27840) und PP2A4 (At3g58500) zugeordnet werden konnten.

Die durch beide Methoden identifizierten Serin/Threonin-spezifischen Phosphoprotein Phosphatasen wurden anschließend als Vollängenproteine mit einem GFP-Anhang fusioniert, um damit Mesophyll-Protoplasten von *N. tabacum* transient zu transformieren. Dabei ergab sich für keine der Phosphatasen eine eindeutige Lokalisierung im Chloroplasten (Daten nicht gezeigt). Die anschließend durchgeführten *in vitro* Importexperimente in Chloroplasten von *P. sativum* konnten ebenfalls keine zweifelsfreie Translokation in das Organell zeigen (Daten nicht gezeigt). Darüber hinaus wird für keine der hier isolierten Serin/Threonin-spezifischen Protein Phosphatasen eine N-terminale Transitsequenz vorhergesagt. Ob die Proteine

tatsächlich im Chloroplasten lokalisiert sind und für die Translokation andere, intrinsische Translokationssignale genutzt werden, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

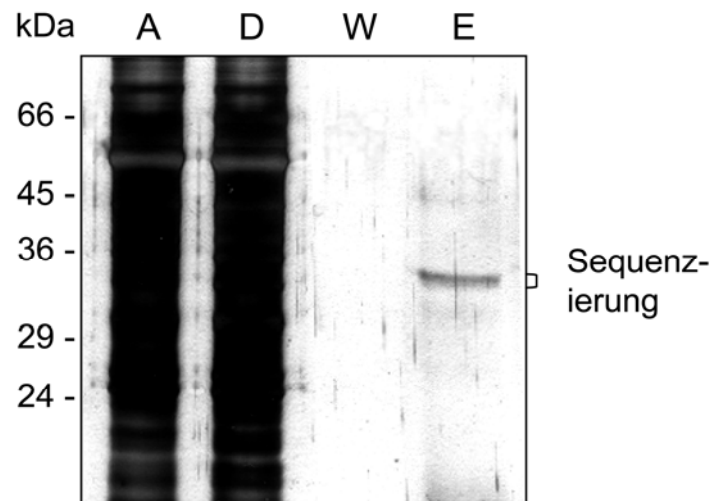


Abbildung 30: Affinitätschromatographie an Microcystin-LR-Agarose

Lösliche gesamtchloroplastidäre Proteine von *A. thaliana* wurden mit Microcystin-LR-Agarose inkubiert. Nach dem Waschen erfolgte die Elution mit einem Überschuss an exogenem Microcystin-LR. A: Auftrag; D: Durchlauf; W: Waschfraktion; E: Elution

5 Diskussion

Im Gegensatz zu Prokaryoten ist Vesikeltransport in eukaryotischen Organismen weit verbreitet. Neben spezifischen Komponenten gibt es auch eine Reihe von Proteinen, die in vielen Vesikeltransportsystemen konserviert sind. Dazu gehören beispielsweise hoch- und niedermolekulare GTPasen, AAA⁺-ATPasen, Calmoduline und Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen. Im Chloroplasten konnte durch die Behandlung mit spezifischen Inhibitoren dieser Proteinkomponenten, wie beispielsweise Ophiobolin A und Microcystin LR, eine Akkumulation von vesikulären Strukturen zwischen der inneren Chloroplastenhüllmembran und den Thylakoiden beobachtet werden (Westphal et al., 2001). Dadurch ergaben sich erste Hinweise, dass Chloroplasten über ein Vesikeltransportsystem eukaryotischen Ursprungs verfügen. Im Zuge dieser Arbeit sollten chloroplastidäre Serin/Threonin-spezifische Phosphoprotein Phosphatasen und Calmoduline sowie Interaktionsproteine von Calmodulin identifiziert werden, die eine mögliche Funktion im Vesikeltransportsystem innehaben.

Es konnten dabei unter anderem drei Proteine, Adl4/DRP1E, RHA1 und AFG1L1, identifiziert werden, die mit Calmodulin interagieren. Durchgeführte Untersuchungen zur Verifizierung der chloroplastidären Lokalisierung ergaben jedoch nur für ein Protein, AFG1L1, ein positives Resultat. Dieses Protein ist von speziellem Interesse, da es eine AAA⁺-ATPase (ATPases Associated with a variety of cellular Activities) darstellte. Diese Proteine sind an einer Vielzahl zellulärer Prozesse beteiligt, wie beispielsweise dem Proteinabbau, der DNA Replikation, der homo- und heterotypischen Membranfusion und der Microtubuli-Disassemblierung (Erdmann et al., 1991; Frickey and Lupas, 2004; Hanson and Whiteheart, 2005). Unter anderem sind AAA⁺-ATPasen wie Sec18p/NSF auch an der Vesikelfusion beteiligt, die zumindest bei der homotypischen Membranfusion in *S. cerevisiae* von Calmodulin reguliert wird.

AAA⁺-ATPasen gehören zu den P-loop NTPasen und wandeln die freie Energie, die sie durch die Hydrolyse von ATP erzeugen, in Konformationsänderungen um. Da diese auch auf die Substrate der AAA⁺-ATPasen weitergeleitet werden, kommt es zu den vielfältigsten Remodellierungen der Zielproteine, wie beispielsweise Disas-

semblierung oder Entfaltung (Frickey and Lupas, 2004; Iyer et al., 2004). Das in dieser Arbeit identifizierte AFG1-like Protein 1 (AFG1L1) gehört zu den AAA⁺-ATPasen und wurde als Mitglied der divergenten AFG1-Familie aus einer chloroplastidären Subfraktion von *A. thaliana* durch Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose angereichert (Abbildung 1). Durch Untersuchungen der Sekundärstruktur von AFG1L1 konnte bestätigt werden, dass dieses Protein ein Homolog von AFG1 aus *S. cerevisiae* darstellt. So konnte eine bestimmte Abfolge der α -Helices und β -Stränge der AAA-Domäne, die alle Mitglieder der AAA⁺-ATPasen charakterisiert und von anderen P-loop NTPasen unterscheidet, für AFG1L1 eindeutig identifiziert werden (Abbildung 3). Dass innerhalb der AAA-Domäne alle Motive für die Bindung und Hydrolyse von ATP ermittelt wurden, spricht für die Funktionalität von AFG1L1 (Abbildung 5).

Das Protein verfügt laut bioinformatischer Untersuchung über eine etwa 60 Aminosäuren lange N-terminale Präsequenz, die für die Translokation von AFG1L1 in Mitochondrien und Chloroplasten genutzt wird (Tabelle 3). Tatsächlich konnte die Lokalisierung von AFG1L1 durch *in vivo* GFP-Fusion in Mitochondrien gezeigt werden (Abbildung 2). Durch *in vitro* Importexperimente konnte weiterhin die Translokation von AFG1L1 über die generellen Importwege nicht nur in Mitochondrien, sondern darüber hinaus auch in Chloroplasten eindeutig bestätigt werden (Abbildungen 10 und 6). Die Lokalisierung von AFG1L1 in beiden endosymbiotischen Organellen spricht dafür, dass diese AAA⁺-ATPase eine wichtige Funktion in Chloroplasten und Mitochondrien innehat. Das Vorstufenprotein von AFG1L1 wurde in beiden Organellen zu einer jeweils 5,5 kDa kleineren maturen Form prozessiert (Abbildung 14). Dies bedeutet, dass AFG1L1 sowohl in Chloroplasten als auch Mitochondrien mit Hilfe eines „ambiguous“ Signalpeptids transloziert. Die Organellen sind demnach nicht nur in der Lage, das gleiche Signalpeptid zu erkennen, sie prozessieren es auch durch ihre Peptidasen an gleicher Position. Da dadurch in Chloroplasten und Mitochondrien ein identisches Protein entsteht, wird die Annahme unterstützt, dass AFG1L1 eine von beiden Organellen benötigte und wahrscheinlich ähnliche Funktion erfüllt. Die Subfraktionierung der Organellen konnte darüber hinaus zeigen, dass AFG1L1 ein lösliches Protein ist (Abbildungen 9 und 13). Daher handelt es sich in Chloroplasten wahrscheinlich um ein

stromales Protein, während AFG1L1 in Mitochondrien als Matrixprotein vorliegt. Die Lokalisierung der AAA⁺-ATPase in ähnlichen Kompartimenten beider Organellen untermauert die postulierte analoge Funktion von AFG1L1.

Chloroplasten entstanden in eukaryotischen Zellen, die schon ein System für die Translokation mitochondrialer Vorstufenproteine besaßen. Deshalb musste sich ein unabhängiges System für den Import chloroplastidärer Proteine entwickeln, um die Spezifität des Importes in entweder das eine oder das andere Organell zu gewährleisten. Daher war es unabdingbar, die Signalsequenzen der Proteine der neuen Lage anzupassen, um „Mistargeting“ zu vermeiden. Dadurch ist der Import von Proteinen in Chloroplasten oder Mitochondrien normalerweise sehr spezifisch. Es existiert aber eine steigende Zahl von Proteinen, die von den Translokasen beider Organellen erkannt und importiert werden (Creissen et al., 1995; Small et al., 1998). Die meisten dieser dual-lokalisierten Proteine importieren mit Hilfe einer „ambiguous“ Targetsequenz. Dabei werden wahrscheinlich unterschiedliche Bereiche innerhalb des Signalpeptids von den Translokasen der Chloroplasten und Mitochondrien als Importsignal erkannt. Die meisten Proteine, die mittels eines solchen Signals dual in beide Organellen translozieren, sind an der Genexpression oder dem Schutz vor oxidativem Stress beteiligt (Peeters and Small, 2001). Besonders hervorzuheben sind dabei die Aminoacyl-tRNA Synthetasen von *A. thaliana*. Von insgesamt 24 Proteinen sind 17 dual in Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert (Duchene et al., 2005). Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit kann AFG1L1 nun ebenfalls zu den dual in Mitochondrien und Chloroplasten lokalisierten Proteinen gezählt werden. Dies konnte eindeutig durch den Import von AFG1L1 in einem kompetitiven Dual-Importsystem in Anwesenheit beider Organellen gezeigt werden (Abbildung 15). Die duale Lokalisierung dieser löslichen AAA⁺-ATPase konnte darüber hinaus *in vivo* mittels Immundekorierung beider Organellen verifiziert werden (Abbildung 16). Allerdings bedeutet die duale Lokalisierung von AFG1L1 nicht zwangsläufig, dass es eine ähnliche „house-keeping“ Funktion wie die bis jetzt beschriebenen dual-lokalisierten Proteine innehat.

Phylogenetische Studien haben gezeigt, dass AAA⁺-ATPasen ubiquitär in Pro- und Eukaryoten konserviert sind (Iyer et al., 2004; White and Lauring, 2007). Für die sowohl in Bakterien als auch in Eukaryoten vorkommende AFG1-Familie wird an-

genommen, dass sie prokaryotischen Ursprungs ist. Sie wurde wahrscheinlich durch Horizontalen Gentransfer von α -Proteobakterien über endosymbiotische Mitochondrien in Eukaryoten übertragen (Iyer et al., 2004). Allerdings existieren keine Homologe von AFG1L1 in Cyanobakterien, den Vorläufern der Chloroplasten. Somit ist es wahrscheinlich, dass AFG1L1 ursprünglich eine alleinige Funktion im Mitochondrium innehatte. Die evolutionäre Neuerung, dass AFG1L1 nun zusätzlich in Chloroplasten lokalisiert ist, könnte dadurch begründet sein, dass AFG1L1 in beiden Organellen eine neue Funktion erhielt. Die ursprüngliche Funktion von AFG1L1 als AAA⁺-ATPase in Mitochondrien hingegen wird wahrscheinlich durch ein Homolog namens AFG1L2 wahrgenommen. Von AFG1L2 konnte durch GFP-Fusions- und Importexperimente gezeigt werden, dass es ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert ist (Abbildungen 26 und 27).

Ursprünglich wurde AFG1 in *S. cerevisiae* als Homolog von Sec18p/NSF (N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein) identifiziert, ein Protein, das eine wichtige Funktion im vesikulären Proteintransport vom Endoplasmatischen Reticulum zum Golgiapparat innehat (Lee and Wickner, 1992). Sec18p/NSF disassembliert den cis-SNARE Komplex während des Fusionsprozesses der Vesikel mit der Golgi-Membran. Darüber hinaus wurde für AFG1 in *S. cerevisiae* eine Funktion in der Assemblierung der Cytochrom c Oxidase, dem letzten Enzym der mitochondrialen Atmungskette, postuliert (Khalimonchuk et al., 2007). So soll AFG1 am proteolytischen Abbau nicht-assemblierter Untereinheiten der Oxidase beteiligt sein, indem es mit AAA⁺-Proteasen zusammenwirkt. Diese Funktion wird in Pflanzen möglicherweise von AFG1L2 übernommen.

Um die Funktion von AFG1L1 in *A. thaliana* zu ergründen, wurden erste Experimente mit Chloroplasten durchgeführt. So sollten durch Co-Immunopräzipitation eventuelle Interaktionspartner von AFG1L1 identifiziert werden (Abbildung 24). Jedes der dabei identifizierten oligomeren Substrate hat eine Funktion im Calvinzyklus. Ob und wie AFG1L1 an der CO₂-Fixierung im Chloroplasten beteiligt sein könnte, muss durch weitere Untersuchungen genau analysiert werden. Denkbar wäre eine Prozessierung dieser oligomeren Enzymkomplexe durch AFG1L1, da AAA⁺-ATPasen häufig an der Reifung von Proteinen durch Prozessierung beteiligt sind (White and Luring, 2007). Dies würde auch zur postulierten Funktion von

AFG1 in *S. cerevisiae* passen. Leider zeigen die homozygoten *Arabidopsis*-Mutanten *afg1/1* und *afg1/2* unter normalen Wachstumsbedingungen keinen sichtbaren Phänotyp, der Aufschluss über die Funktion dieser Proteine geben könnte. Dies lässt entweder den Schluss zu, dass unter diesen Bedingungen keines der beiden Protein essentiell ist, oder dass sie sich gegenseitig in ihrer Funktion ersetzen können. Im letzteren Fall könnte eine *afg1/1/afg1/2* Doppelmutante darüber Aufschluss geben, an welchem physiologischen Prozess beide ATPasen beteiligt sind.

AFG1L1 konnte durch seine Fähigkeit, Calmodulin zu binden, angereichert werden (Abbildung 1). Dies deutet darauf hin, dass AFG1L1 eine zusätzliche Domäne zur Interaktion mit Calmodulin besitzt. Calmodulin ist ein ubiquitär in Eukaryoten vorkommendes Protein, das aufgrund eines inter- oder intrazellulären Signals einströmende Calciumionen bindet. Damit stellt Calmodulin eine der wichtigsten Komponenten des Calcium-Signalnetzwerkes der eukaryotischen Zelle dar. Über die Assoziation an seine Zielproteine ist Calmodulin in der Lage, dieses Calciumsignal weiterzugeben und eine spezifische zelluläre Antwort hervorzurufen. Neben der für die ATP-Hydrolyse notwendigen AAA-Domäne ergibt sich die funktionelle Vielfalt der AAA⁺-ATPasen durch eine große Anzahl weiterer Domänen (Hanson and Whiteheart, 2005). Diese können N- oder C-terminal außerhalb der AAA-Domäne lokalisiert sein und die Aktivität bzw. Spezifität der AAA⁺-ATPase beeinflussen. Daher könnte eine Calmodulin-Bindedomäne innerhalb des N- oder C-terminalen Bereiches von AFG1L1 lokalisiert sein. Durch *in vitro* Analysen mit rekombinantem AFG1L1 konnte nicht nur die calcium-abhängige Bindung der AAA⁺-ATPase an Calmodulin verifiziert werden (Abbildungen 17 und 18). Die Untersuchungen ergaben unerwarteter Weise auch, dass sich die Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 nicht in der N- oder C-terminalen Domäne befindet (Abbildung 19). Stattdessen ist sie direkt vor dem Walker A Motiv inmitten der AAA-Domäne lokalisiert. Es ist allerdings auch von anderen AAA⁺-ATPasen bekannt, dass regulatorische Domänen innerhalb der AAA-Domäne lokalisiert sein können und zum Beispiel die Bindung an eine interagierende Untereinheit vermitteln (Kim et al., 2001).

Für die N-terminalen Domänen der AAA⁺-ATPasen ist bekannt, dass sie für die Interaktionen mit den Substraten verantwortlich sind. Da sich die Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 nicht in der N-terminalen Domäne befindet, scheinen sich beide Bindestellen nicht räumlich nahe zu sein und sich somit wahrscheinlich nicht negativ zu beeinflussen. Viele AAA⁺-ATPasen haben eine zweite AAA-Domäne, die oft keine katalytische Aktivität mehr aufweist. Für diese Domänen wird postuliert, dass sie die Oligomerisierung der AAA⁺-ATPase unterstützen. Bei der C-terminalen Domäne von AFG1L1 könnte es sich um eine degenerierte zweite AAA-Domäne handeln, da sie keinerlei Homologie zu anderen bekannten Proteinmotiven zeigt. Demnach könnte die C-terminale Domäne von AFG1L1 eine Funktion in der Oligomerisierung wahrnehmen. Die meisten AAA⁺-ATPasen assemblieren in oligomere Komplexe, meist Hexamere. Dadurch entsteht im Inneren des Komplexes eine Pore, durch die Substrate geschleust werden können (Hinnerwisch et al., 2005). Untersuchungen mit rekombinantem AFG1L1 konnten zeigen, dass die AAA⁺-ATPase in der Lage ist, zu oligomerisieren (Abbildung 23). Dabei zeigt Calmodulin sogar einen positiven Effekt auf die Ausbildung besonders hochmolekularer AFG1L1-Komplexe. Demnach scheint die Bindung von Calmodulin keinen Einfluss auf die allgemeine Funktion von AFG1L1 in Bezug auf die Substratspezifität auszuüben. Calmodulin könnte aber eine regulatorische Funktion in der Assemblierung besitzen.

Die innerhalb der AAA-Domäne liegende Calmodulin-Bindedomäne grenzt N-terminal an das Walker A Motiv an, das für die Bindung und Hydrolyse von ATP essentiell ist. Durch die große räumliche Nähe der Bindestellen für Calmodulin und ATP besteht die Möglichkeit, dass beide miteinander interferieren. Durch die schon erwähnte Hexamerisierung von AAA⁺-ATPasen erlangen diese außerdem ihre aktive Form, da die ATP-Bindestellen der AFG1L1-Monomere in räumlicher Nähe zueinander zur kooperativen ATP-Hydrolyse fähig sind (Hattendorf and Lindquist, 2002). Wie schon angeführt, findet die Ausbildung oligomerer Komplexe von AFG1L1 in Anwesenheit von Calmodulin in verstärktem Maße statt. Indem Calmodulin durch die Oligomerisierung die Fähigkeit von AFG1L1 zur ATP-Hydrolyse anregt, könnte es einen positiven Einfluss auf die katalytische Aktivität von AFG1L1 ausüben. Dies lässt sich gut mit der Tatsache vereinbaren, dass durch die Bindung

von Calmodulin an seine Zielproteine deren Aktivität induziert oder gesteigert wird. Durch die Wirkung von Calmodulin auf AFG1L1 lässt sich somit die regulatorische Funktion der AAA⁺-ATPase mit dem Calcium-Signalnetzwerk der eukaryotischen Zelle verbinden.

Der Sequenzvergleich der Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 mit Homologen anderer pflanzlicher Organismen wie *V. vinifera* und *P. trichocarpa* ergab eine bemerkenswerte Konservierung (Abbildung 22). Dies legt nahe, dass AFG1L1 auch in anderen Pflanzen durch Calmodulin reguliert wird. Diese Konservierung ist jedoch bei nicht-pflanzlichen Organismen wie *H. sapiens* und *D. melanogaster* nicht gegeben. Auch das Homolog AFG1 aus *S. cerevisiae* besitzt keine signifikante Ähnlichkeit im Sequenzbereich der CaMBD. Dies deutet darauf hin, dass die zusätzliche Domäne von AFG1L1 zur Interaktion mit Calmodulin wahrscheinlich ausschließlich eine Pflanzen-spezifische Besonderheit darstellt. Wie bereits erwähnt, ist AFG1L1 prokaryotischen Ursprungs, während Calmodulin bis dato nur in Eukaryoten gezeigt ist. Demnach handelt es sich bei der Pflanzen-spezifischen Calmodulin-Bindedomäne von AFG1L1 um ein Charakteristikum, das der AFG1-Familie erst nach der endosymbiotischen Entstehung von Chloroplasten und Mitochondrien hinzugefügt wurde. In diesem Zusammenhang ist es sehr interessant, dass weitere Analysen auf Nukleotidebene zeigten, dass die komplette Calmodulin-Bindedomäne zusammen mit dem Walker A Motiv im gleichen Exon 4 kodiert ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Domäne nachträglich in das Gen eingefügt worden ist. Es spricht außerdem dafür, dass die Calmodulin-Bindedomäne essentiell für AFG1L1 ist, da sie zusammen mit dem ebenfalls für die Aktivität unabdingbaren Walker A Motiv kodiert wird.

AFG1L1 ist in den beiden endosymbiotischen Organellen Mitochondrium und Chloroplast lokalisiert. Dabei wird die Aktivität der AAA⁺-ATPase wahrscheinlich durch Calcium/Calmodulin in beiden Organellen positiv beeinflusst. Dies lässt die Vermutung zu, dass sowohl Mitochondrien als auch Chloroplasten in das durch Calmodulin vermittelte Calcium-Signalnetzwerk der pflanzlichen Zelle integriert wurden und nun darüber reguliert werden können.

6 Zusammenfassung

AAA⁺-ATPasen (ATPases Associated with a variety of cellular Activities) gehören zu der ubiquitär verbreiteten Familie der P-loop NTPasen. Sie sind an vielfältigen Prozessen beteiligt, wie zum Beispiel dem Proteinabbau, der DNA Replikation und der homo- und heterotypischen Membranfusion. In dieser Arbeit wurde mittels Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose ein Protein namens AFG1-like ATPase (AFG1L1) aus einer chloroplastidären Subfraktion von *A. thaliana* isoliert. Durch Analyse der Primär- und Sekundärstruktur konnten eindeutig alle Charakteristika bestimmt werden, die AFG1L1 als Mitglied der AAA⁺-ATPasen identifiziert. Durch *in vitro* Importexperimente sowie durch *in vivo* Immundekoration konnte gezeigt werden, dass das 50 kDa große AFG1L1 dual in der Matrix der Mitochondrien und dem Stroma der Chloroplasten lokalisiert ist. Die Translokation erfolgt mit Hilfe eines abspaltbaren N-terminalen Transitpeptids, das in beiden Organellen identisch prozessiert wird. Dabei nutzen die Chloroplasten und Mitochondrien ein „ambiguous“ Transitpeptid von AFG1L1, um die AAA⁺-ATPase über die generellen Importwege und die TOC und TIC bzw. TOM und TIM23 Translokasen zu importieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass AFG1L1 in der Lage ist, Calcium-abhängig an Calmodulin zu binden. Die Calmodulin-Bindedomäne bildet dabei eine amphiphile α -Helix aus und liegt im Bereich zwischen Arg¹⁴⁴ und Val¹⁶¹ inmitten der AAA-Domäne, die für die Bindung und Hydrolyse von ATP der AAA⁺-ATPasen verantwortlich ist. Da eine solche Domäne nur in Homologen anderer Pflanzen zu beobachten ist, handelt es sich bei der Calmodulin-Bindung von AFG1L1 wahrscheinlich um ein evolutionär neues, Pflanzen-spezifisches Charakteristikum. Wie fast alle AAA⁺-ATPasen ist auch AFG1L1 in der Lage, zu oligomerisieren. Es konnte gezeigt werden, dass dies durch die Bindung von Calmodulin an AFG1L1 sogar verstärkt wird. Somit könnte die Fähigkeit der AAA⁺-ATPase, Calmodulin zu binden, einen positiven Effekt auf die katalytische Aktivität von AFG1L1 ausüben. Durch die duale Lokalisierung des Calmodulin-bindenden AFG1L1 ergibt sich dabei die Möglichkeit, eine bestimmte Funktion in Chloroplasten und Mitochondrien gemeinsam durch ein Calcium-Signal der Zelle zu regulieren.

7 Abstract

AAA⁺-ATPases (ATPases Associated with a variety of cellular Activities) belong to the family of P-loop NTPases and are ubiquitously distributed throughout all kingdoms. They function in a variety of different processes e.g. protein degradation, DNA replication, as well as homo- and heterotypic membrane fusion. In this thesis, a protein named AFG1-like ATPase (AFG1L1) was purified from a chloroplast subfraction from *A. thaliana* via affinity chromatography on calmodulin-agarose. Analysis of the primary and secondary structure of AFG1L1 revealed all features characteristic of members of the AAA⁺-ATPase family. It was shown by *in vitro* import assays that the 50 kDa AFG1L1 dually localizes to the mitochondrial matrix and the chloroplast stroma. This could also be confirmed by *in vivo* immunodecoration. Translocation is achieved by using a cleavable, N-terminal “ambiguous” transitpeptide, that is cleaved off after import by the peptidases of both organelles at the same position. Import of AFG1L1 occurs via the general import pathways into chloroplasts and mitochondria, using the TOC/TIC and TOM/TIM23 translocases, respectively. Furthermore, it was shown that the AAA⁺-ATPase binds calmodulin in a calcium-dependent fashion. The calmodulin-binding domain adopts an amphiphilic α -helical structure and is located between Arg¹⁴⁴ und Val¹⁶¹ in the AAA-domain which is responsible for ATP binding and hydrolysis. Since this domain is found exclusively in other plant homologues it seems likely that the ability of AFG1L1 to bind calmodulin is an evolutionary novel, plant-specific trait. Like most other AAA⁺-ATPases, AFG1L1 is also able to oligomerize. It was shown that binding to calmodulin can enhance this process. Therefore, binding of AFG1L1 to calmodulin could have a positive effect on the catalytic activity of this AAA⁺-ATPase. Dual localization of the same calmodulin-binding ATPase AFG1L1 thereby provides a means to regulate a specific function in both chloroplasts and mitochondria in a concerted fashion via incorporation into the calcium-signaling network of the cell.

8 Abkürzungen

| | |
|-----------|---|
| AP | Alkalische Phosphatase |
| BCIP | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat |
| CaM | Calmodulin |
| CaMBD | Calmodulin-Bindungsdomäne |
| CAP | m7-Guanosin (5') ppp (5') Guanosin |
| EDC | 1-Ethyl-3-[3-Dimethylaminopropyl]Carbodiimid Hydrochlorid |
| EDTA | Ethylendiamintetraessigsäure |
| EGTA | Ethylenglykolaminoethylethertetraessigsäure |
| GFP | Grün-fluoreszierendes Protein |
| Hepes | N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure |
| HRP | Horseradish/Meerrettich-Peroxidase |
| IE | innere Chloroplastenhüllmembran |
| IM | innere Mitochondrienmembran |
| IMS | Intermembranraum |
| MES | 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure |
| MTX | Matrix (der Mitochondrien) |
| NBT | 4-Nitrotetrazoliumchlorid Blauhydrat |
| OE | äußere Chloroplastenhüllmembran |
| OM | äußere Mitochondrienmembran |
| PPP | Phosphoprotein Phosphatase |
| PVDF | Polyvinylidendifluorid |
| RuBisCO | Ribulose-1,5-Bisphosphat Carboxylase/Oxygenase |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese |
| SSU | kleine Untereinheit der RuBisCO |
| Sulfo-NHS | Sulfo-N-Hydroxysulfosuccinimid |
| TES | N-Tris(Hydroxymethyl)Methyl-2-Aminoethansulfonsäure |
| TIC | Translokase der inneren Chloroplastenhüllmembran |
| TIM | Translokase der inneren Mitochondrienmembran |
| TL | Translationsprodukt |
| TOC | Translokase der äußeren Chloroplastenhüllmembran |

| | |
|---------|--|
| TOM | Translokase der äußeren Mitochondrienmembran |
| TOPP | Type One Protein Phosphatases |
| Tricine | N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethan |

9 Literatur

- Arazi, T., Baum, G., Snedden, W.A., Shelp, B.J., and Fromm, H.** (1995). Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase. *Plant Physiol* **108**, 551-561.
- Arnon, D.I.** (1949). Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiol* **24**, 1-15.
- Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K., and Miyano, S.** (2002). Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* **18**, 298-305.
- Bennett-Lovsey, R.M., Herbert, Alex D., Sternberg, Michael J. E., Kelley, Lawrence A. .** (2008). Exploring the extremes of sequence/structure space with ensemble fold recognition in the program Phyre. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* **70**, 611-625.
- Block, M.R., Glick, B.S., Wilcox, C.A., Wieland, F.T., and Rothman, J.E.** (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**, 7852-7856.
- Blum, B., Gross.** (1987). Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* **8**, 93-99.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., and Pfanner, N.** (2008). Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep* **9**, 42-49.
- Bonza, C., Carnelli, A., Ida De Michelis, M., and Rasi-Caldogno, F.** (1998). Purification of the Plasma Membrane Ca²⁺-ATPase from Radish Seedlings by Calmodulin-Agarose Affinity Chromatography. *Plant Physiol* **116**, 845-851.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Caliebe, A., Grimm, R., Kaiser, G., Lubeck, J., Soll, J., and Heins, L.** (1997). The chloroplastic protein import machinery contains a Rieske-type iron-sulfur cluster and a mononuclear iron-binding protein. *EMBO J* **16**, 7342-7350.
- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A.E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Truscott, K.N., Guiard, B., Pfanner, N., and Rehling, P.** (2005). Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell* **120**, 817-829.
- Charbonneau, H., and Cormier, M.J.** (1979). Purification of plant calmodulin by fluphenazine-Sepharose affinity chromatography. *Biochem Biophys Res Commun* **90**, 1039-1047.
- Chigri, F., Soll, J., and Vothknecht, U.C.** (2005). Calcium regulation of chloroplast protein import. *Plant J* **42**, 821-831.
- Chigri, F., Hormann, F., Stamp, A., Stammers, D.K., Bolter, B., Soll, J., and Vothknecht, U.C.** (2006). Calcium regulation of chloroplast protein

- translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 16051-16056.
- Chow, K.S., Singh, D.P., Roper, J.M., and Smith, A.G.** (1997). A single precursor protein for ferrochelatase-I from *Arabidopsis* is imported in vitro into both chloroplasts and mitochondria. *J Biol Chem* **272**, 27565-27571.
- Clapham, D.E.** (2007). Calcium signaling. *Cell* **131**, 1047-1058.
- Claros, M.G., and Vincens, P.** (1996). Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* **241**, 779-786.
- Combet, C., Blanchet, C., Geourjon, C., and Deleage, G.** (2000). NPS@: network protein sequence analysis. *Trends Biochem Sci* **25**, 147-150.
- Creissen, G., Reynolds, H., Xue, Y., and Mullineaux, P.** (1995). Simultaneous targeting of pea glutathione reductase and of a bacterial fusion protein to chloroplasts and mitochondria in transgenic tobacco. *Plant J* **8**, 167-175.
- Day, I.S., Reddy, V.S., Shad Ali, G., and Reddy, A.S.** (2002). Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol* **3**, RESEARCH0056.
- Dessi, P., Smith, M.K., Day, D.A., and Whelan, J.** (1996). Characterization of the import pathway of the F(A)d subunit of mitochondrial ATP synthase into isolated plant mitochondria. *Arch Biochem Biophys* **335**, 358-368.
- Duchene, A.M., Giritch, A., Hoffmann, B., Cognat, V., Lancelin, D., Peeters, N.M., Zaepfel, M., Marechal-Drouard, L., and Small, I.D.** (2005). Dual targeting is the rule for organellar aminoacyl-tRNA synthetases in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 16484-16489.
- Emanuelsson, O., and von Heijne, G.** (2001). Prediction of organellar targeting signals. *Biochim Biophys Acta* **1541**, 114-119.
- Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H.** (2007). Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protocols* **2**, 953-971.
- Erdmann, R., Wiebel, F.F., Flessau, A., Rytka, J., Beyer, A., Frohlich, K.U., and Kunau, W.H.** (1991). PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases. *Cell* **64**, 499-510.
- Erzberger, J.P., and Berger, J.M.** (2006). Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **35**, 93-114.
- Fang, T.K., David, N.R., Miernyk, J.A., and Randall, D.D.** (1987). Isolation and purification of functional pea leaf mitochondria free of chlorophyll. *Curr. Top. Plant Biochem. Physiol.* **6**, 175.
- Firlej-Kwoka, E., Strittmatter, P., Soll, J., and Bolter, B.** (2008). Import of preproteins into the chloroplast inner envelope membrane. *Plant Mol Biol* **68**, 505-519.
- Frickey, T., and Lupas, A.N.** (2004). Phylogenetic analysis of AAA proteins. *J Struct Biol* **146**, 2-10.
- Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G.** (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochim Biophys Acta* **1592**, 63-77.
- Gamborg, O.L., Murashige, T., Thorpe, T.A., and Vasil, I.K.** (1976). Plant tissue culture media. *In Vitro* **12**, 473-478.

- Hait, W.N., Glazer, L., Kaiser, C., Cross, J., and Kennedy, K.A. (1987). Pharmacological properties of fluphenazine-mustard, an irreversible calmodulin antagonist. *Mol Pharmacol* **32**, 404-409.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-580.
- Hanson, P.I., and Whiteheart, S.W. (2005). AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 519-529.
- Hattendorf, D.A., and Lindquist, S.L. (2002). Cooperative kinetics of both Hsp104 ATPase domains and interdomain communication revealed by AAA sensor-1 mutants. *EMBO J* **21**, 12-21.
- He, H., Chen, M., Scheffler, N.K., Gibson, B.W., Spremulli, L.L., and Gottlieb, R.A. (2001). Phosphorylation of mitochondrial elongation factor Tu in ischemic myocardium: basis for chloramphenicol-mediated cardioprotection. *Circ Res* **89**, 461-467.
- Hedtke, B., Borner, T., and Weihe, A. (2000). One RNA polymerase serving two genomes. *EMBO Rep* **1**, 435-440.
- Hell, K. (2008). The Erv1-Mia40 disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **1783**, 601-609.
- Hinnerwisch, J., Fenton, W.A., Furtak, K.J., Farr, G.W., and Horwich, A.L. (2005). Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation. *Cell* **121**, 1029-1041.
- Hoglund, A., Donnes, P., Blum, T., Adolph, H.W., and Kohlbacher, O. (2006). MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs and amino acid composition. *Bioinformatics* **22**, 1158-1165.
- Honkanen, R.E., Codispoti, B.A., Tse, K., Boynton, A.L., and Honkanen, R.E. (1994). Characterization of natural toxins with inhibitory activity against serine/threonine protein phosphatases. *Toxicon* **32**, 339-350.
- Horton, P., Park, K.J., Obayashi, T., Fujita, N., Harada, H., Adams-Collier, C.J., and Nakai, K. (2007). WoLF PSORT: protein localization predictor. *Nucleic Acids Res* **35**, W585-587.
- Hugosson, M., Nurani, G., Glaser, E., and Franzen, L.G. (1995). Peculiar properties of the PsaF photosystem I protein from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: presequence independent import of the PsaF protein into both chloroplasts and mitochondria. *Plant Mol Biol* **28**, 525-535.
- Iyer, L.M., Leipe, D.D., Koonin, E.V., and Aravind, L. (2004). Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* **146**, 11-31.
- Khalimonchuk, O., Bird, A., and Winge, D.R. (2007). Evidence for a pro-oxidant intermediate in the assembly of cytochrome oxidase. *J Biol Chem* **282**, 17442-17449.
- Kim, Y.I., Levchenko, I., Fraczkowska, K., Woodruff, R.V., Sauer, R.T., and Baker, T.A. (2001). Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nat Struct Biol* **8**, 230-233.
- Koop, H.U., Steinmuller, K., Wagner, H., Rossler, C., Eibl, C., and Sacher, L. (1996). Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via

- polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* **199**, 193-201.
- Krayl, M., Lim, J.H., Martin, F., Guiard, B., and Voos, W.** (2007). A cooperative action of the ATP-dependent import motor complex and the inner membrane potential drives mitochondrial preprotein import. *Mol Cell Biol* **27**, 411-425.
- Kuchler, M., Decker, S., Hormann, F., Soll, J., and Heins, L.** (2002). Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J* **21**, 6136-6145.
- Kunau, W.H., Beyer, A., Franken, T., Gotte, K., Marzioch, M., Saidowsky, J., Skaletz-Rorowski, A., and Wiebel, F.F.** (1993). Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics. *Biochimie* **75**, 209-224.
- Kunst, L.** (1998). Preparation of physiologically active chloroplasts from *Arabidopsis*. *Methods Mol Biol* **82**, 43-48.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984). Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209.
- Laemmli, U.K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lee, Y.J., and Wickner, R.B.** (1992). AFG1, a new member of the SEC18-NSF, PAS1, CDC48-VCP, TBP family of ATPases. *Yeast* **8**, 787-790.
- Leister, D.** (2003). Chloroplast research in the genomic age. *Trends Genet* **19**, 47-56.
- Lister, R., Chew, O., Rudhe, C., Lee, M.N., and Whelan, J.** (2001). *Arabidopsis thaliana* ferrochelatase-I and -II are not imported into *Arabidopsis* mitochondria. *FEBS Lett* **506**, 291-295.
- Macasev, D., Newbigin, E., Whelan, J., and Lithgow, T.** (2000). How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from *Arabidopsis* differ from their fungal counterparts. *Plant Physiol* **123**, 811-816.
- Margulis, L.** (1970). *Origin of Eucaryotic Cells*. New Haven, Yale Univ. Press.
- Martin, T., Sharma, R., Sippel, C., Waegemann, K., Soll, J., and Vothknecht, U.C.** (2006). A protein kinase family in *Arabidopsis* phosphorylates chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* **281**, 40216-40223.
- Martin, W., and Herrmann, R.G.** (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol* **118**, 9-17.
- May, T., and Soll, J.** (1998). Positive charges determine the topology and functionality of the transmembrane domain in the chloroplastic outer envelope protein Toc34. *J Cell Biol* **141**, 895-904.
- McCormack, E., Tsai, Y.C., and Braam, J.** (2005). Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci* **10**, 383-389.
- Meek, S., Morrice, N., and MacKintosh, C.** (1999). Microcystin affinity purification of plant protein phosphatases: PP1C, PP5 and a regulatory A-subunit of PP2A. *FEBS Lett* **457**, 494-498.
- Mereschkowsky, C.** (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl.* **25**, 593-604.

- Milenkovic, D., Muller, J., Stojanovski, D., Pfanner, N., and Chacinska, A.** (2007). Diverse mechanisms and machineries for import of mitochondrial proteins. *Biol Chem* **388**, 891-897.
- Moberg, P., Nilsson, S., Stahl, A., Eriksson, A.C., Glaser, E., and Maler, L.** (2004). NMR solution structure of the mitochondrial F1beta presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*. *J Mol Biol* **336**, 1129-1140.
- Nada, A., and Soll, J.** (2004). Inner envelope protein 32 is imported into chloroplasts by a novel pathway. *J Cell Sci* **117**, 3975-3982.
- Neupert, W., and Herrmann, J.M.** (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 723-749.
- Neuwald, A.F., Aravind, L., Spouge, J.L., and Koonin, E.V.** (1999). AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* **9**, 27-43.
- O'Neil, K.T., and DeGrado, W.F.** (1990). How calmodulin binds its targets: sequence independent recognition of amphiphilic alpha-helices. *Trends Biochem Sci* **15**, 59-64.
- Pavlov, P.F., Rudhe, C., Bhushan, S., and Glaser, E.** (2007). In vitro and in vivo protein import into plant mitochondria. *Methods Mol Biol* **372**, 297-314.
- Peeters, N., and Small, I.** (2001). Dual targeting to mitochondria and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1541**, 54-63.
- Pope, B., and Kent, H.M.** (1996). High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* **24**, 536-537.
- Pujol, C., Marechal-Drouard, L., and Duchene, A.M.** (2007). How can organellar protein N-terminal sequences be dual targeting signals? In silico analysis and mutagenesis approach. *J Mol Biol* **369**, 356-367.
- Obadou, S., Tien, R., Soll, J., and Schleiff, E.** (2003). Membrane insertion of the chloroplast outer envelope protein, Toc34: constraints for insertion and topology. *J Cell Sci* **116**, 837-846.
- Reddy, V.S., and Reddy, A.S.** (2004). Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* **65**, 1745-1776.
- Rhoads, A.R., and Friedberg, F.** (1997). Sequence motifs for calmodulin recognition. *FASEB J* **11**, 331-340.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A.** (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambrook, J., and Russel, D.W.** (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. CSHL Press.
- Schatz, G., and Dobberstein, B.** (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519-1526.
- Schleyer, M., Schmidt, B., and Neupert, W.** (1982). Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur J Biochem* **125**, 109-116.
- Small, I., Wintz, H., Akashi, K., and Mireau, H.** (1998). Two birds with one stone: genes that encode products targeted to two or more compartments. *Plant Mol Biol* **38**, 265-277.

- Small, I., Peeters, Nemo, Legeai, Fabrice, Lurin, Claire.** (2004). Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *PROTEOMICS* **4**, 1581-1590.
- Soll, J., and Schleiff, E.** (2004). Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 198-208.
- Stahl, T., Glockmann, C., Soll, J., and Heins, L.** (1999). Tic40, a new "old" subunit of the chloroplast protein import translocon. *J Biol Chem* **274**, 37467-37472.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N., and Wagner, R.** (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol* **8**, 1074-1082.
- Ungermann, C., Nichols, B.J., Pelham, H.R., and Wickner, W.** (1998). A vacuolar v-t-SNARE complex, the predominant form in vivo and on isolated vacuoles, is disassembled and activated for docking and fusion. *J Cell Biol* **140**, 61-69.
- VanderVere, P.S., Bennett, T.M., Oblong, J.E., and Lamppa, G.K.** (1995). A chloroplast processing enzyme involved in precursor maturation shares a zinc-binding motif with a recently recognized family of metalloendopeptidases. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 7177-7181.
- Waegemann, K., and Soll, J.** (1996). Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J Biol Chem* **271**, 6545-6554.
- Waegemann, K., and Soll, J.** (1991). Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *The Plant Journal* **1**, 149-158.
- Walker, J.E., Saraste, M., Runswick, M.J., and Gay, N.J.** (1982). Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* **1**, 945-951.
- Wang, Z., Xie, W., Chi, F., and Li, C.** (2005). Identification of non-specific lipid transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in Arabidopsis. *FEBS Lett* **579**, 1683-1687.
- Westphal, S., Soll, J., and Vothknecht, U.C.** (2001). A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Lett* **506**, 257-261.
- White, S.R., and Lauring, B.** (2007). AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery. *Traffic* **8**, 1657-1667.
- Yap, K.L., Kim, J., Truong, K., Sherman, M., Yuan, T., and Ikura, M.** (2000). Calmodulin target database. *J Struct Funct Genomics* **1**, 8-14.
- Zielinski, R.E.** (1998). Calmodulin and Calmodulin-Binding Proteins in Plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **49**, 697-725.

10 Publikationen

Bussemer, J., Chigri, F., and Vothknecht, U.C. (2009). AFG1-like Protein 1 (AFG1L1) is a Calmodulin-binding AAA⁺-ATPase dual targeted to Chloroplasts and Mitochondria. FEBS Letters, submitted

Kuhn, S., Bussemer, J., Chigri, F., and Vothknecht, U.C. (2009). Calcium depletion and calmodulin inhibition affect import of nuclear-encoded proteins into plant mitochondria. The Plant Journal [epub ahead of print]

11 Lebenslauf

Personenbezogene Daten:

| | |
|--------------|----------|
| Name | Bussemer |
| Vorname | Johanna |
| Geburtsdatum | 1979 |

Ausbildungsrelevante Daten:

| | |
|-----------------------|--|
| seit Mai 2005 | wissenschaftliche Mitarbeiterin LMU München mit Promotion, Fachbereich Zellbiologie |
| Okt. 1999 – Dez. 2004 | Studium Diplom-Biologie, TU München Abschluß: Diplom |

12 Danksagung

Mein herzlicher Dank geht an Frau Prof. Vothknecht für die Überlassung eines interessanten Themengebietes und die Möglichkeit, mich frei zu entwickeln. Danke für die vielfältige Unterstützung und Diskussionsbereitschaft sowie die vielen Gelegenheiten, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentieren zu können.

Bei Prof. Soll bedanke ich mich ebenfalls für das konstruktive Interesse an meiner Arbeit sowie für Antikörper und Klone.

Mein Dank geht an die Arbeitsgruppe, an Fatima Chigri, Claudia Sippel und Stephanie Otters, für eine tolle Arbeitsatmosphäre. Fatima danke ich für ihre immerwährende fachliche wie moralische Unterstützung während meiner ganzen Promotion. Ebenso danke ich Claudia für ihre Hilfe, besonders bei den vielen Mutanten.

Ich danke auch all den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern beider Arbeitsgruppen, im besonderen Suncana, Ewa, Serena, Rolf, Mislav, Oliver, Elena, Lea und Aleksandar für die netten Gespräche und die gute Atmosphäre, die ihr kreiert habt.

Vielen Dank an Kristina, Claudia, Nina und Annette für eure jahrelange Freundschaft!

Mein unermesslicher Dank geht an meine Eltern, die mich in allem unterstützt und vor allem verstanden haben. Ohne euren Rückhalt wäre mir Vieles unmöglich gewesen.

13 Anhang

Tabelle 4: Liste der in dieser Arbeit erzeugten Konstrukte
Die Zahlen bezeichnen die Position der Aminosäuren; AS: Aminosäure; N-terminal bzw. C-terminal: verkürztes Konstrukt im Amino- bzw. Carboxy-Terminus

| Konstrukt | Vektor | Verwendung | Beschreibung |
|---------------------------------|---------|-----------------------------|-------------------------|
| pOL-pAFG1L1 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pAFG1L1 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pOL-pAFG1L2 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pAFG1L1 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pET-mAFG1L1 ₆₀₋₄₉₇ | pET21.d | heterologe Expression | maures Protein |
| pET-mAFG1L1 ₆₀₋₃₈₀ | pET21.d | heterologe Expression | C-terminal bis 380. AS |
| pET-mAFG1L1 ₆₀₋₂₉₂ | pET21.d | heterologe Expression | C-terminal bis 292. AS |
| pET-mAFG1L1 ₁₀₃₋₄₉₇ | pET21.d | heterologe Expression | N-terminal ab 103. AS |
| pET-mAFG1L1 ₁₃₃₋₄₉₇ | pET21.d | heterologe Expression | N-terminal ab 133. AS |
| pET-mAFG1L1 ₁₅₉₋₄₉₇ | pET21.d | heterologe Expression | N-terminal ab 159. AS |
| pET-mAFG1L1 _{Δ141-161} | pET21.d | heterologe Expression | Protein ohne AS 141-161 |
| pOL-pAdI4 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pAdI4 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pOL-pRHA1 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pRHA1 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pOL-pCML6 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pCML6 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pET-TOPP2 ₇₀₋₂₅₅ | pET21.d | heterologe Expression | Protein von AS 70-255 |
| pOL-pTOPP4 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pTOPP4 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pOL-pTOPP5 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pTOPP5 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |

| Konstrukt | Vektor | Verwendung | Beschreibung |
|------------|--------|-----------------------------|------------------|
| pOL-pTOPP6 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pTOPP6 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pOL-pTOPP7 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pTOPP7 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pOL-pTOPP8 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pTOPP8 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pOL-pPP2A | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pPP2A | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |
| pOL-pPP2A4 | pOL-LP | Protoplasten-Transformation | Vorstufenprotein |
| pSP-pPP2A4 | pSP65 | Transkription/Translation | Vorstufenprotein |