
Strukturelle Analyse zur Oligomerisierung und Membranassoziation von Vipp1 aus *A. thaliana*

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

Vorgelegt von
Stephanie Otters

München, 14. Februar 201

Dissertation eingereicht am: 14. Februar 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 27. April 2011

Erstgutachter: Prof. Dr. U. Vothknecht

Zweitgutachter: Prof. Dr. T. Mascher

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 14. Februar 2011

Stephanie Otters

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungen	7
1 Einleitung	1
1.1 Der Ursprung der oxygenen Photosynthese	1
1.2 Die Entstehung der Chloroplasten	1
1.3 Thylakoidbiosynthese und Vesikeltransport	2
1.4 Bedeutung von Vipp1 für die Thylakoidbiogenese	3
1.5 PspA, ein Homolog von Vipp1 in Bakterien.....	4
1.6 Oligomerisierung Vipp1	7
1.7 Lokalisierung von Vipp1	8
1.8 Ziel der Arbeit.....	9
2 Material und Methoden.....	10
2.1 Material	10
2.1.1 Chemikalien.....	10
2.1.2 Enzyme und Kits.....	10
2.1.3 Bakterienstämme.....	10
2.1.4 Verwendete Konstrukte	11
2.1.5 Verwendete Vektoren	12
2.1.6 Membranen, Größenmarker, Säulenmaterial	12
2.1.7 Antiseren	13
2.2 Molekularbiologische Methoden	13
2.2.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden	13
2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategie.....	13
2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus <i>A. thaliana</i>	14
2.3 Biochemische Methoden	14
2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	14
2.3.2 Coomassie-Färbung.....	15
2.3.3 Silberfärbung	15
2.3.4 Western Blot und Immunodekoration von Proteinen	15
2.3.5 Proteinbestimmung.....	16
2.3.6 TCA-Fällung von Proteinen	17
2.3.7 Methanol-Chloroform-Fällung.....	17
2.3.8 Aufkonzentrieren und Umpuffern.....	17
2.4 Zellbiologische Methoden.....	18

INHALTSVERZEICHNIS

2.4.1	Isolierung intakter Chloroplasten aus Erbse	18
2.4.2	Isolierung des Stromas aus Chloroplasten aus <i>P. sativum</i>	18
2.4.3	Isolierung von IE-Vesikeln aus Erbsenchloroplasten.....	18
2.4.4	Isolierung intakter Chloroplasten aus <i>A. thaliana</i>	19
2.4.5	Heterologe Expression rekombinanter Proteine	19
2.4.6	Lyse von <i>E. coli</i> - Zellen unter nativen Bedingungen.....	20
2.5	Chromatographische Methoden	20
2.5.1	Affinitätschromatographie an Ni ²⁺ -NTA-Agarose	20
2.5.2	Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose.....	20
2.5.3	Größenausschluss-Chromatographie (GAC).....	21
2.6	Proteolytischer Verdau rekombinanter Proteine.....	22
2.7	Proteolytischer Verdau der IE-Vesikel aus <i>P. sativum</i>	22
2.8	Flotierungsversuche	23
2.9	Saccharose-Gradienten	23
2.10	Negativkontrastierung	24
2.11	Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie (FTIR).....	24
2.12	Proteinsequenzierung	24
2.13	Yeast-Two-Hybrid.....	25
2.14	Behandlung von Vipp1 mit zweiwertigen Kationen.....	25
2.15	Kristallisation	25
2.16	Computer-Analyse.....	25
3	Ergebnisse	26
3.1	Heterologe Expression von Vipp1-Protein in löslicher Form	26
3.2	Funktionsanalysen zur Vipp1-Komplexbildung.....	30
3.2.1	Verwendete Vipp1-Konstrukte.....	30
3.2.2	Größenausschluss-Chromatographie.....	32
3.2.3	Saccharose-Gradienten.....	38
3.2.4	Negativkontrastierung.....	40
3.2.5	Trypsinbehandlung	43
3.2.6	Untersuchung der Stabilität in Anwesenheit von Harnstoff.....	49
3.3	Interaktion von Vipp1 mit Lipiden	54
3.3.1	Proteolytischer Verdau der IE-Vesikel aus Erbsenchloroplasten.....	54
3.3.2	Lokalisation von Vipp1 am IE von Chloroplasten.....	57
3.3.3	Interaktion von Vipp1 mit IE-Vesikeln aus Chloroplasten	58

INHALTSVERZEICHNIS

3.3.4	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie	61
3.4	Funktion der C-terminalen Domäne von Vipp1	66
3.4.1	Komplementation von Vipp1-Mutanten mit Vipp1_1-219.....	67
3.4.2	Interaktion des Vipp1 C-Terminus mit cpHsp70	69
3.5	Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung von Vipp1.....	75
3.5.1	Behandlung von Vipp1 mit zweiwertigen Ionen	75
3.5.2	Kristallisierung von Vipp1	76
3.5.3	Yeast Two Hybrid-Screens	76
4	Diskussion.....	79
4.1	Sekundärstruktur	79
4.2	Oligomerisierung	81
4.3	Membranassoziation	85
4.4	Interaktionspartner	87
4.5	Orientierung	90
5	Zusammenfassung.....	92
6	Abstract	93
7	Referenzen.....	94

Abkürzungen

AP	Alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BN-PAGE	Blue-Native-PAGE
BSA	Rinderserum-Albumin (bovine serum albumin)
C-terminus	Carboxy-Terminus
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FNR	Ferredoxin-NADP Oxidoreduktase
FTIR-Spektrometrie	Fourier-Transform-Infrarot-Spektrometrie
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N-ethansulfonsäure
HRP	Horseradish / Meerrettich-Peroxidase
cpHsp70	chloroplastidäres Heat shock protein, 70 kDa
IE	innere Chloroplastenhüllmembran
MWCO	Ausschlussvolumen (molecular weight cutoff)
NBT	4-Nitrotetrazoliumchlorid Blauhydrat
N-Terminus	Amino-Terminus
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
OE	äußere Chloroplastenhüllmembran
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PspA	Phage shock protein A
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
Tic	Translokase der inneren Hüllmembran
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan

1 Einleitung

1.1 Der Ursprung der oxygenen Photosynthese

Das Leben auf der Erde hat sich vor etwa 3,8 - 4 Milliarden Jahren entwickelt (Xiong und Bauer, 2002). Der Übergang von einem anoxygenen zu einem sauerstoffreichen Planeten, der sich ca. 1 Milliarden Jahre danach ereignete, steht dabei in enger Verbindung mit dem Auftreten der ersten Cyanobakterien und der Evolution der oxygenen Photosynthese (Lyons, 2007). Vorgänger der heutigen Cyanobakterien entwickelten diese Methode der Energiegewinnung, in der die Umwandlung von Lichtenergie zu chemischer Energie mit der Freisetzung von Sauerstoff einhergeht. Die Befähigung zur oxygenen Photosynthese ist das wichtigste Charakteristikum von Pflanzen und Cyanobakterien, da der in der Erdatmosphäre vorhandene Sauerstoff nahezu vollständig das Produkt dieses Prozesses ist. Oxygene Photosynthese, wie sie heute in den Plastiden von Algen und höheren Pflanzen stattfindet, entwickelte sich einst aus einer simpleren, anoxygenen Form und benötigt die enge Zusammenarbeit zweier Photosysteme. Diese sind auf den Thylakoiden, einem internen Membransystem, das nicht mit der Plasma- oder der inneren Hüllmembran in Verbindung steht und von den Vorgängern der heutigen Cyanobakterien etabliert wurde, lokalisiert. Die Thylakoidmembran ist eines der wenigen Beispiele für Endomembransysteme in Bakterien und eine wesentliche Voraussetzung für eine effiziente oxygene Photosynthese.

1.2 Die Entstehung der Chloroplasten

Chloroplasten sind die charakteristischen Organellen photosynthetischer Algen und Pflanzen, in denen die Primärreaktionen der oxygenen Photosynthese ablaufen. Eukaryoten haben die oxygene Photosynthese allerdings nicht selbst etabliert, der Prozess entwickelte sich mehr als zwei Milliarden Jahre zuvor in den Vorläufern der heutigen Cyanobakterien (Archibald, 2009). Eukaryoten erlangten diese Fähigkeit schließlich durch den Prozess der primären Endosymbiose, d.h. der Aufnahme und stabilen Integration eines Organismus durch einen anderen. Die endosymbiotische Integration eines freilebenden Cyanobakterien-ähnlichen Prokaryo-

ten in eine eukaryotische Wirtszelle produzierte im Laufe der Evolution drei autotrophe Hauptlinien: die Rotalgen, die Grünalgen (sowie ihre Nachkommen, die Pflanzen) und die Glaukophyten.

Ein wichtiger Aspekt der endosymbiotischen Schöpfung des Chloroplasten war die Einführung der oxygenen Photosynthese in das eukaryotische Reich. Allerdings war die Photosynthese nicht die einzige Fähigkeit, die durch die Aufnahme des Cyanobakteriums während der Chloroplastenevolution übernommen wurde. Viele metabolische Kapazitäten der Pflanzenzelle gehen heute auf Prozesse zurück, die in Chloroplasten stattfinden (z.B. Fettsäurebiosynthese, Nitrit- und Sulfatreduktion, Aminosäuresynthese).

1.3 Thylakoidbiosynthese und Vesikeltransport

Thylakoide sind die photosynthetisch aktiven Membranen in Cyanobakterien und Chloroplasten. Das Thylakoidmembransystem entwickelte sich in Cyanobakterien zeitgleich mit der Evolution der oxygenen Photosynthese und erzeugte ein neues Kompartiment in der Zelle, das Thylakoidlumen (Vothknecht und Soll, 2005).

Thylakoide sind exklusiv in Organismen vorhanden, die zur oxygenen Photosynthese befähigt sind und die Möglichkeiten, ein solches Membransystem aufzubauen und zu modifizieren, wurden vom cyanobakteriellen Endosymbionten auf den Chloroplasten übertragen. Thylakoidmembranen beinhalten eine Lipiddoppelschicht einzigartiger Komposition im Hinblick auf die Lipidzusammensetzung und die Menge der enthaltenen Proteinkomplexe (Benning, 2009). Die Thylakoidmembran von Chloroplasten enthält die bedeutendsten photosynthetischen Komplexe, die aus mehreren im Kern sowie in den Chloroplasten kodierten Untereinheiten zusammengesetzt sind (Schünemann, 2007).

Trotz der wichtigen Funktion dieses Membransystems ist bislang relativ wenig über die einleitenden Schritte der Thylakoidbiogenese während der Entwicklung von Chloroplasten aus undifferenzierten Proplastiden bekannt. Sie scheint allerdings mit einer Invagination der inneren Hüllmembran zu beginnen (Muehlethaler und Frey-Wyssling 1959). Die Bildung der Thylakoid-Lipiddoppelschicht ist dabei eng gekoppelt an die Akkumulation der photosynthetischen Proteinkomponenten. Die Komplexität der Thylakoidbiosynthese entsteht aus der Tatsache, dass vier

Membransysteme an diesem Prozess beteiligt sind: Die Thylakoidmembran als ultimativer Empfänger polarer Lipide, sowie die äußere und innere Chloroplastenhüllmembran und das Endoplasmatische Retikulum (ER, Benning, 2009) als Orte der Lipidsynthese. Arabidopsis gehört zu der Gruppe von Pflanzen, die Thylakoid-Glycerolipide *de novo* an den chloroplastidären Hüllmembranen herstellen können. Zusätzlich können Thylakoid-Lipidvorstufen, die vom ER synthetisiert wurden, importiert werden.

Frühere elektronenmikroskopische Studien zeigten, dass das Stroma unter bestimmten Bedingungen vesikelähnliche Strukturen zwischen der inneren Hüllmembran und der äußeren Thylakoidmembran aufweist (Muehlethaler und Frey-Wyssling, 1959). Die Strukturen wurden als Transportvesikel deklariert, speziell nachdem *in vivo* und *in organellar*-Studien zeigten, dass diese Vesikel unter Bedingungen akkumulieren, die Vesikelfusionen in eukaryotischen Systemen inhibieren (Westphal *et al.*, 2001b). Weitere Analysen bestätigten die Präsenz eines vesikulären Transportsystems als ein gemeinsames Charakteristikum von Gefäßpflanzen (Westphal *et al.*, 2001b). Die exakte Rolle eines solchen Transportsystems muss noch geklärt werden, allerdings ist eine thematisierte Funktion die Instandhaltung des Thylakoidmembran-Systems in murenen Chloroplasten, wo eine Verbindung zwischen den Thylakoiden und der inneren Hüllmembran nicht länger existiert. Es wird angenommen, dass die Vesikel Lipide von der inneren Hüllmembran zur Thylakoidmembran transportieren, da die Thylakoidmembran keine Möglichkeiten besitzt die Lipide, aus denen sie zusammengesetzt ist, selbst herzustellen. Es ist durchaus möglich, dass in den Vesikeln noch andere Komponenten transportiert werden. Da Vesikel im Cytosol häufig für den Transport von Proteinen genutzt werden, ist es vorstellbar, dass solch ein System auch in Chloroplasten Verwendung findet. Zum Verständnis der Thylakoidbiogenese ist es daher hilfreich, Komponenten in Pflanzen zu identifizieren, die in diesem Prozess eine Rolle spielen und diese zu charakterisieren.

1.4 Bedeutung von Vipp1 für die Thylakoidbiogenese

Vipp1 (Vesicle inducing Protein in Plastids 1) wurde im Jahre 1994 von Li und Mitarbeitern erstmal als Protein beschrieben, das in Chloroplasten lokalisiert ist

(Li *et al.*, 1994). Wie die meisten chloroplastidären Proteine wird Vipp1 im Zellkern kodiert, von cytosolischen Ribosomen als Vorstufenprotein translatiert und nach dem Import in den Chloroplasten zu einer maturen Form von etwa 30 kDa prozessiert.

Das Protein Vipp1 aus *Arabidopsis thaliana* wurde aufgrund des Phänotyps von Mutanten, in denen die Expression des Vipp1-Gens durch eine TDNA-Insertion in der Promotorregion auf 20 % des Wildtyp-Gehalts reduziert ist, mit dem Prozess der Thylakoidbiogenese in Verbindung gebracht. Vipp1-Mutanten sind nicht länger in der Lage, ein funktionales Thylakoidmembran-System aufzubauen (Kroll *et al.*, 2001). Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten dieser Pflanzen zeigten ein schwer geschädigtes Thylakoidsystem, das aus wenigen unstrukturierten Lamellen besteht und im Laufe der Entwicklung fast vollständig degradiert. Als Konsequenz zeigen Vipp1-Mutanten ein albinotisches Erscheinungsbild und weisen erhebliche Einschränkungen in der Durchführung der oxygenen Photosynthese auf. Eine drastische Reduktion des Vipp1-Gehalts in *Synechocystis* PCC6803 resultierte in einem ähnlichen Phänotyp, was die in *A. thaliana* ermittelten Ergebnisse zur Funktion von Vipp1 auch für Cyanobakterien bestätigt (Westphal *et al.*, 2001a). Die Verminderung des Vipp1-Proteins in *A. thaliana* führte zusätzlich zu Defiziten in der Vesikelabschnürung von der inneren Hüllmembran der Chloroplasten, was ein Hinweis darauf ist, dass zwischen Vipp1, der Thylakoidbiogenese und dem Vesikeltransport ein Zusammenhang besteht (Kroll *et al.*, 2001). Im Gegensatz zum Vesikeltransport, der auf Landpflanzen begrenzt zu sein scheint, ist das Vipp1-Protein jedoch auch in Cyanobakterien und Grünalgen vorhanden (Kroll *et al.*, 2001, Westphal *et al.*, 2001b), was eine auf den Vesikeltransport beschränkte Funktion ausschließt.

1.5 PspA, ein Homolog von Vipp1 in Bakterien

Gene, die für Vipp1-Proteine kodieren, kommen in nahezu allen Organismen vor, die oxygene Photosynthese betreiben. Darüber hinaus wurden in vielen heterotrophen Bakterien Homologe von Vipp1 in Form von PspA, einer Untereinheit des bakteriellen „Phage Shock Operons“ gefunden. Das Phage Shock Protein (Psp) - System antwortet auf extracytoplasmatischen Stress, der den Energie-Status der

Bakterienzelle reduziert. Verschiedene Stressoren, wie beispielsweise die Infektion von Bakterienzellen mit filamentösen Phagen (Brissette *et al.*, 1990), die Inhibierung der Lipidbiosynthese (Bergler *et al.*, 1994) und die Misslokalisierung oder Blockierung der Protein-Exportmaschinerie (DeLisa *et al.*, 2004, Kleerebezem *et al.*, 1996, Kleerebezem und Tommassen, 1993) induzieren die Expression der Psp-Gene. Das Psp-System umfasst insgesamt sieben Proteine, deren Expression vom *psp*-Regulon reguliert wird (Darwin, 2005). Die Transkription der *psp*-Gene benötigt den Transkriptionsaktivator PspF, dem eine N-terminale regulatorische Domäne fehlt und der stattdessen negativ durch PspA reguliert wird. PspA regelt somit seine eigene Expression durch die Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor PspF (Dworkin *et al.*, 2000, Elderkin *et al.*, 2002). PspA-PspF-Interaktionen inhibieren die ATPase-Aktivität von PspF, was in einer Inhibierung der PspF-abhängigen Genexpression resultiert. Unter normalen Bedingungen wird die PspF-Aktivität also von PspA unterbunden (Dworkin *et al.*, 2000, Elderkin *et al.*, 2005, Elderkin *et al.*, 2002). Ein Verlust der Membranintegrität führt allerdings zu einer Aufhebung der negativen Regulation und einer Aktivierung der σ^{54} -abhängigen Transkription durch PspF (Jovanovic *et al.*, 1996, Kleerebezem und Tommassen, 1996, Lloyd *et al.*, 2004, Model *et al.*, 1997).

PspA ist ein etwa 25 kDa großes, hydrophiles Protein, das keinerlei Sequenzcharakteristiken integraler Membranproteine aufweist, in Bakterienzellen allerdings mit Membranen assoziiert ist (Brissette *et al.*, 1990, Cserzo *et al.*, 1997, Kobayashi *et al.*, 2007). Es ist das mit Abstand mengenmäßig herausragendste Protein des Psp-Systems und für viele Phänotypen, die mit diesem in Verbindung gebracht werden, verantwortlich. Es wird vermutet, dass PspA einen Effektor darstellt, der für die Aufrechterhaltung der cytoplasmatischen Membranintegrität und / oder der Protonenmotorischen Kraft in diversen Stresssituationen eine Rolle spielt. Die genaue Funktion von PspA konnte bisher noch nicht eruiert werden, allerdings gibt es Hinweise darauf, dass PspA in *Escherichia coli* in der Lage ist, Protonenlecks der bakteriellen Plasmamembran zu reparieren (Kobayashi *et al.*, 2007).

Viele Cyanobakterien exprimieren sowohl PspA als auch Vipp1. Die Gene beider Proteine sind im Genom des Cyanobakteriums *Anabaena* benachbart lokalisiert und weisen einen Abstand von lediglich 162 Basenpaaren auf, so dass vermutet wird, dass Vipp1 einst durch Gendublikation aus PspA hervorgegangen ist. Vipp1

wurde dann wahrscheinlich vom cyanobakteriellen Endosymbionten ins Pflanzen-genom eingeführt. Während viele Cyanobakterien in der Lage sind, sowohl PspA als auch Vipp1 zu synthetisieren, wurden bislang noch keine pflanzlichen Vertreter ermittelt, in denen ebenfalls beide Proteine vorkommen. Dies lässt darauf schließen, dass PspA entweder schon im ursprünglichen Endosymbionten gefehlt hat oder den Pflanzenzellen zumindest relativ früh verloren ging. Phylogenetische Analysen zeigen eine starke Homologie zwischen pflanzlichen und cyanobakteriellen Vipp1-Proteinen. Auch cyanobakterielle PspA-Proteine sind im phylogenetischen Stammbaum in derselben Gruppe lokalisiert, während die PspA-Proteine heterotropher Bakterien eine eigene Verzweigung bilden (Westphal *et al.*, 2001b). Vipp1 und PspA zeigen eine eher niedrige Homologie in ihrer Primärsequenz, dennoch sind die Sekundär- und Tertiärstruktur beider Proteine hochkonserviert (Bultema *et al.*, 2010, Westphal *et al.*, 2001b). Sowohl Vipp1 als auch sein Homolog PspA weisen eine weitgehend α -helikale Struktur auf, die durch Coiled Coil-Bildung gekennzeichnet ist. Wie es für Proteine mit einem solchen strukturellen Motiv typisch ist, bilden sowohl PspA als auch Vipp1 hochmolekulare Komplexe. PspA tritt in bakteriellen Zellen somit als ringförmiger Komplex auf, dessen Molekulargewicht ungefähr 1 MDa umfasst und der in einer 9-fachen Rotationssymmetrie arrangiert ist (Hankamer *et al.*, 2004). In einen Komplex sind insgesamt 36 PspA-Monomere integriert. Diese Sekundär- und Tertiärstruktur ist auch in Vipp1-Proteinen weitestgehend erhalten (Aseeva *et al.*, 2004, Fuhrmann *et al.*, 2009).

Die signifikante strukturelle Ähnlichkeit von Vipp1 und seinem Homolog PspA ließ zunächst auf eine ähnliche Wirkweise spekulieren. Tatsächlich ist Vipp1 in manchen Situationen in der Lage, die Funktion von PspA zu übernehmen. So konnte Vipp1 aus *Synechocystis* PPC 6803 in PspA-Mutanten die Exporteffizienz des Tat-Weges signifikant erhöhen (DeLisa *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu resultierte die starke Reduktion des Vipp1-Gehalts in *Synechocystis* in einem drastischen Phänotyp, was impliziert, dass das verbleibende PspA nicht in der Lage ist, das Vipp1-Defizit auszugleichen (Westphal *et al.*, 2001b).

Vipp1- und PspA-Proteine unterscheiden sich durch eine C-terminale Extension von etwa 30 Aminosäuren, die ein generelles Charakteristikum von Vipp1 darstellt, PspA aber gänzlich fehlt (Westphal *et al.*, 2001b). Die Vipp1-spezifische C-terminale

nale Verlängerung wurde als offensichtliches Unterscheidungsmerkmal zwischen den beiden Proteinen mit der neu erworbenen Funktion von Vipp1 in der Thylakoidbiogenese in Verbindung gebracht (Aseeva *et al.*, 2004, Westphal *et al.*, 2001). Das Fehlen dieser Sequenz in PspA-Proteinen wäre eine Erklärung dafür, dass PspA die Funktion von Vipp1 nicht komplementieren kann.

1.6 Oligomerisierung Vipp1

Die Analyse nativer Proteinkomplexe aus Chloroplasten von *A. thaliana* mittels Blue Native PAGE (BN-PAGE) und Größenausschluss-Chromatographie (GAC) identifizierte Vipp1 als einen hochmolekularen Komplex von etwa 2 MDa. Die Assemblierung zum Oligomer erfolgte ebenfalls mit rekombinantem Protein, was zu der Annahme führte, dass an der Komplexbildung keine weiteren Proteine beteiligt sind und sich der Komplex aus multiplen Kopien von Vipp1 zusammensetzt (Aseeva *et al.*, 2004). Dabei wird davon ausgegangen, dass die kleinste funktionelle Untereinheit des Vipp1-Komplexes ein Vipp1-Tetramer darstellt (Bultema *et al.*, 2010, Fuhrmann *et al.*, 2009). Transmissionselektronenmikroskopie-Aufnahmen (TEM) von heterolog exprimiertem Vipp1 eruierten eine ringförmige Struktur für das Vipp1-Homooligomer, die ähnlich ist zu der, die bereits für das PspA Protein bekannt ist (Aseeva *et al.*, 2004, Hankamer *et al.*, 2004). Aufgrund des mittels GAC errechneten Molekulargewichts und der in TEM-Aufnahmen ermittelten Maßen der Vipp1-Komplexe wird angenommen, dass sich das hochmolekulare Vipp1-Oligomer aus etwa 64 Einzelmolekülen zusammensetzt und damit doppelt so groß ist wie der von PspA gebildete Komplex. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass die N-terminale, PspA-ähnliche Domäne des Proteins zur Oligomerisierung benötigt wird, die C-terminale Vipp1-spezifische Verlängerung allerdings keine Rolle spielt (Aseeva *et al.*, 2004). Für Vipp1-Komplexe aus *Synechocystis* PCC 6803 wurde zudem in TEM-Aufnahmen von heterolog exprimiertem Protein eine 12 - 17-fache Rotationssymmetrie nachgewiesen, die deutlich macht, dass Vipp1-Komplexe aus einer variierenden Anzahl von Monomeren zusammengesetzt sein können (Fuhrmann *et al.*, 2009). Vipp1-Komplexe finden sich in Cyanobakterien, Grünalgen und höheren Pflanzen (Aseeva *et al.*, 2004, Fuhrmann *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2005). Die Konservierung

der Assemblierung von Vipp1-Proteinen zu einem hochmolekularen Komplex in verschiedenen Organismen ist ein Hinweis darauf, dass die Oligomerisierung eine verbreitete Besonderheit darstellt, die eine essenzielle Voraussetzung für die Funktionalität des Proteins darstellt. Es konnte tatsächlich in vorangegangenen Versuchen gezeigt werden, dass in Vipp1-Mutanten, die nur 20 % des Vipp1-Wildtyp Gehalts exprimieren, keine Vipp1-Komplexe detektiert werden können (Aseeva *et al.*, 2007). Dies wurde damit erklärt, dass die Menge des in den Mutanten verbleibenden Vipp1 nicht ausreicht, um Komplexe zu bilden, denn offensichtlich wird eine kritische Menge an Proteinen für die Komplexbildung benötigt. Der drastische Phänotyp der Vipp1-Mutanten und die Defizite dieser Pflanzen in der Assemblierung von Vipp1 zum homooligomeren Komplex scheinen miteinander in Verbindung zu stehen. Es ist daher anzunehmen, dass die Oligomerisierung des Proteins eine Voraussetzung für dessen Wirkweise darstellt.

1.7 Lokalisierung von Vipp1

Vipp1 wird als membranassoziiertes Protein beschrieben. Mithilfe hydropatischer Analysen ließen sich Intermembrandomänen innerhalb des Vipp1-Proteins sowohl in Arabidopsis und Erbse, als auch in *Synechocystis* weitgehend ausschließen. Dies impliziert, dass das Protein nur peripher mit der Chloroplastenmembran in Verbindung steht (Kroll *et al.*, 2001, Li *et al.*, 1994, Westphal *et al.*, 2001).

Vipp1 wurde sowohl in Chloroplasten von Grünalgen und höheren Pflanzen als auch in *Synechocystis* an der inneren Hüllmembran der Chloroplasten bzw. der Plasmamembran detektiert (Aseeva *et al.*, 2004, Fuhrmann *et al.*, 2009, Kroll *et al.*, 2001, Li *et al.*, 1994, Liu *et al.*, 2005, Westphal *et al.*, 2001b). Manchen Analysen zufolge konnte das Protein allerdings ebenfalls an den Thylakoidmembranen nachgewiesen werden. Außerdem wurde gezeigt, dass eine signifikante Vipp1-Menge im Stroma bzw. Cytoplasma von Grünalgen und Cyanobakterien detektiert werden kann. Für PspA, das Vipp1-Homolog in Bakterien, wurde eine Interaktion mit PspB und PspC, zwei integralen Membranproteinen und Untereinheiten des Psp-Systems beschrieben (Adams *et al.*, 2003). Es wurde ebenfalls nachgewiesen, dass das Protein in der Lage ist, direkt mit den Phospholipiden der Plasmamembran zu interagieren (Kobayashi *et al.*, 2007).

Analysen mit Vipp1-Fusionsproteinen, die in Protoplasten transformiert wurden, zeigten eine ausschließliche Lokalisation von Vipp1 aus Arabidopsis an der inneren Hüllmembran der Chloroplasten (Aseeva *et al.*, 2004). Eine Entfernung der C-terminalen Verlängerung des Proteins veränderte dessen Lokalisation nicht, was darauf schließen lässt, dass der Vipp1-spezifische C-Terminus keine Rolle spielt für dessen Anbindung an Membranlipide. Die Assoziation von Vipp1 mit Lipiden der inneren Hüllmembran ist dabei vielmehr von seiner PspA-ähnlichen Domäne abhängig, da das GFP-Signal eines Vipp1-Konstrukts, dem eine zentrale α -Helix fehlte, nach der Transformation eine diffuse Verteilung des Proteins in Chloroplasten aufwies (Aseeva *et al.*, 2004). Demzufolge ist die zentrale α -Helix, die für die Assemblierung von Vipp1 zu einem hochmolekularen Komplex benötigt wird, ebenfalls für die Lokalisation des Proteins an der inneren Hüllmembran des Chloroplasten essenziell. Da diese Domäne in beiden Prozessen eine Rolle spielt, ist es denkbar, dass Komplexbildung und Membranassoziation miteinander in Verbindung stehen.

Bislang konnte der C-terminalen, Vipp1-spezifischen Domäne keine essenzielle Funktion zugesprochen werden. Die Tatsache, dass sich diese Extension entwickelt und im Evolutionsverlauf etabliert hat, lässt allerdings vermuten, dass diesem Bereich des Proteins eine Aufgabe zukommt, die möglicherweise mit der neu erworbenen Funktion des Proteins in der Thylakoidbiogenese korreliert.

1.8 Ziel der Arbeit

Die Evolution der oxygenen Photosynthese steht in enger Verbindung mit der Entwicklung der Thylakoidmembran als strukturelle Plattform für Proteinkomplexe, die in diesen Prozess involviert sind. Für den Aufbau eines funktionellen Membransystems ist das Protein Vipp1 von maßgeblicher Bedeutung. Das Ziel dieser Arbeit war es, eine strukturelle Charakterisierung des Proteins durchzuführen und dabei Bereiche des Proteins zu ermitteln, die notwendig sind für dessen Assemblierung zum hochmolekularen Komplex und der Assoziation mit Membranlipiden. Ein weiterer Fokus wurde in die Aufklärung der Rolle der C-terminalen Vipp1-spezifische Verlängerung gesetzt. Auf diese Weise sollte der Unterschied zu PspA und die spezielle Funktion von Vipp1 in der Thylakoidbiogenese erläutert werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in höchstmöglicher Qualität von namenhaften Herstellern bezogen. Spezielle Chemikalien stammten von folgenden Firmen: Nukleotide von Peqlab (Erlangen, Deutschland), Complete Protease Inhibitor Cocktail, ATP und Thermolysin von Roche (Mannheim, Deutschland), Apyrase, Lipase, Thermolysin, Trypsin und Trypsin Inhibitor von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland).

2.1.2 Enzyme und Kits

Die zur Klonierung verwendeten Restriktionsenzyme und DNA-Polymerasen wurden von Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland), New England Biolabs (Boston, USA), und Eppendorf (Hamburg, Deutschland) bezogen. Zur DNA-Isolierung im kleinen Maßstab wurde das Fast-Plasmid-Mini-Kit von Eppendorf verwendet. DNA-Isolierungen in größeren Mengen wurden mit dem Nucleobond AX Kit von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) durchgeführt. Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte mit dem Nucleospin Extract II Kit von Macherey-Nagel. Zur Klonierung in den Vektor pTrcHis2Topo wurde das pTrcHis2 Topo TA-Cloning-Kit von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet, für die Klonierung in pEntrD Topo wurde zunächst das pEntrD Topo-Kit von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) benutzt, die Ligation in den Vektor pDest17 oder pH2GW7 (Invitrogen) erfolgte schließlich mithilfe des LR Clonase II-Kits (Invitrogen).

2.1.3 Bakterienstämme

In dieser Arbeit wurden zur Vervielfältigung von Plasmiden die *E. coli*-Stämme JM 109 von New England Biolabs (Frankfurt, Deutschland) sowie Top 10 von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) verwendet. Zur Expression von rekombinantem Protein wurden die Stämme JM 109 (DE3) von Promega (Mannheim, Deutschland), BL 21 (DE3) und BL 21 (DE3) LysS von Novagen (Madison, USA) benutzt.

2.1.4 Verwendete Konstrukte

Tabelle 1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte

Die Zahlen bezeichnen jeweils die Position der Aminosäuren; AS: Aminosäure; N-terminal, bzw. C-Terminal: im Amino- bzw. Carboxy-Terminus verkürztes Konstrukt

Konstrukt	Vektor	Verwendung	Beschreibung
Vipp1 VI	pTrcHis2	Heterologe Expression	Matures Vollängenprotein
Vipp1 ₁₋₂₁₉	pTrcHis2	Heterologe Expression	C-terminal bis AS 219
Vipp1 ₁₋₂₀₁	pTrcHis2	Heterologe Expression	C-terminal bis AS 201
Vipp1 ₁₋₁₈₈	pTrcHis2	Heterologe Expression	C-terminal bis AS 188
Vipp1 ₁₋₁₆₃	pTrcHis2	Heterologe Expression	C-terminal bis AS 163
Vipp1 ₂₁₋₂₅₉	pTrcHis2	Heterologe Expression	C-terminal ab AS 21
Vipp1 ₇₁₋₂₅₉	pTrcHis2	Heterologe Expression	C-terminal ab AS 71
Vipp1 ₈₄₋₂₅₉	pTrcHis2	Heterologe Expression	C-terminal ab AS 84
Vipp1 ₁₆₃₋₂₅₉	pTrcHis2	Heterologe Expression	C-terminal ab AS 163
Vipp1 VI	pH2GW7	Stabile Transformation	Vollängenprotein
Vipp1 ₁₋₂₁₉	pH2GW7	Stabile Transformation	C-terminal bis AS 219
V _{C-term}	ZZpQE60KKK	Heterologe Expression	Vipp1 C-Terminus
Hsc70.2	pDest17	Heterologe Expression	Matures Vollängenprotein

2.1.5 Verwendete Vektoren

pDest17 Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

pTrcHis2 Topo Invitrogen, (Karlsruhe, Deutschland)

pEntrD Topo Invitrogen, (Karlsruhe, Deutschland)

pH2GW7 Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)

ZZpQE60KKK bereitgestellt von Dr. B Schwappach (Heidelberg)

2.1.6 Membranen, Größenmarker, Säulenmaterial

Nitrozellulose-Membranen (Protran BA 83; 0.2 µm) wurden von Schleicher und Schüll (Dassel, Deutschland), PVDF-Membranen (Polyvinylfluorid; Hybond-PVDF) von Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) und Blotpapier von Macherey-Nagel (Düren, Deutschland) bezogen. Das Molekulargewicht von in der denaturierenden SDS-PAGE aufgetrennten Proteinen wurde mit dem „Low Molecular Weight Marker“ (LMW) bestehend aus α-Lactalbumin (14 kDa), Trypsinogen (24 kDa), Carboanhydrase (29 kDa), Glyceraldehyd-3-Dehydrogenase (36 kDa), Hühnerei-Albumin (45 kDa) und Rinderserumalbumin (66 kDa) von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls der „Page Ruler Plus prestained Protein ladder“ von New England Biolabs verwendet. Als Größenstandard für die Agarose-Gelelektrophorese wurde mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HindIII geschnittene λ-Phagen DNA von Fermentas eingesetzt. Die in der Größenausschlusschromatographie eingesetzten Säulen Superdex 200 10/300 GL und Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), wurden mit folgenden Größenstandards equilibriert: Dextranblau (~2000 kDa), Aldolase (158 kDa), Rinderserumalbumin (67 kDa) Ribonuclease A (13.7 kDa), Ferritin (440 kDa) Ovalbumin (43 kDa). Alle Größenmarker stammten aus dem „Gel filtration calibration Kit“ HMW / LMW von GE Healthcare. Für die Anbindungsversuche an das C-terminale Ende von Vipp1 wurde IgG-Sepharose verwendet, die ebenfalls von GE Healthcare bezogen wurde. Rekombinante Proteine mit 6x Histidin-Tag wurden über Ni²⁺-NTA-Agarose von Quiagen aufgereinigt.

2.1.7 Antiseren

Die primären polyklonalen Antikörper α -Tic 32, α -Tic 55, α -Tic 110, α -FNR, α -Hsp70 und α -Vipp1 wurden gegen heterolog in *E. coli* exprimiertes Volllängen-Protein von *A. thaliana* in immunisierten Kaninchen erzeugt. Die sekundären Antikörper gekoppelt an Alkaline Phosphatase (Ziege-Anti-Kaninchen-IgG-AP) oder Merettich-Peroxidase (HRP-Konjugat) wurden von Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland) bezogen.

6x Histidin gekoppelte Proteine konnten zudem mit den Merettich-Peroxidase (HRP) und Alkaline Phosphatase (AP) -gekoppelten „His Detector Ni²⁺-Konjugaten“ von KPL (Gaithersburg, USA) nachgewiesen werden.

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Allgemeine Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit durchgeführten allgemeinen molekularbiologischen Methoden wie die Anzucht von Bakterienkulturen, das Anlegen von Stammkulturen, die Phenol/ Chloroform-Extraktion von DNA sowie deren Präzipitation mit Ethanol oder Isopropanol und die Konzentrationsbestimmung von DNA wurden nach den Protokollen von Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli*-Zellen erfolgte nach Hanahan, (1983). Notwendige Klonierungen, Restriktionsverdau und Transformationen in *E. coli* wurden nach den entsprechenden Herstellerangaben der verwendeten Enzyme und Kits durchgeführt. Die Isolation von plasmidärer DNA im kleinen Maßstab erfolgte entweder nach dem Prinzip der alkalischen Lyse mit Natriumdodecylsulfat (SDS, Sambrook und Russel, 2001) oder mit einem entsprechenden Kit nach Angaben des Herstellers. Zur Aufreinigung von PCR-Produkten wurden ebenfalls die Herstellerangaben des verwendeten Kits befolgt. Die Transformation von Plasmid-DNA in diverse Bakterienstämme erfolgte entweder nach Herstellerangaben des zur Ligation verwendeten Kits oder wie beschrieben (Pope und Kent, 1996).

2.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategie

Die Polymerase-Kettenreaktion, PCR, wurde angewandt, um diverse DNA-Sequenzen zu amplifizieren und wurde nach Sambrook und Russel (2001), sowie

nach Angaben der Enzymhersteller durchgeführt. Zunächst wurde das Template, in dieser Arbeit genomische DNA aus *A. thaliana* oder Plasmid-DNA, bei 96 °C für 30 sec denaturiert. Im Anschluß erfolgte ein Hybridisierungsschritt bei 53 - 58 °C für 30 sec, dessen Temperatur sich jeweils nach der Schmelztemperatur der eingesetzten Oligonucleotide richtete, immer etwa 5 °C unter dieser lag. Den Abschluss des Zyklus bildete ein Elongationsschritt bei 72 °C für 1 min. Der sich 25 - 35mal wiederholende Zyklus wurde mit einer 2-minütigen Denaturierung bei 96°C eingeleitet und mit einer finalen Elongationsphase von 7 min bei 72 °C abgeschlossen.

Das Amplifikat wurde anschließend in einem Agarose-Gel aufgetrennt, aus diesem extrahiert und direkt in die Ligation eingesetzt. Alle in dieser Arbeit verwendeten Klone wurden durch Sequenzierung vom Sequenzierungsservice des Departments I Biologie der LMU München (München, Deutschland) auf ihre Richtigkeit überprüft. Alle für diese Arbeit erzeugten Konstrukte sind im Anhang verzeichnet.

2.2.3 Isolierung genomischer DNA aus *A. thaliana*

Zur DNA-Extraktion aus *A. thaliana* wurde jeweils ein Blatt pro Ansatz mit 410 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl, pH 7,5, 250 mM NaCl, 0,5 % SDS) versetzt, in einer Kugelmühle zerkleinert, bei RT für 5 min inkubiert und anschließend bei 12000 g für 5 min zentrifugiert. 300 µl des DNA enthaltenden Überstandes wurden in ein neues Gefäß überführt. Die DNA wurde mit 300 µl Isopropanol durch anschließende Zentrifugation bei 18000 g für 15 min präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde getrocknet und in 100 µl ddH₂O resuspendiert. 3 µl davon wurden in der PCR eingesetzt.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen in Polyacrylamid-Gelen wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Die Proteine wurden dazu 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 % (w/v) Bromphenol-Blau) aufgenommen, 2 min bei 96 °C denaturiert und in

10 - 15 % igen Trenngelen mit einem Acrylamid- zu N,N'-Methylen-Bisacrylamid-Verhältnis von 37,5 : 1 aufgetrennt.

2.3.2 Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung der Proteinbanden mit Coomassie wurde das SDS-Gel 15 - 20 min in Coomassie-Färbelösung (50 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure und 0,18 % (w/v) Coomassie Brillant Blue R250) auf einem Horizontalschüttler geschwenkt und anschließend in Entfärber-Lösung (40 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure, und 3 % (v/v) Glycerin) solange unter Schütteln entfärbt, bis der Hintergrund farblos und die Proteinbanden deutlich zu erkennen waren. Anschließend wurden die Gele mit ddH₂O gewaschen.

2.3.3 Silberfärbung

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine im denaturierenden Gel wurden die SDS-Polyacrylamidgele zunächst für mindestens 60 min in einer Fixierlösung (40 % (v/v) Methanol, 7 % (v/v) Essigsäure, und 3 % (v/v) Glycerin) unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurden die Proteinbanden im Gel nach der Methode von Blum (1987) mit Silbernitrat angefärbt. Nach dem Protokoll wurde das Gel zunächst 3 mal für 20 min in 50 % (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend für eine Minute in Vorbehandlungslösung (0,02 % (w/v) Na₂S₂O₃) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit ddH₂O für jeweils 20 sec wurde das Gel für 20 min mit der Färbelösung (0,2 % (w/v) AgNO₃, 0,028 % (v/v) Formaldehyd) unter Schwenken inkubiert. Nach der Färbung wurde das Gel noch zweimal für 20 sec mit ddH₂O gewaschen, anschließend mit Entwicklerlösung (37,5 % (w/v) NaCO₃, 0,028 % (v/v) Formaldehyd und 0,0075 % (w/v) Na₂S₂O₃) behandelt und die Reaktion bei der gewünschten Intensität der Proteinbanden im Gel für 10 min mit Fixierlösung gestoppt. Abschließend wurde das Gel mit ddH₂O gewaschen.

2.3.4 Western Blot und Immunodekoration von Proteinen

Der Transfer von elektrophoretisch aufgetrennten Proteinen auf Nitrozellulose- bzw. Polyvinylidenfluorid (PVDF) -Membranen erfolgte nach der Semi-Dry-Blot Methode von Kyhse-Andersen (1984). PVDF-Membranen wurden zunächst nach Herstellerangaben vorbehandelt und die Proteine für eine Stunde bei 0,8 mA cm⁻¹ immobilisiert. Nach dem Transfer auf die Membran erfolgte die spezifische Identifizierung

des Antigens durch eine Reaktion des Proteins mit einem polyklonalen Antikörper. Die Detektion der Proteine wurde durch einen enzymgekoppelten sekundären Antikörper gewährleistet. In dieser Arbeit wurde an alkalische Phosphatase (AP) und Meerrettich-Peroxidase (HRP) gekoppeltes Anti-Kaninchen-IgG verwendet. Nitrozellulosemembranen wurden nach dem Transfer mit Ponceaulösung (0,5 % (w/v) Ponceau S, 1 % Essigsäure) behandelt, um die Banden des verwendeten Größenstandards identifizieren zu können, in Verbindung mit PVDF-Membranen wurde immer ein Prestained-Marker verwendet. Nach Absättigung der Membran für 60 min in Magermilchpuffer (1 % (w/v) Magermilchpulver, 50 mM Tris-HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0,01 % (v/v) Tween 20) wurden die Membranen entweder für eine Stunde bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit dem entsprechenden spezifischen Antikörper verdünnt in Magermilchpuffer (Verdünnung variierte je nach Antikörper) inkubiert. Nicht-gebundenes Antiserum wurde durch drei Waschschrte (je 10 min mit Magermilchpuffer) entfernt. Anschließend wurde die Membran für 60 min bei RT mit dem sekundären Antikörper (1:10000 Verdünnung in Magermilchpuffer) behandelt und das Entfernen von nicht-gebundenem Phosphatase- bzw. Peroxidase-Konjugat Antikörper durch eine dreiteilige Waschsequenz (jeweils 10 min) mit Magermilchpuffer gewährleistet. Die Detektion der Protein-Antikörper-Bindung erfolgte im Falle der Nutzung des Alkaline Phosphatase gekoppelten sekundären Antikörpers durch eine Farbreaktion mit 0,003 % (w/v) 4-Nitrotetrazoliumchlorid Blauhydrat (NBT) und 0,017 % (w/v) 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat (BCIP) in Entwicklerlösung (100 mM Tris-HCl pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂). Die Reaktion wurde durch das Überführen der Membranen in 5 mM EDTA gestoppt. Die Entwicklung der Reaktion mit dem HRP- gekoppelten sekundären Antikörper wurde mit dem „Enhanced chemiluminescence“ (ECL) - Kit von GE Healthcare nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.5 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) und wurde mit dem Protein Essay-Kit von Bio-Rad (München, Deutschland) durchgeführt. Die zu bestimmende Proteinlösung wurde nach Herstellerangaben gemischt und für 20 min bei RT inkubiert. Die Proteinkonzentration wurde an-

schließlich nach Messung der Extinktion bei 595 nm mithilfe einer zuvor erstellten Eichkurve mit Rinder-Serumalbumin errechnet.

2.3.6 TCA-Fällung von Proteinen

Zur Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure (TCA) wurden die Proben mit 25 % TCA versetzt, gut gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Auf diese Weise ausgefälltes Protein wurde pelletiert (15 min, 15000 g, 4 °C), der Überstand vollständig entfernt und das Proteinpellet bei RT getrocknet. Anschließend erfolgte die Resuspension des Pellets in SDS-Solubilisierungspuffer.

2.3.7 Methanol-Chloroform-Fällung

Um Proteine mittels Methanol-Chloroform-Fällung zu präzipitieren (nach Wessel und Flügge, 1984), wurde jeweils 100µl Probe zunächst mit 400µl Methanol, 100µl Chloroform und 300µl ddH₂O gemischt und anschließend für 1 min auf höchster Stufe in einer Tischzentrifuge bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt, mit 300µl Methanol versetzt und erneut zentrifugiert. Das präzipitierte Protein (im Pellet) wurde nun mit Aceton gewaschen und anschließend getrocknet.

2.3.8 Aufkonzentrieren und Umpuffern

Zur Aufkonzentrierung von Proteinen wurden in dieser Arbeit verschiedene Zentrifugenfilter eingesetzt, die je nach Volumen des Ansatzes variierten: Es wurden Centriprep Ultracel YM-10-Zentrifugenfilter und Amicon Ultra Ultracel-3K (beide 10 kDa MWCO, Millipore, Schwalbach, Deutschland) eingesetzt, sowie Viva-spin 500-Filter, 3 kDa MWCO (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland). Zur Entfernung des Imidazols nach der nativen Aufreinigung mittels Ni²⁺-NTA-Sepharose, Entsalzung und Umpufferung wurde entweder eine Größenausschluss-Chromatographie durchgeführt oder es wurden spezielle Entsalzer-Säulchen eingesetzt, wie NAPTM 5 Säulen (Sephadex G-25 DNA Grade) von GE Healthcare.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung intakter Chloroplasten aus Erbse

Die Isolierung intakter Chloroplasten erfolgte aus 10 - 12 Tage alten Blättern von *P. sativum*, (Standard-Langtagbedingungen) nach der Methode von Waegemann and Soll (1991). Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Es wurden 200 g Erbsenblätter mit jeweils 300 ml Isolationsmedium (330 mM Sorbit, 20 mM Mops, 13 mM Tris, 3 mM MgCl₂, 0,1 % (w/v) BSA, pH 7,9) im Mixer homogenisiert und anschließend durch vier Lagen Mull und eine Lage Gaze filtriert. Die Chloroplasten wurden durch Zentrifugation für 1 min bei 1500 g und 4 °C pelletiert, das Chloroplastenpellet in etwa 1 ml Waschmedium (50 mM HEPES-KOH pH 7,6, 330 mM Sorbit, 3 mM MgCl₂) resuspendiert und auf einen Percollgradienten (40 % und 80 % Percoll in 50 mM HEPES-KOH pH 7,6, 330 mM Sorbitol) geschichtet. Die Gradienten wurden für 5 min bei 8000 g und 4 °C zentrifugiert und die untere, intakte Chloroplasten enthaltende Bande, wurde in einen Zentrifugenbecher überführt. Die so isolierten, intakten Chloroplasten wurden nun noch zweimal in Waschmedium resuspendiert und 1 min bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert, um das restliche Percoll zu entfernen. Die pelletierten Chloroplasten konnten anschließend direkt verwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert werden. Die Chlorophyllkonzentration der isolierten Chloroplasten wurde photometrisch nach der Methode von Arnon (1949) bestimmt.

2.4.2 Isolierung des Stromas aus Chloroplasten aus *P. sativum*

Zur Isolation des Stromas wurden intakte Chloroplasten (Siehe Abschnitt 2.4.1) in 20 mM HEPES-KOH, pH 7,6 resuspendiert, gevortext und 30 min auf Eis inkubiert. Durch Zentrifugation (10 min, 2000 g, 4 °C) wurden zunächst die Thylakoide pelletiert, der resultierende Überstand wurde weitere 10 min bei 256000 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation enthielt nun das reine Stroma aus Erbse.

2.4.3 Isolierung von IE-Vesikeln aus Erbsenchloroplasten

Die Isolierung intakter Chloroplasten aus *P. sativum* erfolgte wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Anschließend wur-

den Chloroplasten nach der Methode von Waegemann und Soll (1991) weiter fraktioniert. Die inneren und äußeren Hüllmembranen der Chloroplasten konnten nun bis zum Gebrauch bei -80 °C gelagert werden.

2.4.4 Isolierung intakter Chloroplasten aus *A. thaliana*

Die Isolation von Chloroplasten aus *A.thaliana* erfolgte nach der Methode von Seigneurin-Berny (2008), alle Arbeitsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Hierzu wurden zunächst Blätter 4 - 6 Wochen alter Pflanzen (Klimakammer, Kurztag, 8 h Licht: 95 - 100 µE) mit Aufschlussmedium (400 mM Sorbit, 20 mM Tricine-KOH pH 8,4, 10 mM EDTA, 10 mM NaHCO₃, 0,1 % (w/v) BSA,) versetzt (1 Teil Pflanzenmaterial auf 4 Teile Aufschlussmedium) und anschließend im Mixer zerkleinert. Nach Filtrierung des Homogenats durch vier Lagen Mull und eine Lage Gaze, wurden die Chloroplasten in einer 2 - minütigen Zentrifugation bei 2070 g und 4 °C pelletiert. Die Chloroplasten wurden nach Dekantieren des Überstands vorsichtig in einem geringen Volumen an Waschmedium (400 mM Sorbit, 20 mM Tricin-KOH pH 7.6, 2.5 mM MgCl₂, 1.25 mM EDTA) resuspendiert und auf einen kontinuierlichen Percollgradienten (40 – 80 %) geschichtet. Für die Percollgradienten wurde zuvor eine 50 %-ige Percolllösung (in Waschmedium) für 55 min bei 38700 g und 4°C im Festwinkelrotor ohne Bremse zentrifugiert. Intakte Chloroplasten wurden nun durch Zentrifugation der Gradienten (10 min, 13300 g, 4 °C) isoliert. Die untere, intakte Chloroplasten enthaltende Bande wurde anschließend in einen Zentrifugenbecher überführt und die Chloroplasten noch zweimal mit Waschmedium gewaschen, um das restliche Percoll zu entfernen. Die pelletierten Chloroplasten konnten nun direkt verwendet oder bis zum Gebrauch in flüssigen Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert werden.

Stroma aus Chloroplasten von *A. thaliana* wurde wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben isoliert.

2.4.5 Heterologe Expression rekombinanter Proteine

Die heterologe Expression rekombinanter Proteine erfolgte in den *E. coli* –Stämmen BL21 (DE3), JM 109 (DE3) und BL21 (DE3) LysS. Um die Selektion zu gewährleisten, wurde Ampicillin in einer Konzentration von 100 µg ml⁻¹ eingesetzt. Bei der Verwendung des Stammes BL21 (DE3) LysS, der eine Chloramphenicol-

Resistenz aufweist, wurde als Selektionsantibiotikum zusätzlich Chloramphenicol in einer Konzentration von $34 \mu\text{g ml}^{-1}$ hinzugefügt. Die Bakterien wurden bei 37°C bis zu einer $\text{OD}_{600} = 0.4 - 0.8$ angezogen und die Proteinsynthese mit 0.8 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte anschliessend für 4 h bei 37°C .

2.4.6 Lyse von *E. coli*- Zellen unter nativen Bedingungen

Zur Herstellung von lösliches Protein enthaltendem *E. coli*-Rohextrakt für die native Aufreinigung wurden die für 5 min bei 6000 g zentrifugierten Bakterienpellets in Lysepuffer ($50 \text{ mM NaH}_2\text{PO}_4$ pH $8,0$, 300 mM NaCl , 10 mM Imidazol) resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgte mittels „French Pressure Cell“ und durch Behandlung mit Ultraschall ($3 \text{ mal } 20 \text{ sec}$ bei 40% Intensität). Unlösliche Zellbestandteile wurden anschließend bei 12000 g , 10 min , 4°C pelletiert. Der Überstand enthielt nun das lösliche, überexprimierte Protein.

2.5 Chromatographische Methoden

2.5.1 Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose

Alle in dieser Arbeit verwendeten Vipp1-Konstrukte waren mit einem C-terminalen Hexa-Histidin-Anhang versehen und konnten aus diesem Grund mittels Affinitätschromatographie an Ni^{2+} -NTA-Agarose aufgereinigt werden. Im Fall von Hsp70 befand sich der Histidin-Tag am N-terminalen Ende des Proteins. Alle Proteine wurden nach Angaben des Herstellers unter denaturierenden (8 M Harnstoff) oder nativen Bedingungen mit dem Säulenmaterial von Qiagen (Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Unter denaturierenden Bedingungen erfolgte die Elution des an die Matrix gebundenen Proteins durch Senkung des pH - Wertes, unter nativen Bedingungen wurden die Proteine mit 250 mM Imidazol eluiert.

2.5.2 Affinitätschromatographie an IgG-Sepharose

Für die Affinitäts-Chromatographie an IgG-Sepharose wurde Säulenmaterial von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) verwendet. Das Säulenmaterial wurde vor Gebrauch jeweils mit $2 - 3$ Säulenvolumen HAc ($0,5 \text{ M Essigsäure}$, pH $3,4$ mit Ammoniumacetat) und TST-Puffer (50 mM Tris-HCl , pH $7,6$, 150 mM NaCl und $0,05 \%$ Tween 20) äquilibriert. Der mit einem Protein A-Tag versehene C-Termi-

nus von Vipp1 wurde in *E. coli* exprimiert, die Bakterienzellen in TST-Puffer resuspendiert und über die „French Pressure Cell“ aufgeschlossen. Nach der Zentrifugation (4 °C, 12000 x g, 10 min) wurde das äquilibrierte Säulenmaterial für 1 h bei 4 °C mit dem Bakterienlysat inkubiert, um V_{C-term} an das Säulenmaterial zu binden. Das Säulenmaterial wurde anschließend mit TST-Puffer und 5 mM Ammoniumacetat, pH 5, gewaschen. Nun konnte der an die Säule gebundene C-Terminus von Vipp1 zur Identifikation von Interaktionspartnern entweder 1 h bei RT mit Stroma aus *P. sativum* oder *A. thaliana* (zur Isolation siehe Abschnitt 2.4.2) oder bei Bedarf mit rekombinantem Hsp70 (zuvor über Ni²⁺-NTA-Sepharose aufgereinigt), inkubiert werden. Das Säulenmaterial wurde nun mehrmals mit TST-Puffer gewaschen und V_{C-term} sowie daran gebundene Proteine wurden mit 0,5 M HAc eluiert. Zur Identifikation stromaler Interaktionsproteine wurden die eluierten Fraktionen gesammelt und in einer SDS-PAGE mittels Silberfärbung analysiert. Rekombinantes und natives cpHsp70 wurde nach der SDS-PAGE über eine Immunodekoration mit gegen cpHsp70 gerichteten Antikörpern nachgewiesen. Wurde die Affinitätschromatographie in Anwesenheit von ATP durchgeführt, so wurden dem Ansatz 2,5 mM ATP zugesetzt. Um ATP aus dem Ansatz zu entfernen, wurde das Enzym Apyrase in einer Konzentration von 10 U ml⁻¹ eingesetzt. Die Elution von gebundenem Hsp70 mit ATP erfolgte mit 3 mM ATP in TST-Puffer.

2.5.3 Größenausschluss-Chromatographie (GAC)

Größenausschluss-Chromatographie wurde mit dem ÄKTA-FPLC-System von Amersham Biosciences (Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Es wurden die Superdex-200 10/300 GL- sowie die Superdex 75 10/300 GL - Säule von Amersham Biosciences verwendet. Beide Säulen wurden mit einem Größenstandard äquilibriert (siehe Abschnitt 2.1.5). Die Untersuchungen zur Oligomerisierung diverser Vipp1-Konstrukte unter nativen Bedingungen wurden in einem Puffer durchgeführt, der 50 mM NaH₂PO₄ pH 7,6 und 100 mM NaCl enthielt. In Versuchen zur Stabilität des Vipp1-Oligomers unter teilweise denaturierenden Bedingungen wurden 4 M bzw. 6 M Harnstoff in 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.6, 100 mM NaCl, eingesetzt. Für die Aufreinigung von Vipp1₁₋₂₁₉ zur Kristallisation wurde die Größenausschluss-Chromatographie mit 20 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM NaCl durchgeführt.

2.6 Proteolytischer Verdau rekombinanter Proteine

Der Verdau löslicher Vipp1-Konstrukte erfolgte nach ihrer Aufreinigung mit $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Trypsin. Die Reaktion erfolgte auf Eis und wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch die Zugabe von SDS-Probenpuffer und sofortiges Erhitzen der Proben für 10 min bei $96 \text{ }^\circ\text{C}$ beendet. Der Trypsin-Verdau wurde ebenfalls bei dem C-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukt Vipp1_1-219, das in die Kristallisation eingesetzt werden sollte, angewendet, um den C-terminalen Histidin-Tag abzuspalten und das Protein weiter aufzureinigen. Hierbei wurde der Verdau durch eine 20 minütige Inkubation mit Trypsin-Inhibitor (0.5 mg ml^{-1}) auf Eis beendet. Die verdauten Proben wurden anschließend mit einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt, die Detektion der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie-Färbung und Western Blot unter Verwendung von Vipp1-Antiserum sowie AP-gekoppelten His Detector Ni^{2+} -Konjugaten.

2.7 Proteolytischer Verdau der IE-Vesikel aus *P. sativum*

Innere Hüllmembran-Vesikel von Chloroplasten aus *P. sativum* (siehe Abschnitt 2.4.3) wurden zunächst durch Zentrifugation für 10 min bei 256000 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pelletiert und das Pellet dann in Puffer I (25 mM Hepes-KOH pH 7,6, 5 mM MgCl_2 , $0,5 \text{ mM}$ CaCl_2) vollständig resuspendiert. Die Proteinkonzentration der Membranen wurde auf $0,2 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ eingestellt, die Probe mit $0,2 \mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ Thermolysin versetzt und der Ansatz 20 min auf Eis inkubiert. Nach Beenden des Verdau mit 5 mM EDTA wurde die innere Hüllmembran 10 min bei 256000 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$ pelletiert und anschließend in Puffer II (20 mM Hepes-KOH pH 7,6, 50 mM NaCl, 10 mM EDTA) resuspendiert. Die Membranen wurden nun erneut zentrifugiert (10 min , 256000 g , $4 \text{ }^\circ\text{C}$) und das Pellet in Puffer II (ohne EDTA) gelöst. Die verdaute innere Hüllmembran wurde aliquotiert und bis zum Gebrauch bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ gelagert. Gleiche Mengen unverdauter sowie verdauter innerer Hüllmembran wurden mit SDS-Probenpuffer versetzt und die Proteine in einer 12,5 % SDS-PAGE aufgetrennt. Der Erfolg des Verdau konnte nun mit Western Blot und anschließender Immunodekoration mit den Antiseren $\alpha\text{-Tic110}$, $\alpha\text{-Tic55}$, $\alpha\text{-Tic32}$, $\alpha\text{-FNR}$ und $\alpha\text{-Vipp1}$ überprüft werden.

2.8 Flotierungsversuche

Rekombinante Vipp1-Konstrukte wurden nach Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie in Flotierungsanalysen eingesetzt, um ihre Anbindung an die innere Hüllmembran von Chloroplasten zu untersuchen. Hierzu wurde zuvor mit Thermolysin verdaute innere Hüllmembran-Vesikel von Chloroplasten aus *P. sativum* (siehe Abschnitt 2.7) pelletiert (10 min, 256000 g, 4 °C) und sorgfältig in 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.6, 100 mM NaCl resuspendiert. Anschließend wurde rekombinantes Protein zu einer Endkonzentration von 5 µg 100 µl⁻¹ im Ansatz hinzugegeben und der Ansatz für 10 min bei RT inkubiert. Jeweils ein Ansatz enthielt zwar das jeweilige Vipp1-Konstrukt, allerdings keine Membranvesikel. Beide Versuchsansätze wurden nun mit 1.6 M Saccharose (in 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.6, 100 mM NaCl) versetzt, in Zentrifugenröhrchen überführt und mit jeweils 3 ml 1.3 M, 1.0 M und 0 M Saccharose (in 50 mM NaH₂PO₄ pH 7.6, 100 mM NaCl) überschichtet. Die Stufengradienten wurden nun für etwa 16 h bei 34000 rpm, 4 °C zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden Fraktionen von jeweils 200 µl gesammelt (die oberen 3 ml wurden dabei nicht berücksichtigt) und diese dann auf einer SDS-PAGE analysiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Western Blot und Immunodekoration mit Antiserum gegen Vipp1.

2.9 Saccharose-Gradienten

Rekombinante Vipp1-Konstrukte (0,1 µg µl⁻¹) wurden nach Aufreinigung über Ni²⁺-NTA-Affinitäts- und Größenausschluss-Chromatographie auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (10 – 20 %) geladen und in einer Ultrazentrifuge unter Verwendung eines Ausschwingrotors (RPS 40-T, Hitachi) für 16 h bei 205600 g, 4 °C zentrifugiert. Nach Beendigung der Zentrifugation wurden Fraktionen von jeweils 200 µl gesammelt, die Proteine mittels Methanol-Chloroform-Fällung präzipitiert und anhand einer SDS-PAGE analysiert. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte mit Western Blot und Immunodekoration mit Antiserum gegen Vipp1.

2.10 Negativkontrastierung

In der Negativkontrastierung wurden rekombinante, über Ni^{2+} -NTA-Sepharose aufgereinigte Proteine eingesetzt. Diese lagen in 50 mM Tris-HCl, pH 7,6, 150 mM NaCl vor. Die Proteine wurden zunächst auf eine Konzentration von etwa $1,5 \mu\text{g ml}^{-1}$ bzw. $15 \mu\text{g ml}^{-1}$ mit Fixans (2,5 % Glutaraldehyd in Cacodylatpuffer) verdünnt und auf zuvor mit Collodium beschichteten, mit Kohle bedampften und anschließend beglimmten Netzen fixiert. Als Kontrastmittel wurde in dieser Arbeit Uranylacetat verwendet (1 % Uranylacetat, 0,05 % Glukose). Die TEM-Analyse erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. G. Wanner (LMU, München).

2.11 Fourier-Transform Infrarot-Spektroskopie (FTIR)

Die Infrarotspektroskopie wurde mit rekombinanten Vipp1-Proteinen durchgeführt, die zuvor über Ni^{2+} -NTA-Sepharose aufgereinigt wurden. Aufgereinigtes Protein mit einer Konzentration von etwa 2 - 4 mg ml^{-1} wurde für diesen Versuch in 50 mM NaH_2PO_4 , pH 7,6, 150 mM NaCl umgepuffert (siehe Abschnitt 2.3.8) und direkt in die Infrarotmessungen eingesetzt und mit den gemessenen Daten ein Spektrum erstellt. Für den Verdau von Lipiden wurde der Ansatz zusätzlich für 30 min bei RT mit einer Lipasekonzentration von 20 U ml^{-1} unter Schütteln inkubiert und die Lipase anschließend über eine Größenausschluss-Chromatographie aus dem Ansatz entfernt. Auf diese Weise behandeltes Protein wurde gegebenenfalls aufkonzentriert (siehe Abschnitt 2.3.8). Die Infrarotmessungen wurden mit dem Fourier Transform-Infrarot (FTIR) –Spektrometer „Tensor 27“ der Firma Bruker (Ettlingen, Deutschland) in Kooperation mit PD Dr. P. Braun (LMU, München) durchgeführt.

2.12 Proteinsequenzierung

Zur Sequenzierung von Proteinen wurden Proteinbanden aus SDS-Gelen geschnitten. Die Analyse dieser Proteine erfolgte anschließend im Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU München.

2.13 Yeast-Two-Hybrid

Die Yeast-Two-Hybrid-Screens wurden mit Vipp1-Volllängenprotein von der Firma Hybrigenics (Paris, Frankreich) durchgeführt.

2.14 Behandlung von Vipp1 mit zweiwertigen Kationen

Für die Behandlung von Vipp1 mit zweiwertigen Kationen wurde das Bakterienlysat Vipp1 VI exprimierender *E. coli*-Zellen mit jeweils 2.5 mM CaCl_2 , MgCl_2 , Ni_2SO_4 , CuCl_2 und Zn_2SO_4 für eine halbe Stunde bei RT unter Rotieren inkubiert und anschließend zentrifugiert (10 min, 12000 g, 4 °C). Als Kontrolle wurden alle Ansätze unter Zusatz von 2.5 mM EDTA wiederholt. Die löslichen und unlöslichen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert.

2.15 Kristallisation

Für die Kristallisationsversuche wurde das Vipp1-Konstrukt Vipp1_1-219 verwendet. Das rekombinante Protein wurde zunächst über Ni^{2+} -NTA-Sepharose aufgereinigt und der C-terminale Histidin-Tag anschließend mit $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Trypsin abgespalten (siehe Abschnitt 2.6). Nach Beendigung des Verdauens wurde das Protein über eine GAC (20 mM Tris, HCl, pH 7,6, 100 mM NaCl) von der Protease getrennt und aufkonzentriert ($5\text{-}10 \text{ mg ml}^{-1}$). Die Kristallisierung des Proteins wurde nun in Kooperation mit Prof. Dr. M. Groll und Eva-Maria Huber (TUM, Garching) unter verschiedenen Bedingungen getestet.

2.16 Computer-Analyse

Die Arabidopsis Datenbank MIPS (<http://mips.helmholtz/muenchen.de/proj-plant/jsf/athal/index.jsp>) und Tair (<http://www.arabidopsis.org/>) wurden verwendet, um die Sequenzen von Vipp1 sowie der Hsp70-Proteine zu identifizieren. Für den Abgleich von Proteinsequenzen wurde das Programm Clustal W (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) herangezogen (Jeanmougin *et al.* 1998). Zur Identifizierung von α -Helices wurde das Programm JPred (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/www-jpred/>) benutzt (Cole *et al.* 2008).

3 Ergebnisse

Vipp1 aus *A. thaliana* ist ein Protein, das an der inneren Hüllmembran von Chloroplasten lokalisiert ist (Aseeva *et al.*, 2004). Das Protein ist in der Lage, ringförmige Homooligomere zu bilden, die ein Molekulargewicht von ca. 2 MDa aufweisen und aus etwa 64 Vipp1-Monomeren zusammengesetzt sind. Ziel der Arbeit war es, Bereiche des Proteins zu ermitteln, die für die Oligomerisierung des Vipp1-Komplexes von Bedeutung sind. Des Weiteren sollten Domänen von Vipp1 identifiziert werden, die essenziell für die Assoziation des Proteins mit der Inneren Hüllmembran der Chloroplasten sind. Es sollte außerdem untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Assemblierung von Vipp1 zum hochmolekularen Komplex und der Anbindung des Proteins an Membranlipide besteht.

3.1 Heterologe Expression von Vipp1-Protein in löslicher Form

Um Strukturanalysen an Proteinen vorzunehmen, ist es hilfreich, wenn das zu charakterisierende Protein heterolog löslich exprimierbar ist und die Möglichkeit besteht, es mittels Affinitätschromatographie aufzureinigen, da auf diese Weise große Mengen reinen Proteins erzeugt werden können.

Heterolog exprimiertes Vipp1-Volllängenprotein aus *A. thaliana* wurde bislang N-terminal mit einem 6x Histidin-Tag fusioniert (siehe Dissertation Asseva, 2007). Der größte Teil des von *E. coli*-Zellen exprimierten Vipp1 lag allerdings nach Zellaufschluss und Zentrifugation als Aggregat vor (Abb. 1, His-Tag N-terminal, P), nur wenig Protein blieb in Lösung (Abb. 1, His-Tag N-terminal, Üb). Für viele Untersuchungen waren diese Mengen nicht ausreichend und das Protein fiel während der anschließenden Aufreinigung auch kontinuierlich weiter aus. Es wurden daher zunächst verschiedene Möglichkeiten ausprobiert, um die Mengen löslichen Vipp1-Proteins zu steigern und so eine erhöhte Ausbeute an sauberem Endprodukt zu erzielen. Dies beinhaltete gängige Methoden, wie die Erniedrigung der Expressionstemperatur oder die Verwendung unterschiedlicher *E. coli*-Stämme für die Expression, allerdings ließ sich auf diese Weise die Löslichkeit des Proteins nicht signifikant erhöhen. Erfolgreich war letztendlich die Klonierung der Vipp1

ERGEBNISSE

Gensequenz in den Vektor pTrcHis2, durch welche das exprimierte Protein am C-terminalen Ende mit einem 6x Histidin-Tag fusioniert wurde.

Nach der Expression des Vipp1-Volllängenproteins (Vipp1 VI) in *E. coli* wurde das Bakterienlysat nach Zellaufschluss und Zentrifugation in eine lösliche (Üb) und eine unlösliche (P) Fraktion unterteilt und beide Fraktionen wurden auf einer 12,5 % SDS-PAGE analysiert (Abb. 1, His-Tag N- und C-terminal). Das Protein wurde anschliessend mittels Coomassie-Färbung sowie über Western Blot und Immunodekoration mit einem Antikörper gegen den 6x Histidin-Tag detektiert. Durch die Verwendung des C-terminalen Histidin-Tags konnte die Expression von löslichem Vipp1 VI signifikant gesteigert werden. Des Weiteren blieb das Protein für längere Zeit und nach verschiedenen Aufreinigungsmethoden löslich (s.u. und Daten nicht gezeigt).

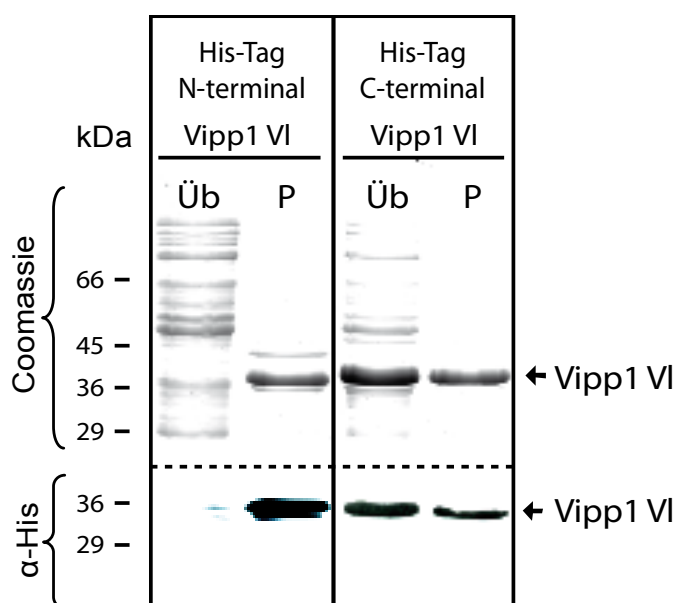


Abbildung 1: Heterologe Expression von Vipp1 in löslicher Form

Nach Expression des Vipp1-Proteins mit N- oder C-terminalem 6x Histidin-Tag (His-Tag) in *E. coli*, wurde das Bakterienlysat in eine lösliche (Üb) und eine unlösliche (P) Fraktion unterteilt. Die Analyse erfolgte durch SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung (Coomassie) bzw. Western Blot mit einem Antikörper gegen den 6x Histidin-Tag (α -His).

In vorangegangenen Arbeiten konnte mit verschiedenen Methoden nachgewiesen werden, dass rekombinantes Vipp1-Protein, das N-terminal mit einem 6x Histidin-Tag fusioniert wurde, in der Lage ist, homooligomere Komplexe zu bilden, die eine ringförmige Struktur aufweisen (Aseeva *et al.*, 2004). Darüber hinaus wurde für

den durch natives sowie rekombinantes Vipp1 gebildeten Komplex ein Molekulargewicht von etwa 2 MDa ermittelt, welches eine Topologie aus 64 Vipp1-Molekülen pro Oligomer nahelegt.

Um zu überprüfen, ob diese Eigenschaften für das in pTrcHis2 klonierte Vipp1 mit einem C-terminalen 6x Histidin-Tag ebenfalls zutreffen, wurden die Größenausschluss-Chromatographie (GAC) sowie die Transmissions-Elektronenmikroskopie (TEM) mit diesem Konstrukt wiederholt. Dazu wurde zunächst rekombinantes Protein über Ni²⁺-NTA-Sepharose aufgereinigt und dessen Assemblierung anschließend in der GAC unter Verwendung einer Superdex 200 10/300 GL-Säule untersucht (Abb. 2A). Das Elutionsprofil zeigt, dass bei einem Volumen von etwa 7,6 ml ein Maximum der Proteinelution erreicht wurde, was etwa dem Ausschlussvolumen der verwendeten Säule entspricht. Die Analyse der gesammelten Fraktionen auf einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung bestätigte, dass es sich hierbei um Vipp1 VI handelte. Die Ausschlussgrenze der verwendeten Säule für globuläre Proteine beträgt 1,3 MDa. Somit ist das Molekulargewicht des eluierenden Proteinkomplexes größer, da dieser von der Säule nicht mehr aufgetrennt werden kann. Folglich ist das analysierte Protein in der Lage, zu einem hochmolekularen Komplex zu assemblieren.

Eine Negativkontrastierung, die mit dem aufgereinigten Protein durchgeführt wurde, zeigte des Weiteren die zuvor beschriebene ringförmige Struktur der Vipp1-Komplexe (Abb. 2B). In der Abbildung sind die Gesamtübersicht mehrerer Vipp1-Oligomere sowie eine Detailaufnahme mit Aufsicht auf einen einzelnen Vipp1-Komplex dargestellt. Mit einem C-terminalen 6x His-Tag fusioniertes Protein ist demnach in der Lage, zu einem homooligomeren Komplex mit einer ringförmigen Struktur zu assemblieren. Aus der Übersichtsaufnahme wird deutlich, dass nicht alle abgebildeten Komplexe gleich groß sind. Die in den TEM-Aufnahmen dargestellten Protein-Komplexe weisen vielmehr einen Durchmesser auf, der von 300 bis 350 Å variiert, während in vorangegangenen Untersuchungen für heterolog exprimierte Vipp1-Komplexe ein Durchmesser von 400 Å ermittelt worden war (Aseeva *et al.*, 2004).

Für Vipp1-Komplexe aus *Synechocystis* PCC 6803 konnte in früheren Arbeiten das Auftreten unterschiedlicher Symmetrien nachgewiesen werden (Fuhrmann *et al.*, 2009). Mittels Negativkontrastierung wurden sechs verschiedene Komplex-

Typen identifiziert, die sich jeweils aus einer unterschiedlichen Menge an Einzelmolekülen zusammensetzen und dementsprechend verschiedene Molekulargewichte aufweisen, die in der Größenordnung von 1,6 - 2 MDa rangieren. Ob dies für Vipp1 aus *A. thaliana* ebenfalls zutrifft, muss allerdings in weiteren Untersuchungen überprüft werden.

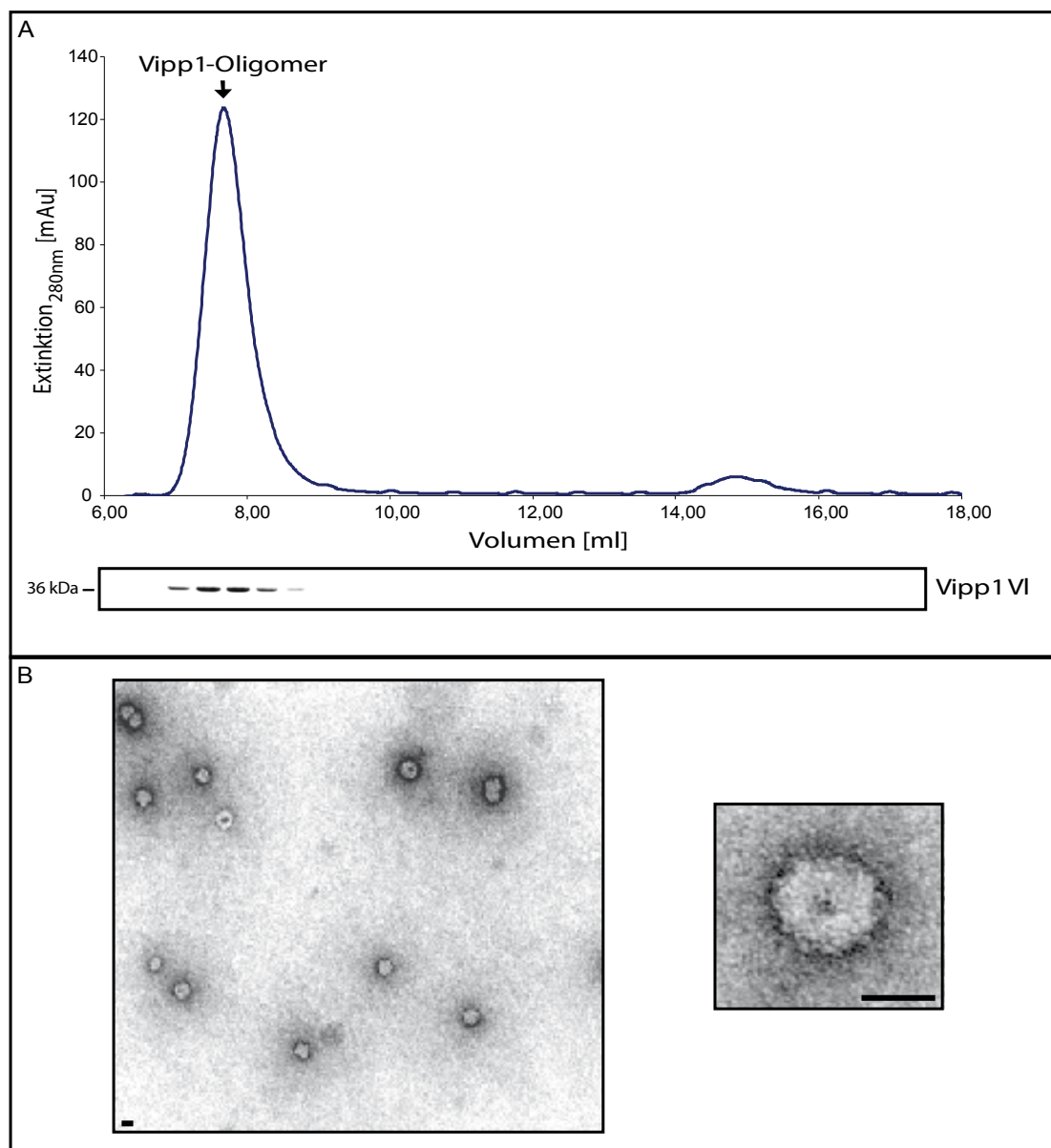


Abbildung 2: Rekombinates His-Vipp1 VI bildet einen homooligomeren Komplex

(A) Die Oligomerisierung von rekombinantem, über Ni²⁺-NTA-Sepharose aufgereinigtem Vipp1-Protein wurde mittels Größenausschluss-Chromatographie mit einer Superdex 200 10/300 GL-Säule untersucht. Die gesammelten Fraktionen wurden auf einer SDS-PAGE analysiert und Vipp1 mittels Coomassie-Färbung nachgewiesen. (B) Die Komplexbildung des Proteins wurde mittels Negativkontrastierung bestätigt (Übersichts- und Detailaufnahme). Der schwarze Balken entspricht jeweils etwa 200Å

Wie GAC- und TEM-Analysen belegen, wurden die wesentlichen bisher bekannten Strukturmerkmale von Vipp1 durch die Umklonierung der Gensequenz in den Vektor pTrcHis2 nicht beeinträchtigt. Somit stellt das in pTrcHis2 klonierte Vipp1 mit C-terminalem Histidin-Tag aufgrund seiner Löslichkeit eine gute Alternative zum bisher verwendeten 6x His-Vipp1 dar. Aus diesem Grund wurde dieses Konstrukt nun für weitere Untersuchungen eingesetzt.

3.2 Funktionsanalysen zur Vipp1-Komplexbildung

Wie auch sein Homolog PspA wurde Vipp1 als ein Protein mit weitgehend α -helikaler Struktur beschrieben (Li *et al.*, 1994). Dieses Strukturmerkmal ist für Proteine, die hochmolekulare Komplexe bilden, durchaus üblich. Eine Sekundärstrukturanalyse der Aminosäuresequenz mit diversen Analyseprogrammen ergab, dass das Vipp1-Vollängenprotein aus *A. thaliana* aus acht α -Helices aufgebaut ist, die durch kurze unstrukturierte Bereiche (Random coils) getrennt sind (Abb. 3A, Dissertation Aseeva, 2007). Die letzte α -Helix (H8) ist dabei am Ende der C-terminalen, Vipp1-spezifischen Domäne (C-Terminus) lokalisiert und steht über eine längere Random coil-Sequenz mit dem N-terminalen, PspA-ähnlichen Teil des Proteins in Verbindung.

3.2.1 Verwendete Vipp1-Konstrukte

Zur Untersuchung der Relevanz einzelner α -Helices von Vipp1 für die Assemblierung zum Homooligomer wurden verschiedene N- und C-terminal verkürzte Konstrukte von Vipp1 in den Vektor pTrcHis2 mit C-terminalem Histidin-Tag kloniert. Es wurde darauf geachtet, ganze α -Helices zu entfernen, um die α -helikale Struktur des Proteins im Wesentlichen aufrechtzuerhalten und so eine weitgehend natürliche Faltung zu gewährleisten.

Anhand des aufgeführten Modells (Abb. 3A) wurden C- und N-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukte erstellt (Abb. 3B), die in *E. coli* exprimiert und soweit möglich über Ni^{2+} -NTA-Affinitätschromatographie aufgereinigt wurden. Anschließend wurde die Komplexbildung der einzelnen Konstrukte mittels GAC untersucht.

ERGEBNISSE

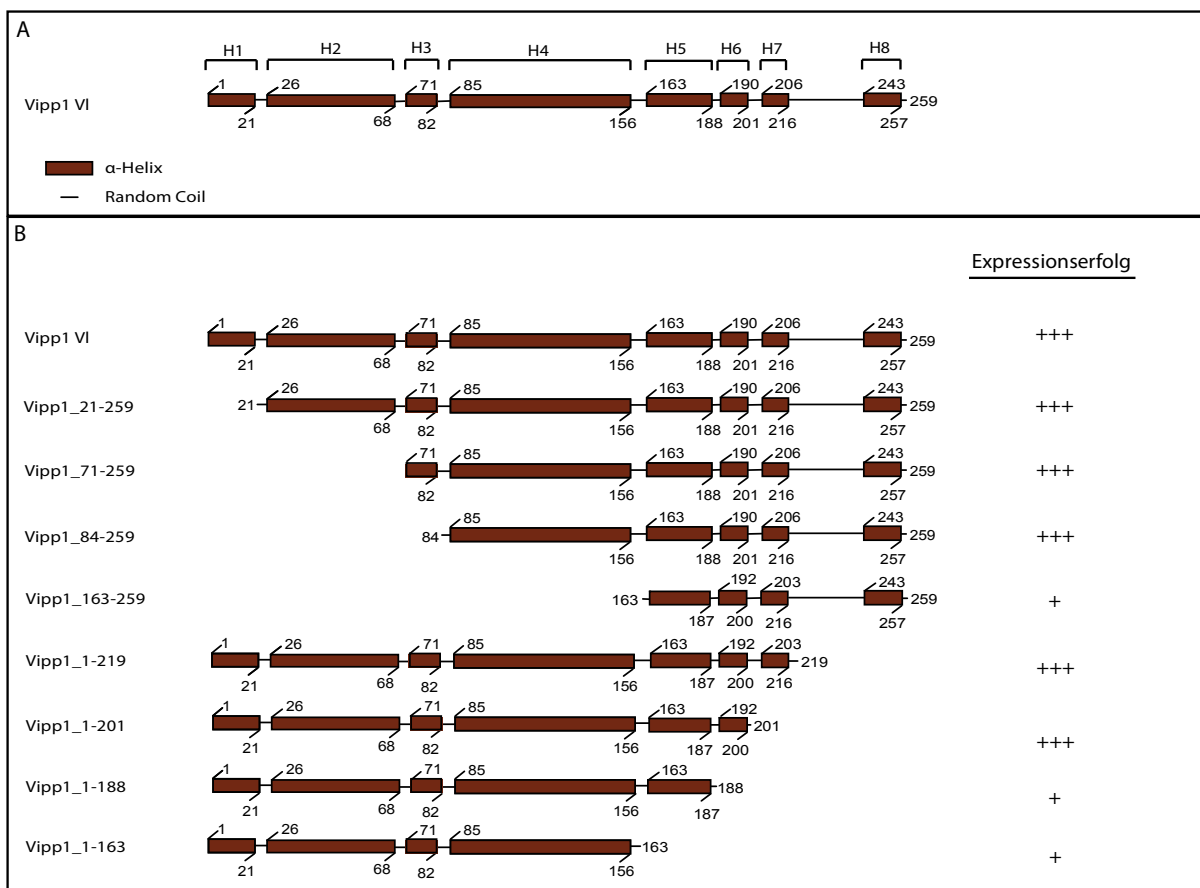


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Vip1 Volllängenproteins (Vip1 VI) und der in dieser Arbeit verwendeten N- und C-terminal verkürzten Vip1-Konstrukte

(A) Sekundärstrukturmodell von Vip1 nach Asseva (Dissertation, 2007). Die einzelnen α -Helices sind durch rote Balken gekennzeichnet und nummeriert (H1-H8) (B) Darstellung der in dieser Arbeit verwendeten Vip1-Konstrukte. Des Weiteren ist der Expressionserfolg im Hinblick auf lösliches Protein, das zur Aufreinigung genutzt werden konnte, angegeben (+++ = gute Expression, Protein löslich; + = mittelmäßige bis ungenügende Expression, Protein instabil).

Der Expressionserfolg der verschiedenen Vip1-Konstrukte verlief unterschiedlich (Abb. 3B, Expressionserfolg). Vip1 Volllänge (Vip1 VI) und Vip1 ohne die C-terminale Domäne (Vip1_1-219) ließen sich sehr gut löslich exprimieren und mit hoher Effizienz über Ni^{2+} -NTA-Sepharose aufreinigen. Auch ein Konstrukt, das sich aus den ersten sechs α -Helices des Volllängenproteins zusammensetzte (Vip1_1-201), exprimierte problemlos in löslicher Form. Wurde Vip1 darüber hinaus jedoch C-terminal verkürzt, so war das Protein entweder extrem instabil (Vip1_1-188) oder in den verwendeten Bakterienstämmen nur in sehr geringen Mengen exprimierbar (Vip1_1-163). Offensichtlich ist eine zu starke Verkürzung des Proteins für dessen Expression in Bakterien problematisch. Es stellt sich nun

die Frage, ob die natürliche Faltung des Proteins durch eine derartig rigorose Verkürzung beeinträchtigt wird und ob dieser Umstand die Expressionsrate negativ beeinflusst.

Fast alle N-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukte dagegen exprimierten problemfrei in löslicher Form. Ein sehr stark verkürztes Konstrukt, das sich ausschließlich aus den letzten vier α -Helices zusammensetzte (Vipp1_163-259) war allerdings ebenfalls nur in geringen Mengen löslich exprimierbar.

3.2.2 Größenausschluss-Chromatographie

Um Domänen von Vipp1 zu identifizieren, die für die Assemblierung des Proteins zu einem hochmolekularen Komplex eine essenzielle Rolle spielen, wurde in dieser Arbeit die Methode der Größenausschluss-Chromatographie (GAC) eingesetzt.

Für die Untersuchung der Oligomerisierungsfähigkeit unterschiedlicher Vipp1-Konstrukte wurde eine Superdex 200 HR 10/30-Säule verwendet, deren Auftrennungskapazität Molekulargewichte von 1×10^4 – 6×10^5 Da erfasst. Vipp1-Komplexe, die mit einem Molekulargewicht von etwa 2 MDa das 1,3 MDa umfassende Ausschlusslimit der Säule deutlich überschreiten, sollten in deren Ausschlussvolumen eluieren, kleinere Vipp1-Untereinheiten dagegen entsprechend später. Für die GAC-Analysen wurden größtenteils in *E. coli* löslich exprimierte, über Ni^{2+} -NTA-Sepharose aufgereinigte Proteine verwendet. Konstrukte, die nur in geringer Menge in löslicher Form hergestellt werden konnten (siehe Abschnitt 3.2.1), wurden direkt als Bakterienlysat in der GAC eingesetzt.

Zunächst wurde die Komplexbildung C-terminal verkürzter Konstrukte von Vipp1 analysiert. In der Abbildung 4 sind Elutionsprofile von Chromatographien zu sehen, die mit aufgereinigtem Protein durchgeführt wurden. Eluierendes Vipp1 wurde in diesen Fällen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung identifiziert. Das Chromatogramm zeigte bei der Analyse von Vipp1 VI, sowie auch für zwei weitere Konstrukte (Vipp1_1-219 und Vipp1_1-201), eine Zunahme der Extinktion bei einem Elutionsvolumen von etwa 7 ml, was dem Ausschlussvolumen der verwendeten Säule entspricht (Abb. 4A und B).

Allgemein stimmte die Extinktion bei 280 nm mit den mittels SDS-PAGE detektierten Proteinbanden überein, wodurch sich bestätigen ließ, dass es sich bei dem

Absorptionsmaximum im Chromatogramm um eluierendes Vipp1 handelte. Während die Elution von Vipp1 VI ein Maximum bei einem Volumen von 7,67 ml aufwies, zeigte Vipp1_1-219 einen Höchstwert bei 7,77 ml. Vipp1_1-201 eluierte schließlich mit einem Maximum bei 7,99 ml von der Säule. Die beiden C-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukte konnten in den GAC-Analysen so als hochmolekulare Komplexe identifiziert werden. Die Verschiebung der Elutionsmaxima der verkürzten Konstrukte verglichen zum Volllängenprotein lässt sich damit erklären, dass Vipp1-Konstrukte, denen Teile vom C-Terminus entfernt wurden, natürlich ein niedrigeres Molekulargewicht aufweisen, welches sich in einem homooligomeren Komplex entsprechend multipliziert. Eine genaue Molekulargewichtsbestimmung ist allerdings nicht möglich, da die Größe der Komplexe über die Auftrennungskapazität der verwendeten Säule hinausgeht.

Konstrukte, die sich nur aus den ersten vier bzw. fünf Helices des Volllängenproteins zusammensetzen, waren entweder instabil (Vipp1_1-188) oder wiesen sehr geringe Expressionsraten auf (Vipp1_1-163, siehe dazu auch Abschnitt 3.2.1). Deshalb wurden die Konstrukte Vipp1_1-188 und Vipp1_1-163 direkt als Bakterienlysate in die GAC eingesetzt und das Protein nach SDS-PAGE und Western Transfer mit einem Antikörper gegen Vipp1 nachgewiesen (Abb. 4C). Mit den Westernblot-Analysen ließ sich demonstrieren, dass sowohl Vipp1_1-188 als auch Vipp1_1-163 im Ausschlussvolumen der Säule eluierten, was ein Molekulargewicht von mindestens 1,3 MDa impliziert. Demgemäß sind auch diese extrem verkürzten Konstrukte noch in der Lage, einen hochmolekularen Komplex zu bilden. Die Auswertungen der mit C-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukten durchgeführten GAC-Analysen lassen aus diesem Grund annehmen, dass vom C-Terminus ausgehend große Bereiche des Proteins im Hinblick auf die Bildung des Vipp1-Oligomers irrelevant sind.

ERGEBNISSE

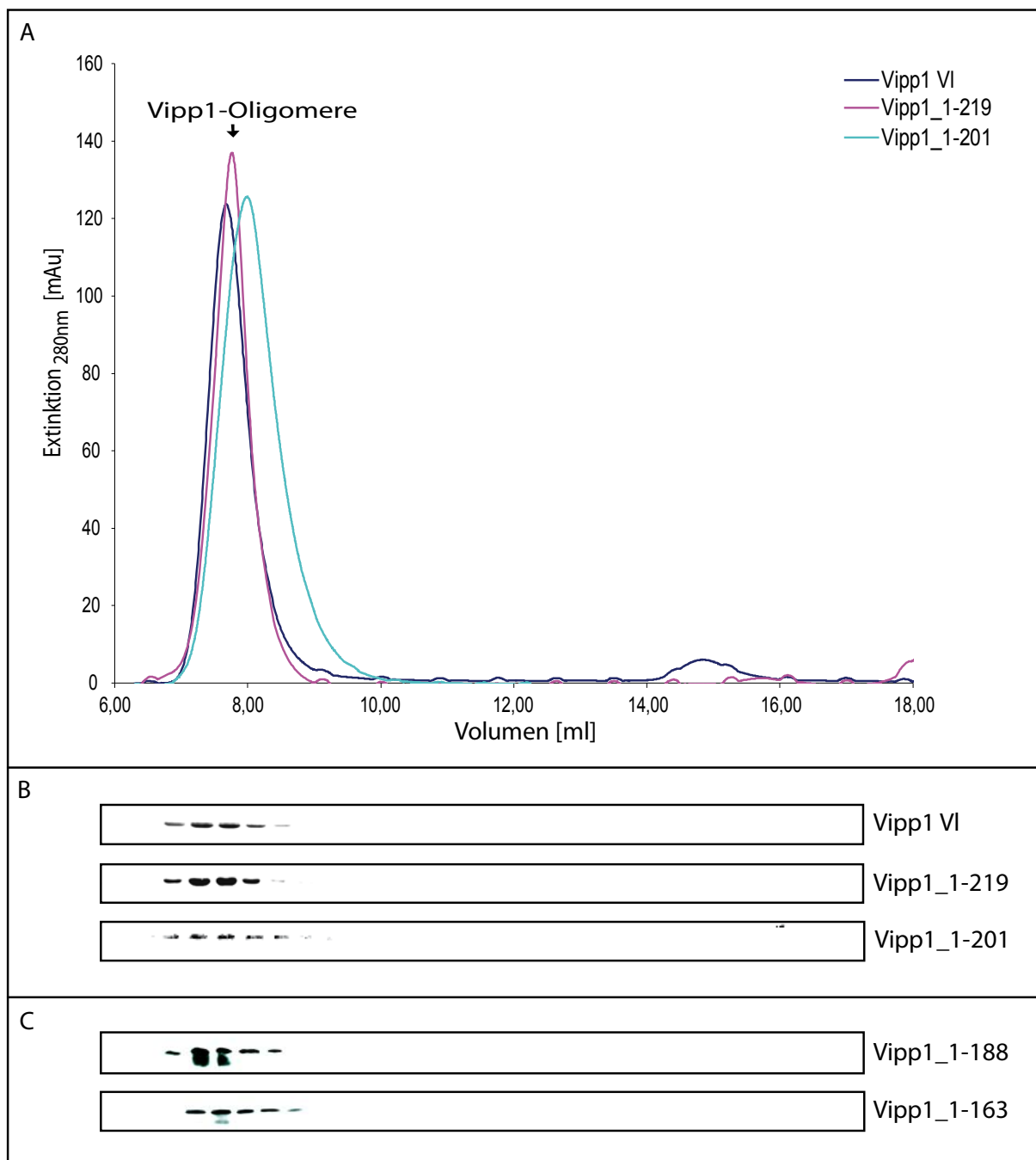


Abbildung 4: Größenausschluss-Chromatographie (GAC) C-terminal verkürzter Vipp1-Konstrukte mit einer Superdex 200 10/300 GL-Säule

GAC über eine Superdex 200 20/300 GL-Säule mit Vipp1-Volllänge (Vipp1 VI) sowie diversen C-terminal verkürzten Konstrukten. (A) Das Chromatogramm zeigt die Extinktion bei 280nm [mAu] im Elutionsverlauf [ml]. Die gesammelten Fraktionen von je 250 μ l wurden mittels SDS-PAGE analysiert und das Protein mit (B) Coomassie angefärbt (Vipp1 VI, Vipp1_1-219 und Vipp1_1-201) oder (C) nach Western Blot mit einem Antikörper gegen Vipp1 nachgewiesen (Vipp1_1-188 und Vipp1_1-163).

ERGEBNISSE

Wurde dagegen am N-terminalen Ende von Vipp1 die erste α -Helix entfernt (Vipp1_21-259), was den ersten 21 Aminosäuren des Vollängenproteins entspricht, änderte sich das Elutionsprofil erheblich (Abbildung 5).

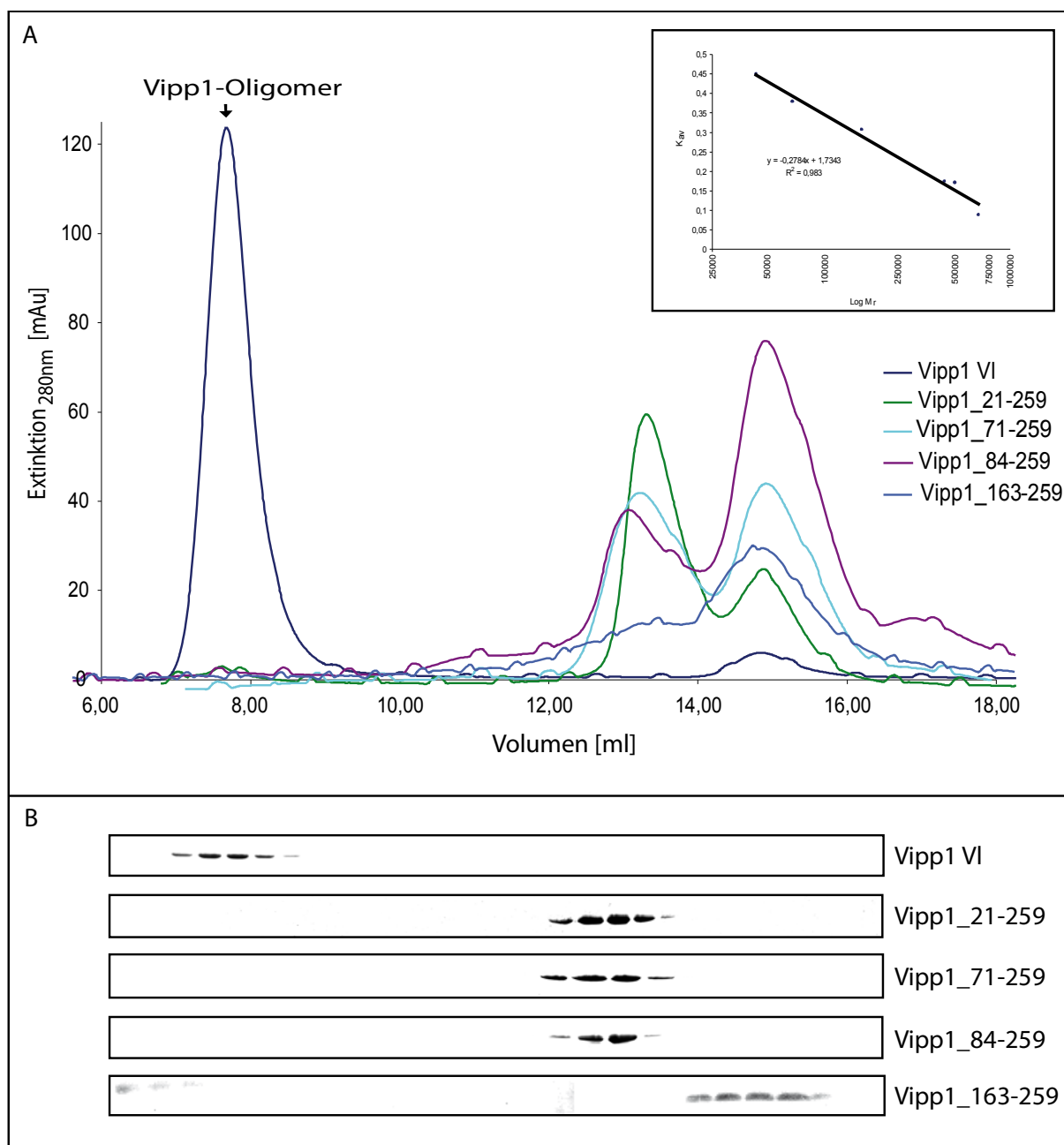


Abbildung 5: Größenausschluss-Chromatographie (GAC) N-terminal verkürzter Vipp1-Konstrukte mit einer Superdex 200 10/300 GL-Säule

GAC über eine Superdex 200 10/300 GL-Säule mit Vipp1-Volllänge sowie diversen N-terminal verkürzten Konstrukten. (A) Das Chromatogramm zeigt die Extinktion bei 280 nm [mAu] im Elutionsverlauf [ml]. (B) Die gesammelten Fraktionen von je 250 μ l wurden mittels SDS-PAGE analysiert und das Protein mit Coomassie angefärbt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde eine Kalibrierungsgerade mit diversen Proteinstandards erstellt (Kästchen).

Im Ausschlussvolumen, bei dem das Vipp1-Volllängenprotein gewöhnlich als Komplex von der Säule eluierte, war bei der mit Vipp1_21-259 durchgeführten Chromatographie weder eine Extinktion bei 280 nm detektierbar, noch konnte über SDS-PAGE-Analysen Protein nachgewiesen werden. Offensichtlich resultiert bereits diese geringfügige Verkürzung von Vipp1 in der Unfähigkeit des Proteins, zu einem hochmolekularen Komplex zu assemblieren. Das N-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukt eluierte nun vielmehr bei einem Volumen von 13,3 ml von der Säule, wie durch Analysen der gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung bestätigt werden konnte. Anhand seines Elutionsprofils konnte Vipp1_21-259 mit einer Kalibrierungsgerade die Größe eines Tetramers zugeordnet werden.

Drei weitere Konstrukte, denen N-terminal zwei, drei oder vier Helices entfernt wurden (Abb. 5, Vipp1_71-259, Vipp1_84-259, Vipp1_163-259), eluierten mit einem Maximum von 13,23 ml (Vipp1_71-259), 13,33 ml (Vipp1_84-259) und 15,06 ml (Vipp1_163-259) von der Säule, wie aus den Elutionsprofilen und SDS-PAGE-Analysen deutlich hervorgeht. Mithilfe der Kalibrierungsgerade konnte ermittelt werden, dass die Entfernung zusätzlicher N-terminaler α -Helices weiterhin in der Bildung tetramerer Strukturen resultiert. Dies kann jedoch unter Verwendung der Superdex 200-Säule nicht eindeutig dargestellt werden.

Daher wurden die diversen N-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukte zusätzlich mit einer Superdex 75 HR 10/30-Säule analysiert, die sich von der zuvor in der GAC verwendeten Superdex 200 10/300 GL-Säule durch einen wesentlich kleineren Auftrennungsbereich von $3 \times 10^3 - 7 \times 10^4$ Da und ein Ausschlusslimit von 1×10^5 Da unterscheidet. Durch die Verwendung einer Säule mit kleinerer Auftrennungskapazität sollten die Ergebnisse hinsichtlich der Tetramerbildung vor allem des stark verkürzten Vipp1-Konstrukts Vipp1_163-259 verifiziert werden (Abb. 6).

Dem Elutionsprofil der analysierten Konstrukte nach ließ sich entnehmen, dass Vipp1_71-259 bei einem Volumen von 9,11 ml eluierte, während Vipp1_84-259 ein Elutionsmaximum bei 9,06 ml aufwies. Vipp1_163-259 wiederum ließ sich in Fraktionen detektieren, die einem Elutionsvolumen von 10,06 ml entsprachen. Die aus der Kalibrierung der Superdex 75 10/300 GL-Säule mithilfe verschiedener Proteinstandards ermittelten Molekulargewichte der analysierten Proteinkonstrukte

ERGEBNISSE

belegen, dass Vipp1-Proteine, denen mehr als eine α -Helix fehlen, zu Tetrameren assemblieren (Abb. 6A). Somit konnten die Ergebnisse der GAC-Analyse mit der Superdex 200 10/300 GL-Säule anhand einer Säule mit kleinerem Auftrennungsbereich bestätigt werden. In keinem Fall war es durch eine N-terminale Verkürzung des Proteins möglich, kleinere Formen von Vipp1, wie Di- oder gar Monomere zu erlangen.

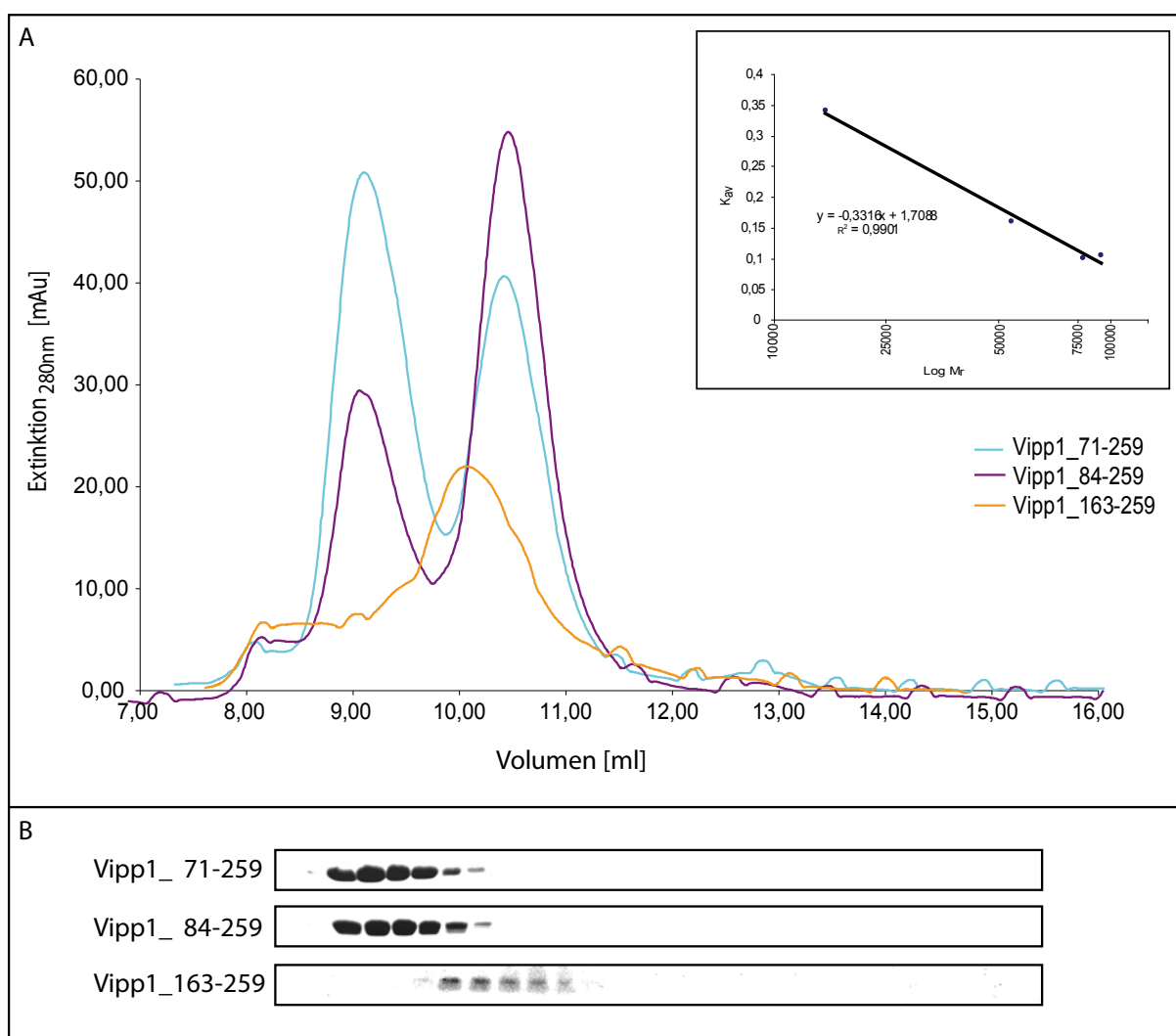


Abbildung 6: Größenausschluss-Chromatographie (GAC) mit einer Superdex 75 10/300 GL-Säule

GAC mit N-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukten, die zuvor über Ni²⁺-Sephrose aufgereinigt wurden. (A) Das Chromatogramm zeigt die Extinktion bei 280 nm [mAu] im Elutionsverlauf [ml]. (B) Die gesammelten Fraktionen von je 250 μ l wurden auf einer 12,5 % SDS-PAGE analysiert und das eluierte Protein mit Coomassie angefärbt. Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde eine Kalibrierungsgerade mit diversen Proteinstandards erstellt (Kästchen rechts oben).

Die Analysen mittels GAC machen deutlich, dass der ersten α -Helix von Vipp1 eine wichtige Rolle in der Assemblierung des Proteins zum hochmolekularen Komplex zukommt. Dagegen hat die Verkürzung des Proteins am C-terminalen Ende um mindestens vier α -Helices keinen Einfluss auf die Komplexbildung, allerdings wird das Protein mit zunehmender Verkürzung wesentlich instabiler. Die kleinste Struktur, die in den Analysen durch Verkürzung des Proteins um die vier N-terminalen α -Helices erzielt werden konnte, ist ein Tetramer. Diese Bildung von stabilen Tetrameren ist ein Indiz dafür, dass der Vipp1-Komplex tatsächlich aus tetramerischen Untereinheiten aufgebaut ist, wie bislang häufig spekuliert wurde (Bultema *et al.*, 2010, Fuhrmann *et al.*, 2009).

3.2.3 Saccharose-Gradienten

Mit linearen Saccharose-Gradienten lassen sich Proteine und Proteinkomplexe ebenfalls in Abhängigkeit von ihrer Größe auftrennen. Diese Methode ist besonders für große Komplexe geeignet, bei denen die GAC an die Grenzen ihrer Auflösungsfähigkeit gerät. Die Sedimentation der Proteine im Saccharose-Gradienten wird im Wesentlichen durch die Dichte und Gestalt der Proteine beeinflusst. Hochmolekulare Komplexe, die auf den Gradienten aufgetragen werden, wandern tiefer in diesen ein, als niedermolekulare Strukturen. Dementsprechend wäre Vipp1 VI als Homooligomer mit einem Molekulargewicht von etwa 2 MDa nach der Zentrifugation in Bereichen mit hoher Saccharose-Konzentration zu erwarten, Vipp1-Tetramere sollten dagegen eher in einer Zone mit geringerer Saccharose-Konzentration lokalisiert sein. Große Strukturen wie aggregierte Proteine können nach der Zentrifugation als Pellet am Boden des Gradienten detektiert werden. Die Methode ist also gut geeignet, um die Ergebnisse der GAC mit einer anderen Technik zu bestätigen.

Deshalb wurden verschiedene N- und C-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukte auf kontinuierliche Saccharose-Gradienten geladen. Die über Nacht zentrifugierten Gradienten wurden später fraktioniert und die Proteine mit einer Methanol-Chloroform-Fällung präzipitiert. Die Analyse der einzelnen Fraktionen erfolgte über eine 12.5 % SDS-PAGE mit anschließendem Western Transfer und Immunodekoration mit einem Antikörper gegen das Vipp1-Volllängenprotein.

ERGEBNISSE

Wie in der Abbildung 7 zu sehen ist, sind Vipp1-Konstrukte, die am N-Terminus um eine (Vipp1_21-259) oder mehrere α -Helices (Vipp1_71-259 und Vipp1_84-259) verkürzt wurden, ausschließlich im Anfangsbereich des Gradienten lokalisiert, wo sich die Saccharose-Konzentration auf etwa 10 % beläuft.

Zwischen den einzelnen Konstrukten ist hier kein wesentlicher Größenunterschied feststellbar, was die Ungenauigkeit der Methode verdeutlicht. Dagegen wandern Vipp1 VI sowie Vipp1_1-219 während der Zentrifugation fast vollständig durch den Gradienten. Obwohl ein Teil des Proteins sich im Pellet (P) befindet, ist der größte Teil deutlich im Gradienten bei einer Saccharose-Konzentration von etwa 30 - 40 % zu detektieren (Abb. 7, Vipp1 VI, Vipp1_1-219).

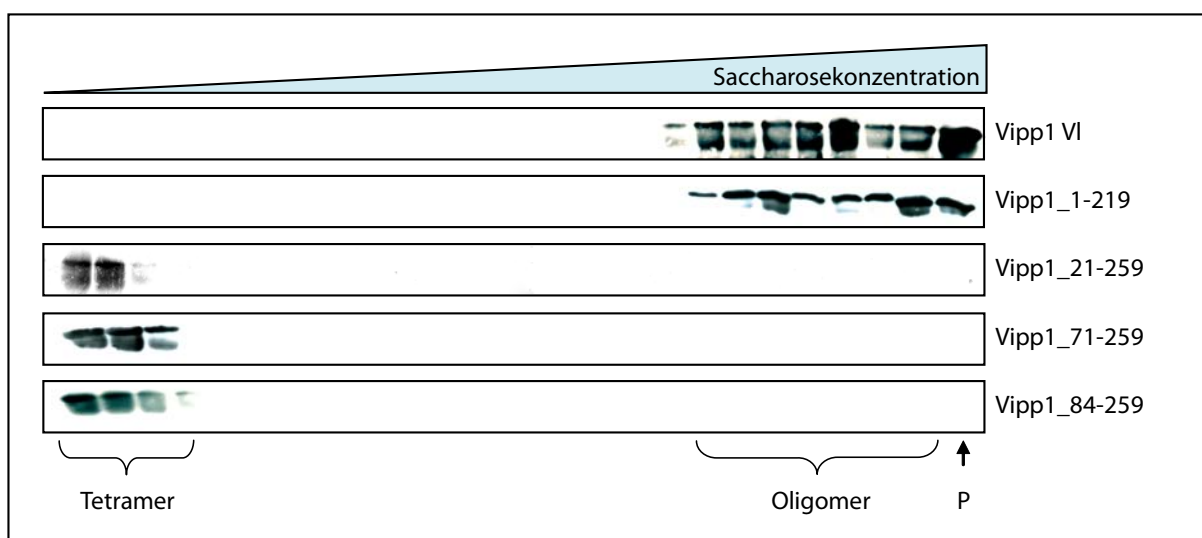


Abbildung 7: Saccharosegradienten mit Vipp1 VI und verkürzten Vipp1-Konstrukten

N- und C-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukte wurden auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten (10 - 40 %) geladen. Nach der Zentrifugation wurden die Gradienten fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE analysiert. Vipp1 wurde nach Western Transfer mit einem Antikörper gegen das Vipp1-Vollängenprotein detektiert.

Somit kann anhand der Saccharose-Gradienten belegt werden, dass sowohl Vipp1-Volllänge als auch das C-terminal verkürzte Konstrukt Vipp1_1-219 einen hochmolekularen Komplex bilden. Im Gegensatz dazu weist die Verteilung der N-terminal verkürzten Konstrukte auf die Bildung von wesentlich kleineren Strukturen hin.

Die Saccharose-Gradienten stützen insofern die in der GAC erzielten Ergebnisse, als dass sie deutlich herausstellen, dass N-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukte

ein wesentlich niedrigeres Molekulargewicht aufweisen als das Volllängenprotein oder ein C-terminal verkürztes Konstrukt. Darüber hinaus legen sie nahe, dass das im Ausschlussvolumen der GAC eluierende Proteine nicht auf Aggregation zurückzuführen ist.

3.2.4 Negativkontrastierung

Der Vipp1-Komplex kann aufgrund seines hohen Molekulargewichts mittels Negativkontrastierung visuell erfasst werden. Diese Methode wurde bereits in früheren Untersuchungen genutzt, um den homooligomeren Komplex des Volllängenproteins zu visualisieren (Aseeva *et al.*, 2004). Auf diese Weise war es möglich, den Vipp1-Komplex als ringförmige Struktur zu identifizieren. Negativkontrastierung wurde in dieser Arbeit eingesetzt, um die Ergebnisse der GAC hinsichtlich der Komplexbildung C-terminal verkürzter Vipp1-Konstrukte zu verifizieren und zu prüfen, ob die Entfernung C-terminaler Domänen Einfluss auf die ringförmige Struktur der Proteinkomplexe nimmt.

Bereits anhand der Übersichtsaufnahmen ist zu erkennen, dass Vipp1 Konstrukte, denen bis zu drei C-terminale α -Helices fehlen (Vipp1_1-219; Vipp1_1-201 und Vipp1_1-188), in der Lage sind, zu hochmolekulare Komplexen mit ringförmiger Struktur zu assemblieren (Abb. 8), welche den durch Vipp1-Volllängenproteine (Vipp1 VI) gebildeten Komplexen in Größe und Struktur ähneln. In jeder der Detailaufnahmen ist ein dunkler Bereich in der Mitte des Komplexes zu sehen, der die Vipp1-typische Öffnung im Komplex repräsentiert. Im Falle des Vipp1_1-188-Konstruktes wird dies jedoch erst in der Betrachtung der Aufsichtsaufnahmen von Komplexen im Detail deutlich.

In den von Vipp1 VI sowie auch von Vipp1_1-219 und Vipp1_1-201 angefertigten Übersichtsaufnahmen sind größtenteils einzelne Proteinkomplexe zu sehen. Wird das Protein allerdings um eine weitere α -Helix verkürzt (Vipp1_1-188), sind in den Aufnahmen keine einzelnen Komplexe mehr erkennbar, das Protein aggregiert vielmehr, präzipitiert und bildet große Komplexhaufen. Das Konstrukt zeigt allerdings trotz der Aggregatbildung deutlich die für den Vipp1-Komplex typische ringförmige Struktur (Abb. 8, Vipp1_1-188). Somit mag das Protein zwar instabil sein und zur Aggregatbildung neigen, allerdings ist es in jedem Fall in der Lage, die Grundstruktur des Komplexes auszubilden und aufrechtzuerhalten.

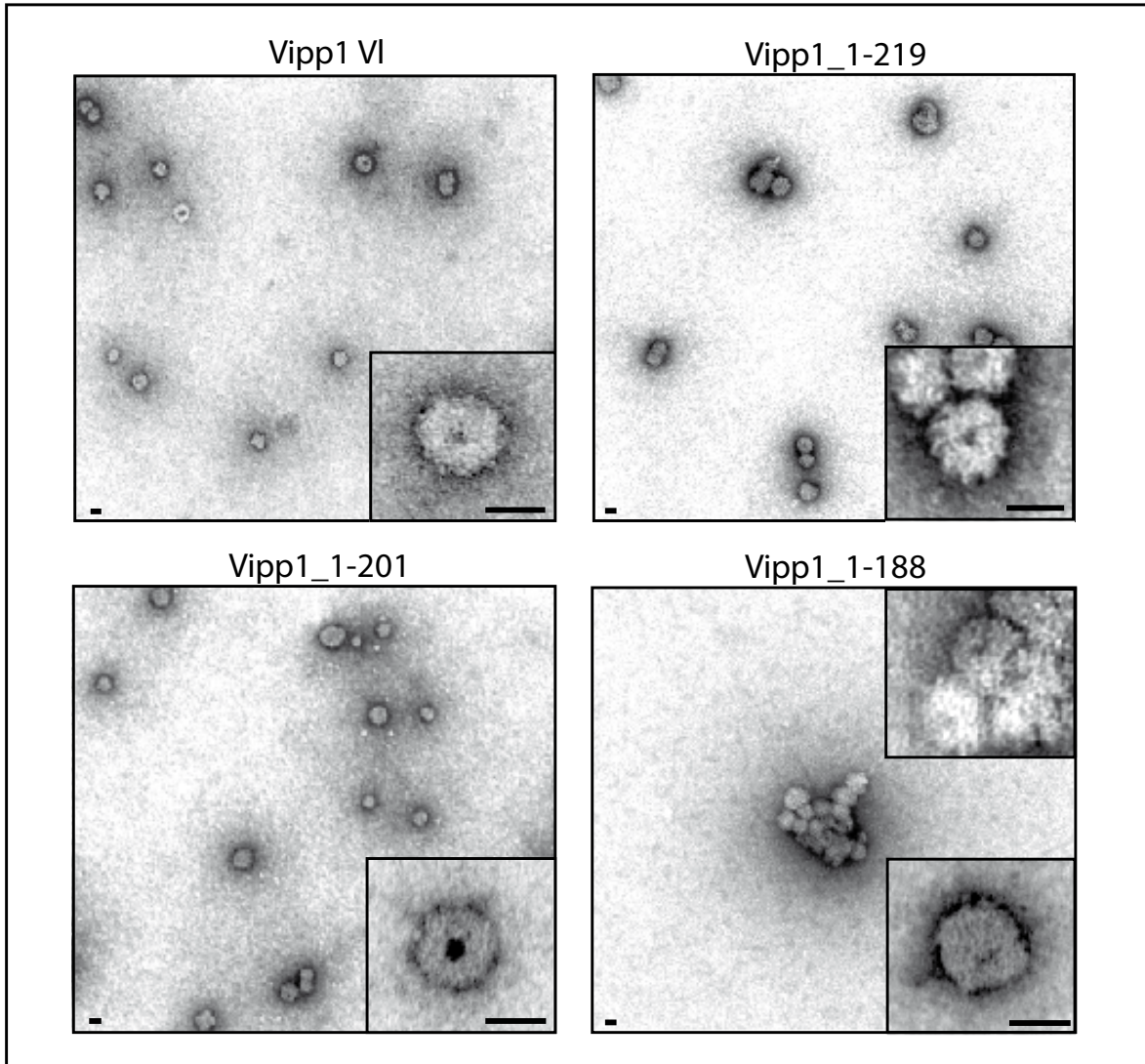


Abbildung 8: Analyse der von C-terminal verkürzten Vip1-Konstrukten gebildeten Komplexen mittels Negativkontrastierung

TEM-Aufnahmen von heterolog exprimierten Proteinen, die zuvor über Ni^{2+} -NTA-Sepharose aufgereinigt wurden. Von den untersuchten Konstrukten sind jeweils eine Übersichts- sowie die Detailaufnahme eines Einzelkomplexes gezeigt. Der schwarze Balken entspricht jeweils 200 Å.

Anhand der TEM-Aufnahmen lassen sich die Ergebnisse der GAC, nach denen große Bereiche des C-Terminus für die Komplexbildung von Vip1 unerheblich sind, belegen. Zumindest die letzten drei α -Helices konnten in den durchgeführten Analysen für diese Eigenschaft von Vip1 als deutlich nebensächlich identifiziert werden. Eine andere Frage ist natürlich, ob die Funktionalität eines so stark verkürzten Proteins eingeschränkt ist, was sich anhand der instabilen Proteinstruktur vermuten lässt. Aufgrund seiner geringen Expressionsrate war es nicht möglich,

das Konstrukt Vipp1_1-163, das C-terminal um drei α -Helices verkürzt ist, mittels TEM zu analysieren.

Des Weiteren ist in den Detailaufnahmen erkennbar, dass die Oberfläche des Vipp1-Komplexes nicht gleichmäßig ist, sondern Unebenheiten aufweist. Dies wird vor allem bei Betrachtung der Ausschnittsaufnahme des Konstrukts Vipp1_1-219 deutlich (Abb. 8, Vipp1_1-219, Detailaufnahme). Es lässt sich sogar eine Symmetrie feststellen, die sich bei dem Vergleich mehrerer Komplexe auf etwa 12 festlegen lässt. Eine 12 - 17-fache Symmetrie von Vipp1-Proteinen wurde bereits früher für Vipp1-Komplexe aus *Synechocystis* PCC 6803 erörtert (Fuhrmann *et al.*, 2009) und eine 9-fache Symmetrie ist schon für das Vipp1-Homolog PspA aus *E. coli* bekannt (Hankamer, *et al.*, 2004).

Vipp1 VI sowie Konstrukte, denen die letzte oder die letzten beiden α -Helices fehlen (Vipp1_1-219 und Vipp1_1-201) liegen meist als Einzelkomplexe vor, wie in den Übersichtsaufnahmen deutlich zu erkennen ist (Abb. 8). Dennoch lagern sich in manchen Fällen auch hier zwei oder mehr Komplexe aneinander (Abb. 9) oder bilden aus vier oder mehr Komplexen bestehende Röhren. Die Anlagerung von Vipp1-Komplexen wurde schon zuvor beschrieben (Aseeva *et al.*, 2004, Fuhrmann *et al.*, 2009) und auch bei PspA aus *E. coli* beobachtet (Standar *et al.*, 2008). Ob die Zusammenlagerung der Einzelkomplexe für die Funktion des Proteins von Bedeutung ist, geht aus diesen Versuchen allerdings nicht hervor.

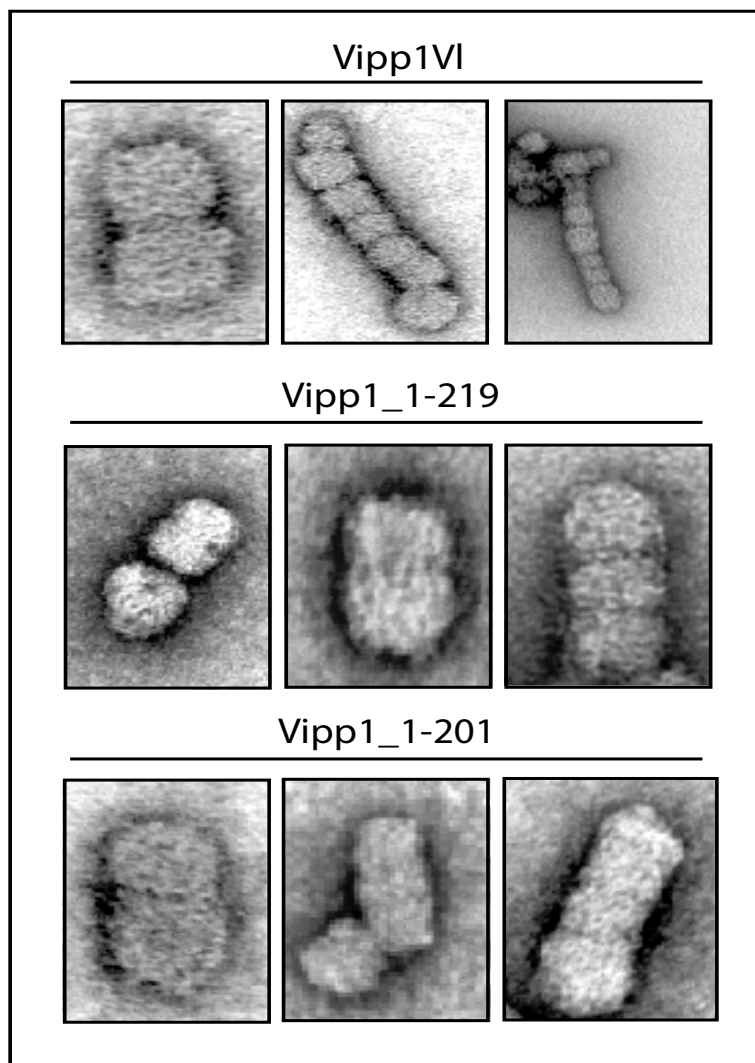


Abbildung 9: Aneinanderlagerung der von Vipp1 VI und C-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukten gebildeten Komplexe (Negativkontrastierung).

Die von Vipp1 VI sowie zwei C-terminal verkürzten Konstrukten gebildeten Komplexe lagern sich in einigen Fällen zu Dimeren und höheren Strukturen zusammen.

3.2.5 Trypsinbehandlung

Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die Behandlung der Inneren Hüllmembran aus Erbsenchloroplasten mit der Protease Trypsin in der Bildung eines 25 kDa großen Vipp1-Fragments resultiert, das offensichtlich vor weiterem proteolytischen Verdau geschützt ist (Aseeva *et al.*, 2004). Dieses Fragment wird nach SDS-PAGE und Western Transfer zwar von einem Antikörper gegen das Volllängeprotein erkannt, nicht aber von einem Antikörper, der speziell gegen die letzten 42 C-terminalen Aminosäuren von Vipp1 gerichtet ist (α -V_{C-term}). Daraus lässt sich ableiten, dass es der C-terminale Bereich des Proteins ist, der von der Protease

angegriffen wird. Eine BN-PAGE Analyse nach der Proteasebehandlung zeigte bereits in vorangegangenen Versuchen, dass partiell verdautes natives Vipp1 weiterhin in Form eines hochmolekularen Komplexes vorliegt (Asseva, 2004). Es lässt sich daher vermuten, dass ein großer Teil des Vipp1-Proteins aufgrund seiner Integration in einen kompakten Kernkomplex vor dem Verdau geschützt ist. Weiter ist anzunehmen, dass der C-terminale Bereich des Proteins, der nicht zur Komplexbildung benötigt wird, ebenfalls keinen Bestandteil des Kernkomplexes darstellt, sondern vielmehr außerhalb des Oligomers lokalisiert und dadurch für die Protease zugänglich ist.

Die hier dargestellten Versuche zur Trypsinbehandlung wurden mit rekombinantem Vipp1-Protein durchgeführt. Zum einen sollten im Rahmen dieser Arbeit die mit nativem Protein gewonnenen Erkenntnisse bestätigt werden, zum anderen sollte anhand des Verdau verschiedener Vipp1-Konstrukte mit Trypsin geklärt werden, ob tatsächlich eine Korrelation zwischen Komplexbildung und partiellem Schutz vor proteolytischem Abbau besteht. Zusätzlich sollte eine genaue Identifizierung der Protease-sensitiven Bereiche des Proteins mittels Massen-Spektrometrie erfolgen.

Dazu wurde zuerst der Verdau des rekombinanten Vipp1-Volllängenproteins in Abhängigkeit von der Zeit mit Hilfe von einem Coomassie-gefärbten SDS-Gel dargestellt (Abb. 10A, links). Rekombinantes Vipp1 VI, dessen Monomer sich nach SDS-PAGE bei 36 kDa detektieren lässt, war bereits nach 2-minütiger Proteasebehandlung vollständig verschwunden, stattdessen erschien eine Proteinbande mit einem Molekulargewicht von ca. 27 kDa, die auch nach fortlaufender Proteolyse über einen längeren Zeitraum mit einer Coomassie-Färbung nach SDS-PAGE Analyse detektierbar war.

Ein gegen den C-terminalen Histidin-Tag gerichteter Antikörper (α -His) dagegen war nicht in der Lage, dieses 27 kDa Vipp1-Fragment nach Western Transfer nachzuweisen (Abb. 10A, rechts). Dies zeigt deutlich, dass zumindest ein Bereich, der durch Trypsin verdaut werden kann, am C-terminalen Ende des Proteins lokalisiert ist.

ERGEBNISSE

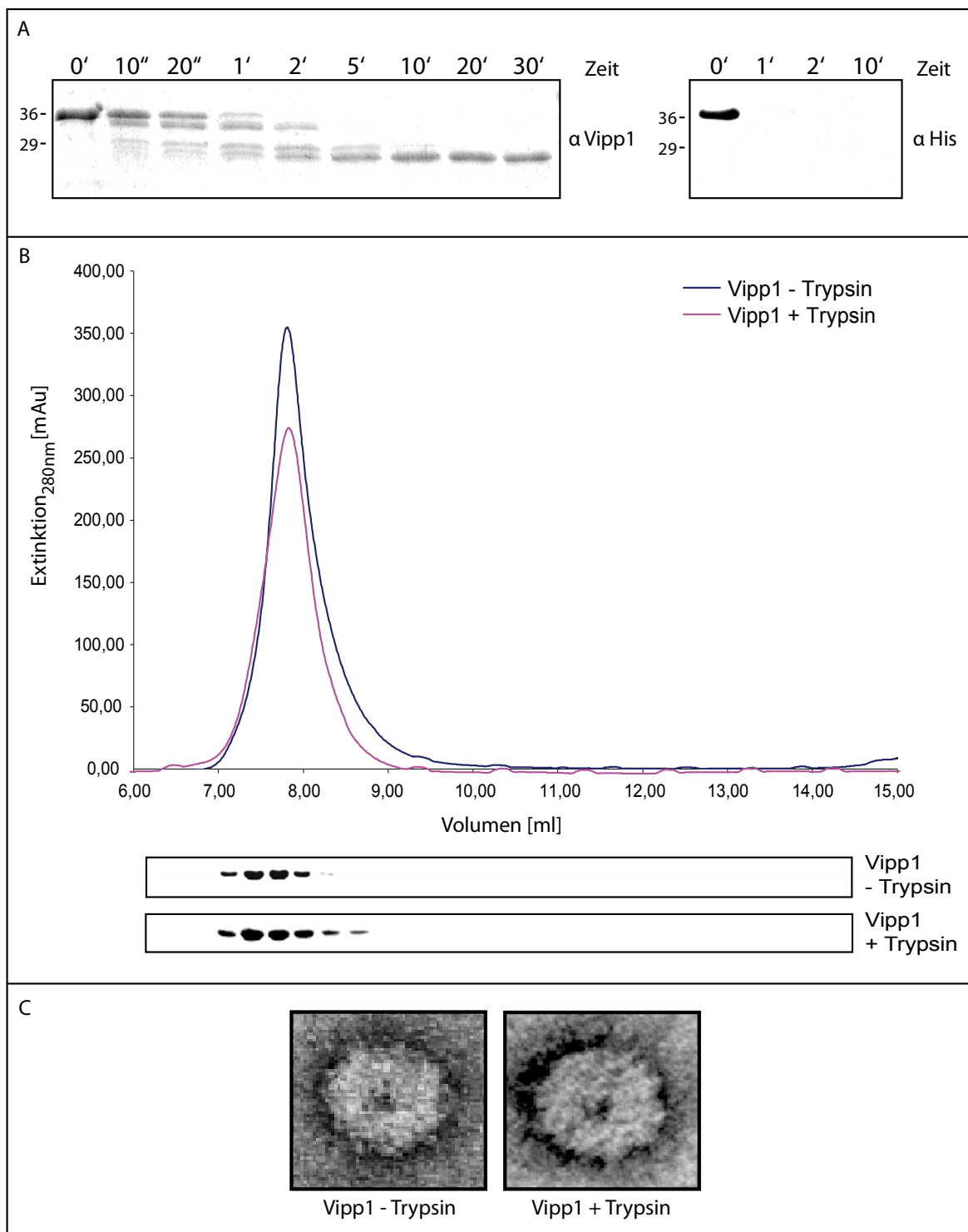


Abbildung 10: Trypsinbehandlung von rekombinatem Vip1 VI

(A) Rekombinantes Vip1 VI wurde in einer Zeitreihe mit Trypsin verdaut. Die Analyse des Verdaus erfolgte durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (links) bzw. Immunodetektion mit einem Antikörper gegen den Histidin-Tag. Die Komplexbildung des durch Trypsin unverdauten und verdauten Vip1 (Vip1 +/- Trypsin) wurde mittels (B) Größenausschluss-Chromatographie und (C) Negativkontrastierung untersucht.

ERGEBNISSE

Wird mit Trypsin verdautes Vipp1-Volllängenprotein in der Größenausschluss-Chromatographie (GAC) mit einer Superdex 200-Säule analysiert, so eluiert das Protein wie für unbehandeltes Vipp1 VI typisch in deren Ausschlussvolumen (Abb. 10B), was belegt, dass die Komplexbildung durch die Proteasebehandlung nicht beeinflusst wird. Auch mittels Negativkontrastierung erstellte TEM-Aufnahmen von verdaulichem Vipp1 zeigen die charakteristische ringförmige Struktur des Vipp1-Komplexes (Abb. 10C). Somit bestätigen diese Untersuchungen die Stabilität des Vipp1-Komplexes gegen proteolytischen Abbau und zeigen zum ersten Mal, dass dabei auch die Tertiärstruktur des Komplexes erhalten bleibt.

Um zu ermitteln, ob der partielle Proteolyseschutz von Vipp1 tatsächlich mit der Komplexbildung zusammenhängt, wurden die Protease-Experimente zunächst mit zwei C-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukten (Vipp1_1-219 und Vipp1_1-188), die nachweislich zur Oligomerisierung befähigt sind und deshalb als hochmolekularer Komplex vorliegen sollten, wiederholt.

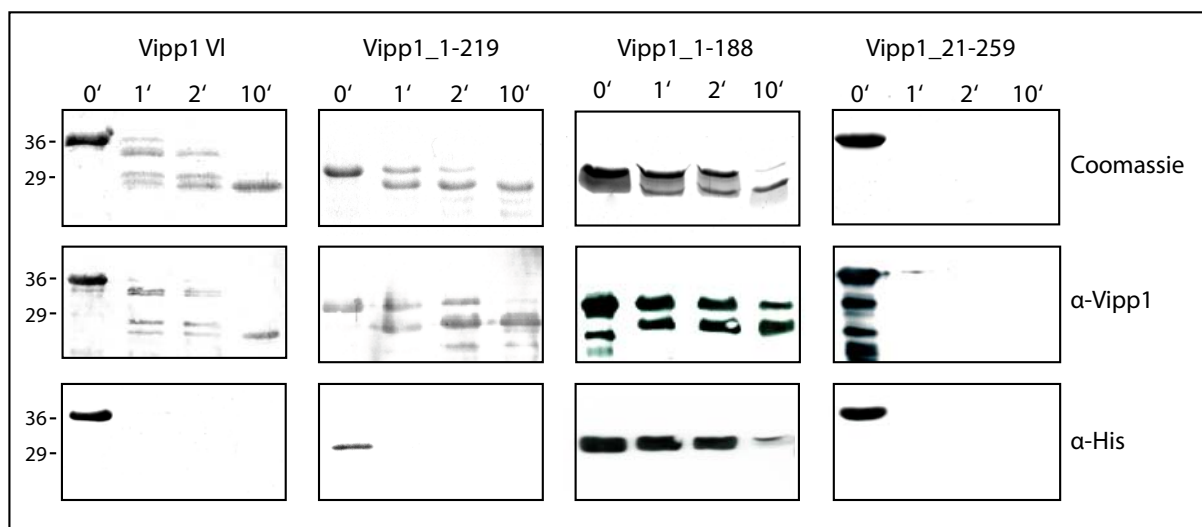


Abbildung 11: Trypsinbehandlung von Vipp1 VI, sowie verschiedenen N- und C-terminal verkürzten Konstrukten

Zwei C-terminal verkürzte Vipp1-Proteine (Vipp1_1-219 und Vipp1_1-188) sowie ein Konstrukt, in dem die erste α -Helix fehlt (Vipp1_21-259) wurden in einer Zeitreihe mit Trypsin verdaulich. Nach der Proteolyse wurden die Proteine mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung (Coomassie) bzw. nach Western Transfer mit einem Antikörper gegen Vipp1 (α -Vipp1) oder den Histidin-Tag (α -His) analysiert.

Analysen mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung zeigten, dass beide Konstrukte im Verlauf der Trypsinbehandlung nur partiell zu einem Fragment von 27 kDa verdaut werden, das nach Western Transfer zwar von einem gegen Vipp1 gerichteten Antikörper detektiert werden können (Abb. 11, α -Vipp1), sich aber mit einem Antikörper gegen den C-terminalen Histidin-Tag nicht nachweisen lassen (Abb. 11, α -His). Dies verdeutlicht, dass der geschützte Bereich des Vollängenproteins mit dem der verkürzten Konstrukte übereinstimmt. Es fällt auf, dass Konstrukt, welches sich aus den Aminosäuren 1-188 zusammensetzt, wesentlich langsamer verdaut wird als das Vollängenprotein oder Vipp1_1-219. Dies lässt vermuten, dass das Protein aufgrund seiner Instabilität und dem Hang zur Aggregatbildung schwerer für die Protease zugänglich war und aus diesem Grund die Proteolyse erheblich langsamer erfolgt.

Das N-terminal verkürztes Konstrukt Vipp1_21-259, das nicht mehr fähig ist, zu einem hochmolekularen Komplex zu assemblieren, war dagegen nach der Zugabe von Trypsin bereits in kürzester Zeit weder mit einer Coomassie-Färbung, noch durch Immunodekoration mit gegen Vipp1 und den Histidin-Tag gerichtete Antikörper nachzuweisen (Abb. 11, Vipp1_21-259). Dies impliziert einen vollständigen Verdau dieses Konstrukts durch Trypsin. Auch die Trypsinbehandlung weiterer Konstrukte, denen diverse N-terminale α -Helices entfernt wurden (Vipp1_71-259, Vipp1_84-259) machte deutlich, dass Komplexbildung und Proteasestabilität in jedem Fall miteinander in Verbindung stehen, da auch diese Proteine der Proteolyse nicht standhalten (Daten nicht gezeigt).

Um eine Vorstellung davon zu bekommen, welche Aminosäuren von Vipp1 während der Proteolyse abgespalten werden, wurde Vipp1 VI vor und nach der Behandlung durch Trypsin mittels Massen-Spektrometrie (MS) analysiert. Auf diese Weise sollte anhand der Differenz der ermittelbaren Peptidsequenzen festgestellt werden, welche Teile des Proteins von der Proteolyse betroffen sind.

Die in der MS-Analyse erhaltenen Sequenzabdeckungen beliefen sich bei dem unverdauten Protein auf 93 %, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass die Daten aussagekräftig sind.

In der Abbildung 12 sind die durch MS-Analyse ermittelten Peptidsequenzen von Vipp1 VI vor und nach Trypsinverdau im Vergleich dargestellt. Anhand der

ERGEBNISSE

abgebildeten Sequenzen wird bestätigt, dass der Verdau ausschließlich vom C-Terminus her erfolgt. Die ersten N-terminalen Aminosäuren werden sowohl im unverdauten als auch im verdauten Protein erkannt, was deutlich macht, dass im Bereich des N-Terminus keine Abspaltung von Aminosäuren durch die Protease erfolgt. Nach der Trypsinbehandlung fehlen vom C-Terminus ausgehend 59 Aminosäuren in der Sequenz, die über MS nicht mehr identifiziert werden konnten, wovon der C-terminale Histidin-Tag (mit Linker) allerdings allein 29 Aminosäuren ausmacht. Das entspricht einer Verkürzung des Proteins um ein Molekulargewicht von etwa 7 kDa durch die Proteolyse. Das verkürzte Vipp1-Fragment besteht demnach noch aus den Aminosäuren 1 - 229 des Originalproteins.

Vipp1VI unverdaut

1	MALMNLFERF	SRVVKSYANA	LISSFEDPEK	ILEQTVIEMN	SDLTKMRQAT
51	AQVLASQKQL	QNKYKAAQQS	SDDWYKRAQL	ALAKGDEDLA	REALKRKRSF
101	ADNATALKTQ	LDQQKGVVDN	LVSNTLRLLES	KIQEAKAKKD	TLLARARTAK
151	TATKVQEMIG	TVNTSGALSA	FEKMEEKVMA	MESEADALTQ	IGTDELEGKF
201	QMLETSSVDD	DLADLKKELS	GSSKKGELPP	GRSTVAASTR	YPFKDSEIEN
251	ELNELRRKAN	DFKGEFEAYV	EQKLISEEDL	NSAVDHHHHH	H

Vektor/Histidin-Tag

Vipp1VI verdaut

1	MALMNLFERF	SRVVKSYANA	LISSFEDPEK	ILEQTVIEMN	SDLTKMRQAT
51	AQVLASQKQL	QNKYKAAQQS	SDDWYKRAQL	ALAKGDEDLA	REALKRKRSF
101	ADNATALKTQ	LDQQKGVVDN	LVSNTLRLLES	KIQEAKAKKD	TLLARARTAK
151	TATKVQEMIG	TVNTSGALSA	FEKMEEKVMA	MESEADALTQ	IGTDELEGKF
201	QMLETSSVDD	DLADLKKELS	GSSKKGELPP	GRSTVAASTR	YPFKDSEIEN
251	ELNELRRKAN	DFKGEFEAYV	EQKLISEEDL	NSAVDHHHHH	H

Vektor/Histidin-Tag

Abbildung 12: Vergleich der vor und nach Proteolyse über MS-Analysen ermittelten Peptid-Sequenzen von Vipp1 VI

Rekombinantes Vipp1 VI wurde vor (unverdaut) und nach dem Verdau (verdaut) durch Trypsin mittels MS-Spektroskopie analysiert. Die in der MS-Analyse identifizierten Peptidsequenzen sind in rot dargestellt.

Die Ergebnisse demonstrieren, dass ein großer Teil des Proteins unter nativen Bedingungen als kompakter Kernkomplex vorliegt, der bei einer Behandlung mit Trypsin vor der Proteolyse geschützt ist und nicht verdaut wird. Dieser Teil umfasst konkret die ersten 229 Aminosäuren des Vollängenproteins, wie anhand der Sequenzanalyse gezeigt werden konnte (Abb. 12). Alles was darüber hinausgeht,

ist für die Protease frei zugänglich und wird abgespalten. Dies scheint der Tatsache zu widersprechen, dass auch C-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukte, wie Vipp1_1-219 und Vipp1_1-188, die deutlich kürzer als 229 Aminosäuren sind, im Verlauf des Verdau kleiner werden. Das hängt allerdings mit dem relativ langen C-terminalen Linker zusammen, an dessen Ende der Histidin-Tag lokalisiert ist und der teilweise abgespalten wird, was im SDS-Gel verfolgt werden und auch durch Sequenzanalysen bestätigt werden kann (Daten nicht gezeigt). Generell kann festgehalten werden, dass nicht nur Bereiche des Proteins, die zur Komplexbildung benötigt werden, vor einem Verdau durch Trypsin geschützt sind, sondern auch manche Domänen, die in diesem Prozess keine Rolle spielen. N-terminal verkürzte Konstrukte, die nicht in der Lage sind, zum Komplex zu assemblieren und stattdessen Tetramere bilden, werden dagegen komplett verdaut. Dies legt nahe, dass die Tetramer-Bildung für den Schutz des Proteins nicht ausreicht, sondern erst die Assemblierung zu einem hochmolekularen Komplex diese Funktion erfüllt.

3.2.6 Untersuchung der Stabilität in Anwesenheit von Harnstoff

Analysen des His-Vipp1 Komplexes hatten eine hohe Resistenz des Komplexes gegen Denaturierung aufgezeigt (Dissertation Aseeva, 2007). Um die Stabilität der verschiedenen Vipp1-His-Komplexe zu testen, wurden nativ aufgereinigte, aus Vipp1 VI bzw. Vipp1_1-219 zusammengesetzte Proteinkomplexe zunächst jeweils ohne, sowie mit 4 M bzw. 6 M Harnstoff inkubiert. Anschließend wurde das Protein unter den jeweiligen Bedingungen durch Größenausschluss-Chromatographie (GAC) unter Verwendung einer Superdex 200 10/300 GL-Säule analysiert. Von der Säule eluierendes Vipp1 wurde fraktioniert und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert. Auf diese Weise konnte neben der Stabilität des Gesamtkomplexes auch ein möglicher Zerfall in verschiedene Oligomer-Strukturen untersucht werden, was gegebenenfalls Aufschluss über den Aufbau der Vipp1-Komplexe gibt.

Zunächst wurde Vipp1 VI analysiert. Unter nativen Bedingungen eluiert das Voll-längenprotein wie erwartet ab einem Volumen von 7 ml vollständig als hochmolekularer Komplex im Ausschlussvolumen der Säule, wie anhand des Elutionsprofils und der SDS-PAGE-Analyse nachvollzogen werden konnte (Abb. 13A

und B, Vipp1 VI nativ). Im Vergleich zeigte das Chromatogramm bei ansteigender Harnstoffkonzentration eine deutliche Abnahme der optischen Dichte bei 280 nm in diesem Bereich, was die Reduktion der Vipp1-Komplexe in den mit Harnstoff behandelten Proben implizierte (Abb. 13A, 4 M und 6 M Harnstoff). Die Analyse der gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Färbung bestätigte prinzipiell die Abnahme der im Ausschlussvolumen eluierenden Vipp1-Oligomere in Abhängigkeit von der Harnstoffkonzentration (Abb. 13B, 4 M und 6 M Harnstoff). So war in den durch SDS-PAGE analysierten Fraktionen im Ausschlussvolumen schon bei 4 M Harnstoff eine deutliche Verminderung eluierender Proteine zu verzeichnen, das weniger als der Hälfte dessen entsprach, was unter nativen Bedingungen detektiert wurde. In Anwesenheit von 6 M Harnstoff konnte im Ausschlussvolumen der Säule mittels SDS-PAGE-Analyse nahezu kein Protein mehr nachgewiesen werden. Das Chromatogramm zeigte an dieser Stelle allerdings einen deutlichen Peak in Gegenwart von 6 M Harnstoff, der etwa 50 % der Extinktion ausmachte, die unter nativen Bedingungen gemessen wurde. Diese Tatsache lässt sich damit erklären, dass Vipp1 wahrscheinlich nicht allein für die im Ausschlussvolumen gemessene Extinktion verantwortlich ist, sondern ein Teil der Absorption in diesem Bereich vermutlich auf hochmolekulare kontaminierende bakterielle Proteine oder Nukleinsäuren zurückgeht, die ebenfalls im Ausschlussvolumen eluieren.

ERGEBNISSE

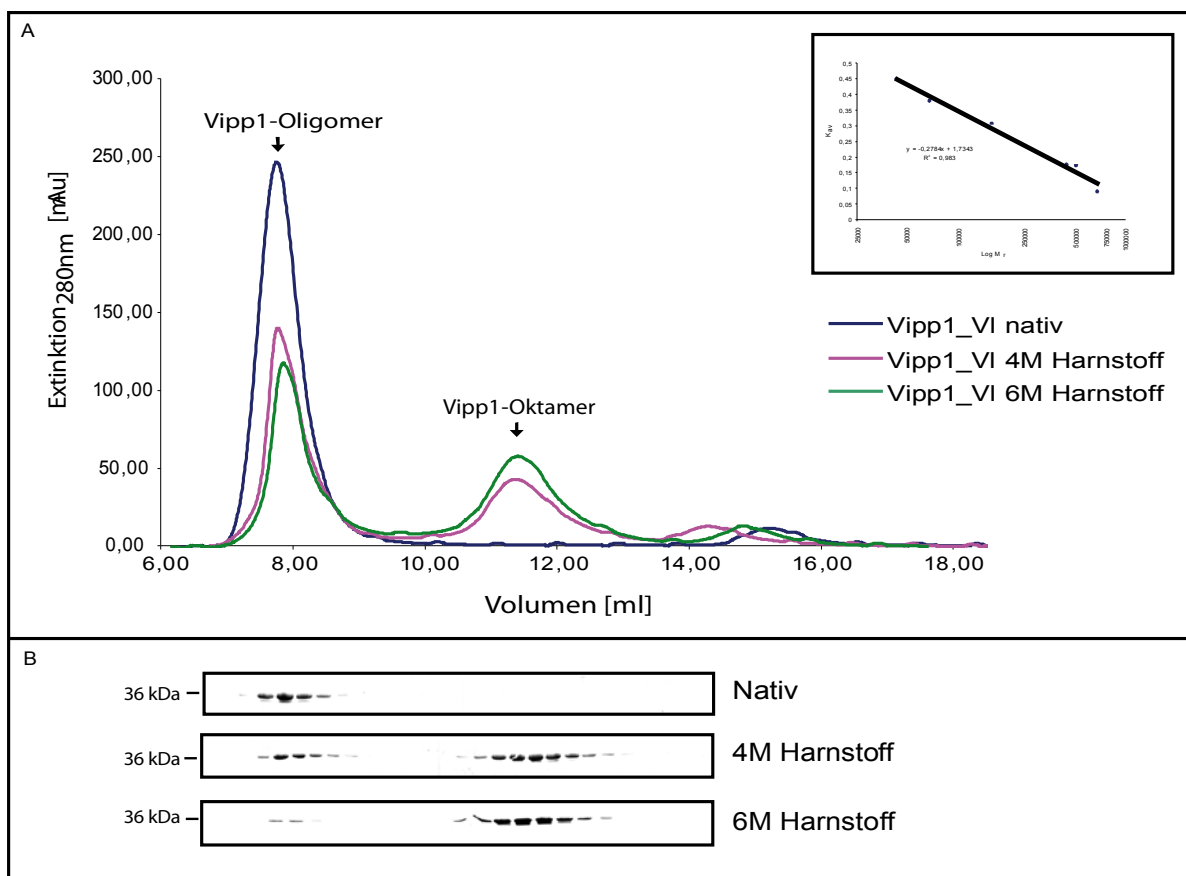


Abbildung 13: Komplexbildung von Vipp1 VI in Anwesenheit von Harnstoff

(A) Die Komplexbildung von Vipp1 VI wurden unter nativen Bedingungen, sowie in Anwesenheit von 4 M und 6 M Harnstoff mittels Größenausschluss-Chromatographie untersucht. (B) Eluiertes Protein wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert. Zur Größenbestimmung wurde eine Kalibrierungsgeraden verwendet (Kästchen rechts oben).

Zusätzlich ließ sich im Elutionsverlauf mit steigender Harnstoffkonzentration ein Anstieg der Extinktion mit einem Maximum bei 11,15 ml verzeichnen, was Proteine mit einem wesentlich niedrigeren Molekulargewicht als 2 MDa repräsentierte (Abb. 13A) und sich in der SDS-PAGE deutlich als Vipp1 identifizieren ließ (Abb. 13B). Mithilfe der Kalibrierungsgeraden (Abb. 13A, Kästchen rechts oben) konnte für das an dieser Stelle eluierende Protein ein Molekulargewicht ermittelt werden, das in etwa einem Vipp1-Oktamer entsprach.

Wurden native Vipp1-Proteinkomplexe eines C-terminal verkürzten Konstruktes (Vipp1_1-219) in Anwesenheit von Harnstoff analysiert, so ließen sich die ermittelten Ergebnisse im Großen und Ganzen mit den mit Vipp1 VI erzielten Resultaten vergleichen (Abb. 14).

ERGEBNISSE

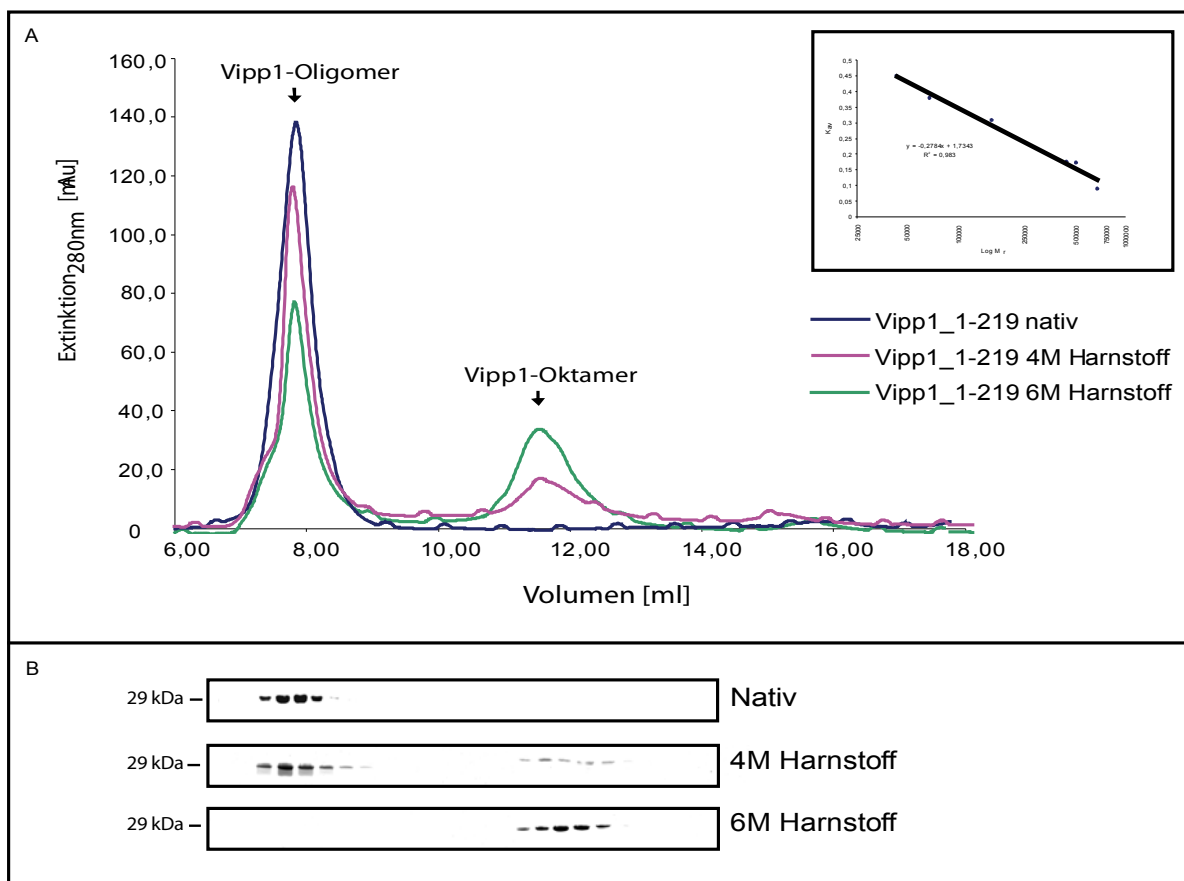


Abbildung 14: Komplexbildung von Vipp1_1-219 in Anwesenheit von Harnstoff

(A) Die Komplexbildung eines C-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukts (Vipp1_1-219) wurde unter nativen Bedingungen, sowie in Anwesenheit von 4 M und 6 M Harnstoff mittels Größenausschluss-Chromatographie untersucht. (B) Eluiertes Protein wurde durch SDS-PAGE und Coomassie-Färbung detektiert. Zur Größenbestimmung wurde eine Kalibrierungsgerade verwendet (Kästchen rechts oben).

Im Ausschlussvolumen von der Säule eluierendes Protein nahm ebenfalls mit zunehmender Harnstoffkonzentration ab (Abb. 14A und B) und die Analysen mittels SDS-PAGE bestätigen auch für dieses Konstrukt den vollständigen Zerfall des homo-oligomeren Komplexes in Gegenwart von 6 M Harnstoff (Abb. 14B). In den im Ausschlussvolumen eluierenden Fraktionen ließ sich hier in der SDS-PAGE-Analyse nahezu kein Protein mehr nachweisen, stattdessen konnte auch hierbei das Protein mittels Kalibrierungsgerade als oktamerer Untereinheit identifiziert werden (Abb. 14B, 6 M Harnstoff).

Die Ergebnisse zeigen, dass der Vipp1-Komplex schon in Anwesenheit von 4 M Harnstoff teilweise zu einem Oktamer zerfällt, das allerdings unter den gewählten Bedingungen stabil ist und nicht weiter deassembliert. In der Gegenwart von 6 M

Harnstoff liegt der Vipp1-Komplex nahezu vollständig als Oktamer vor. Dies gilt für Vipp1 VI, sowie das C-terminal verkürzte Konstrukt Vipp1_1-219.

In weiteren Versuchen wurde rekombinantes Vipp1 VI und Vipp1_1-219 in einer Zeitreihe unter nativen Bedingungen sowie in Anwesenheit von 6 M Harnstoff mit Trypsin verdaut und über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abb. 15).

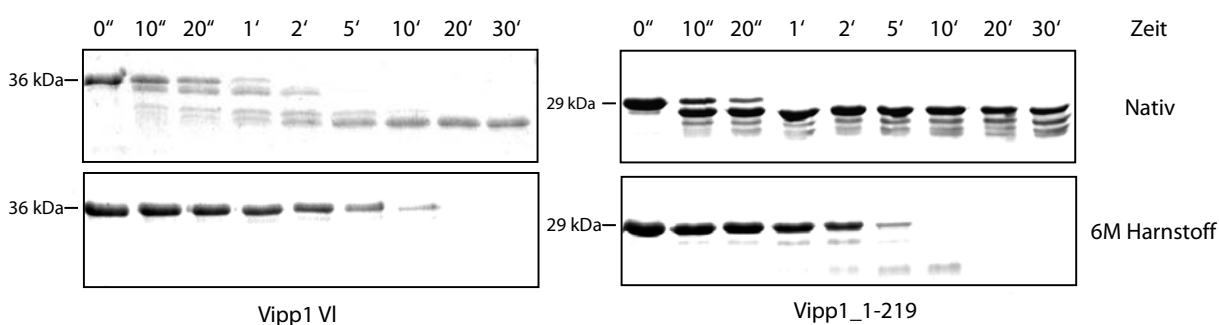


Abbildung 15: Zeitreihe Trypsinverdau von Vipp1 VI und Vipp1_1-219 unter nativen Bedingungen sowie in Anwesenheit von 6 M Harnstoff

Vipp1 VI und Vipp1_1-219 wurden unter nativen Bedingungen oder nach Behandlung mit 6 M Harnstoff mit Trypsin über verschiedene Zeiträume verdaut. Die Analyse der verdauten Proben erfolgte über SDS-PAGE und anschließende Coomassie-Färbung.

Vipp1 VI sowie auch Vipp1_1-219 wurden unter nativen Bedingungen wie erwartet nur teilweise durch Trypsin verdaut. Der Teil des Proteins, der in den Kernkomplex integriert und deshalb vor der Proteolyse geschützt war, konnte in der SDS-PAGE wie bereits gezeigt, als 27 kDa-Fragment detektiert werden (Abb. 13, nativ). Im Gegensatz dazu wurde Vipp1 in Anwesenheit von 6 M Harnstoff komplett verdaut (Abb. 13, 6 M Harnstoff). Etwa 20 min nach der Protease-Zugabe konnte in dem mit Harnstoff behandelten Ansatz keinerlei Protein mehr nachgewiesen werden. Der Verdau des Proteins erfolgte in Gegenwart von Harnstoff wesentlich langsamer, da die Anwesenheit des Harnstoffs offensichtlich kein ideales Milieu für die Enzymaktivität der Protease darstellte. Allerdings ist zu keinem Zeitpunkt ein stabiles, 27 kDa großes, Fragment detektierbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sowohl Vipp1 VI als auch Vipp1_1-219 stabile hochmolekulare Komplexe bilden, die in Anwesenheit von 4 M Harnstoff zumindest teilweise bestehen bleiben. In Gegenwart von 6 M Harnstoff deassemblieren die hochmolekularen Komplexe beider Proteine allerdings vollständig zu

Oktameren, die unter diesen Bedingungen stabil sind und nicht weiter zerfallen. Werden die Vipp1-Oktamere einer Proteolyse mit Trypsin ausgesetzt, so werden sie im Gegensatz zum Vipp1-Komplex allerdings komplett verdaut, was wiederum bestätigt, dass erst die Bildung des hochmolekularen Komplexes das Protein vor einer Zersetzung durch die Protease schützt.

3.3 Interaktion von Vipp1 mit Lipiden

Vipp1 aus Arabidopsis und Erbse wurde in vorangegangenen Arbeiten als Protein beschrieben, das mit der inneren Hüllmembran von Chloroplasten assoziiert ist (Aseeva *et al.*, 2004). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass diese Membrananbindung durch Entfernung der letzten 40 Aminosäuren von Vipp1 nicht beeinflusst wird, allerdings wird angenommen, dass die Komplexbildung des Proteins und dessen Assoziation mit der inneren Chloroplastenmembran in Verbindung stehen. Diese Vermutungen sollten in dieser Arbeit mit rekombinantem Protein überprüft werden.

3.3.1 Proteolytischer Verdau der IE-Vesikel aus Erbsenchloroplasten

Um die Membrananbindung von Vipp1 zu untersuchen, wurde zunächst innere Hüllmembran von Chloroplasten (Inner Envelope, IE-Vesikel) aus Erbse nach der Methode von Waegemann und Soll, (1995) isoliert und anschließend einem proteolytischen Verdau unterzogen. Durch die Behandlung mit Proteasen, die nicht in der Lage sind, die Innere Hüllmembran zu durchdringen oder zu beschädigen, kann die korrekte Orientierung der IE-Vesikel „Right side out“ nachgewiesen werden. Bei einer korrekten Orientierung der Membran-Vesikel sollten von der Proteolyse nur extrinsische Membranproteine des IE, die zum Intermembranraum ausgerichtet sind und Abschnitte von integrierten Membranproteinen, die in den Intermembranraum hineinragen, betroffen sein. Intrinsische Proteinbereiche sind durch ihre Integration in die Membran vor Proteolyse geschützt und ebenfalls dem Stroma zugewandte membranassoziierte Proteine werden nicht verdaut, da sie sich außerhalb der Reichweite der Proteasen in den Vesikeln befinden.

Für den Verdau der inneren Hüllmembran wurde die Protease Thermolysin verwendet, die auch in früheren Untersuchungen häufig eingesetzt wurde, um die Orientierung von an den IE gebundenen Proteinen zu untersuchen (Balsera

et al., 2009, Caliebe *et al.*, 1997, Hörmann *et al.*, 2004). Verdaute sowie unverdaute IE-Vesikel wurden durch SDS-PAGE, Western Transfer und anschließende Immunodekoration mit Antikörpern gegen diverse Markerproteine, deren Orientierung bereits bekannt ist, analysiert (Abb. 16).

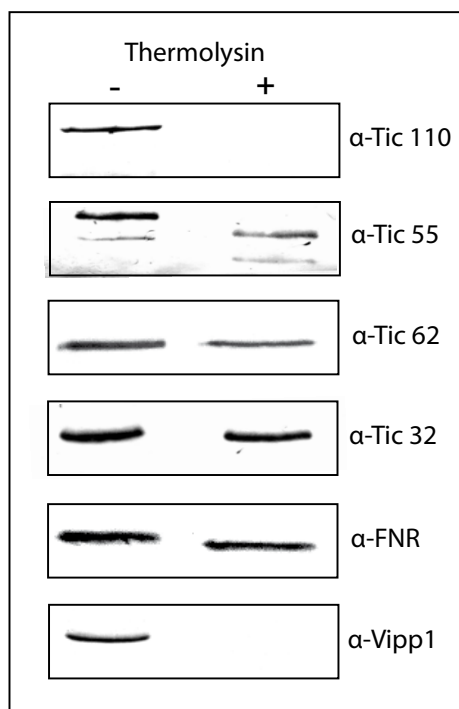


Abbildung 16: Proteaseverdau von isolierten IE-Vesikeln der Chloroplasten aus Erbse

IE-Vesikel aus Erbse wurden mit Thermolysin (1 μg / μg IE) verdaut und anschließend über SDS-PAGE und Western-Transfer anhand von Markerproteinen (Tic110, Tic62, Tic55, Tic32, FNR) analysiert. Es sind die IE-Vesikel vor (-) und nach (+) Thermolysinverdau dargestellt.

Tic110, ein integrales Membranprotein und die größte Untereinheit des Tic-Komplexes, weist verschiedene Bereiche auf, die in den Intermembranraum hineinragen. Das Protein wird durch die Behandlung mit Proteasen an diesen Stellen zu kleineren Fragmenten hydrolysiert (Balsera *et al.*, 2009). Tatsächlich konnte Tic110 nach einer Behandlung des IE mit Thermolysin nicht mehr in seiner Ursprungsgröße nachgewiesen werden (Abb. 16, α -Tic110). Tic55, ebenfalls ein Bestandteil des Tic-Translokons, besitzt zwei Membrandomänen, die über einen dem Intermembranraum zugänglichen Bereich miteinander verbunden sind (Caliebe *et al.*, 1997). Die Behandlung von IE-Vesikeln mit Thermolysin resultierte in der Degradation des Proteins unter Entstehung eines 47 kDa großen Fragments.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Proteolyse resultierte ebenfalls in der Bildung eines verkürzten Abbauprodukts (Abb. 16, α -Tic55). Tic32, Tic62 und auch FNR sind periphere Proteine der inneren Chloroplastenmembran und aufgrund ihrer dem Stroma zugewandten Lokalisation vor einem Abbau durch Proteasen geschützt (Hörmann *et al.*, 2004, Kückler *et al.*, 2002). Sie dienen daher als Negativkontrollen (Abb. 16, α -Tic32, α -Tic62, α -FNR). Ausgehend von den Ergebnissen der Proteasebehandlung kann die Orientierung der isolierten IE-Vesikel „Right side out“ durchaus als korrekt bezeichnet werden.

Vipp1 war nach der Behandlung mit Thermolysin nicht mit einem gegen Vipp1 gerichteten Antikörper nachzuweisen (Abb. 16, α -Vipp1). Dies impliziert eine nahezu vollständige Zersetzung des Proteins durch die verwendete Protease, obwohl der Vipp1-Kernkomplex in vorangegangenen Versuchen als proteasestabil deklariert wurde (siehe Abschnitt 3.2.5 und Aseeva *et al.*, 2004). Der komplette Verdau von Vipp1 lässt sich allerdings mit der in diesem Ansatz verwendeten deutlich höheren Proteasemenge erklären. Es scheint, als sei der Vipp1-Kernkomplex nur in gewissem Maße widerstandsfähig und könne durch eine erhöhte Proteasekonzentration durchaus gespalten werden. Wurden IE-Vesikel allerdings mit Trypsinmengen behandelt, die denen entsprachen, die in Protease-Experimenten mit rekombinantem Protein eingesetzt wurden, so erfolgte der übliche partielle Verdau des Proteins, wie die Entstehung eines verkürzten Degradationsprodukts von Vipp1 verdeutlicht (Daten nicht gezeigt).

Natives Vipp1 reagiert also bei Verdau der inneren Hüllmembran der Chloroplasten sensibel auf die Protease, obwohl bislang von einer Lokalisation des Proteins an der zum Stroma hingewandten Seite ausgegangen wurde (Aseeva *et al.*, 2004). Diese wiederum sollte allerdings mit einem Schutz des Proteins durch die Vesikelbildung des IE einhergehen, wie anhand diverser Markerproteine gezeigt werden konnte (Abb. 14, α -Tic62, α -Tic32, α -FNR). Trotzdem wird Vipp1 von Thermolysin verdaut.

Dieses Ergebnis wirft die Frage auf, ob das Protein wirklich auf der dem Stroma zugewandten Seite der inneren Chloroplastenmembran lokalisiert ist, wie bislang vermutet wurde, oder auf der zum Intermembranraum hingewandten.

3.3.2 Lokalisation von Vipp1 am IE von Chloroplasten

Analysen der Proteinsequenz von Vipp1 aus Erbse, Arabidopsis und Synechocystis lieferten keinerlei Hinweise auf Transmembrandomänen (Li *et al.*, 1994, Westphal *et al.*, 2001b). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Behandlung der IE-Vesikel der Chloroplasten mit Proteasen zum Verdau von Vipp1 führt (siehe Abschnitt 3.3.1, Aseeva *et al.*, 2004). Daher wurde eine periphere Assoziation von Vipp1 mit der inneren Hüllmembran von Chloroplasten vermutet. Um dies zu bestätigen, wurden IE-Vesikel mit 0,5 M NaCl oder 6 M Harnstoff inkubiert. Auf diese Weise behandelte Membranen wurden nach Zentrifugation in lösliche und unlösliche Fraktionen aufgeteilt und mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abb. 17).

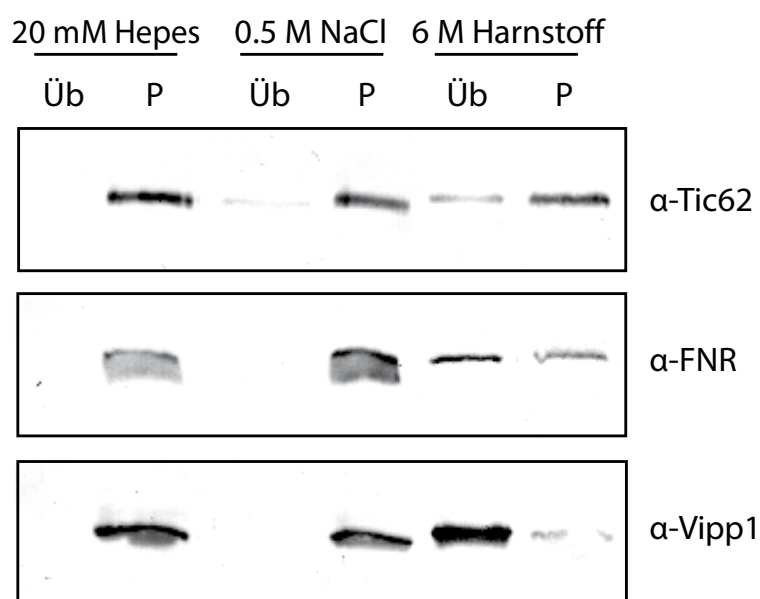


Abbildung 17: Behandlung chloroplastidärer IE-Vesikeln mit Natriumchlorid und Harnstoff

IE-Vesikel aus Erbse wurde mit 0,5 M NaCl oder 6 M Harnstoff behandelt und anschließend in eine lösliche (Üb) und eine Membranfraktion (P) unterteilt. Beide Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE analysiert und das Protein nach Western Transfer mit Antikörpern gegen Tic62, FNR und Vipp1 detektiert.

Diese Methode wurde bereits des Öfteren eingesetzt, um die Lokalisation von Membranproteinen zu identifizieren (Hörmann *et al.*, 2004, Küchler, *et al.*, 2002). Harnstoff ist in der Lage, die Lipid-Doppelschicht der Membranvesikel zu überwinden und kann so Proteine destabilisieren. Integrale Membranproteine wie

Tic110 befinden sich trotz der Behandlung von IE-Vesikeln mit Harnstoff in der Membranfraktion, während viele membranassoziierte Proteine, wie die FNR, nicht mehr an Lipide binden können und daher in die löslichen Fraktion übergehen.

Da Vipp1 als peripheres Membranprotein gilt, wurden Tic62, ein Protein des Tic-Translocons, das peripher an der inneren Hüllmembran von Chloroplasten auf der dem Stroma zugewandten Seite lokalisiert ist und FNR, die über Protein-Protein-Interaktionen an diese Membran gekoppelt ist (Küchler *et al.*, 2002, Stengel *et al.*, 2007), in diesem Versuch zum Vergleich herangezogen. Wurden IE-Vesikel mit 0,5 M NaCl behandelt, so ließen sich Tic62, FNR und Vipp1 nach der Western Blot-Analyse in den Membranfraktionen detektieren, so dass bei allen Proteinen von einer starken Bindung an die Membranvesikel ausgegangen werden kann. Erst die Anwesenheit von 6 M Harnstoff bewirkte, dass Vipp1 nahezu vollständig wie auch der Großteil der FNR in die lösliche Fraktion überging. Tic62 - obwohl kein integrales Membranprotein - war unter diesen Bedingungen, wie in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, hauptsächlich in den Membranfraktionen lokalisiert (Küchler *et al.*, 2002). Durch diese Ergebnisse konnte bestätigt werden, dass natives Vipp1 peripher mit der inneren Hüllmembran des Chloroplasten assoziiert ist.

Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Vipp1 in Anwesenheit von 6 M Harnstoff zu einem Oktamer deassemblierte (siehe Abschnitt 3.2.6). Natives Vipp1 ist in Anwesenheit von 6 M Harnstoff nicht mehr mit der Membran assoziiert, was nahelegt, dass die Komplexbildung für die Membranassoziation essenziell ist, da Vipp1 als Oktamer offensichtlich nicht mehr in der Lage ist, an Membranlipide zu binden.

3.3.3 Interaktion von Vipp1 mit IE-Vesikeln aus Chloroplasten

Domänen, die für die Interaktion von Vipp1 mit der inneren Hüllmembran aus Chloroplasten essenziell sind, wurden in Flotierungsversuchen ermittelt. Zu diesem Zweck wurden das Volllängenprotein, sowie N- und C-terminal verkürzte Konstrukte mit der zuvor mit Thermolysin behandelten inneren Chloroplastenmembran inkubiert und anschließend mit einem Saccharose-Gradienten überschichtet. Nach Zentrifugation wurde der Gradient von oben ausgehend fraktioniert und die einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Vipp1 wurde mit

ERGEBNISSE

einem gegen das Volllängenprotein gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abb. 19).

Die Behandlung der inneren Hüllmembran mit Thermolysin erfolgte aus dem Grund, potentielle proteinäre Interaktionspartner von Vipp1 zu entfernen. In den folgenden Versuchen sollte ausschließlich die Interaktion von Vipp1 mit der Lipid-Doppelschicht untersucht werden.

Zunächst wurde als Kontrolle unverdauter sowie proteolytisch verdauter IE im Saccharose-Gradienten flotiert (Abb. 18). In der mit unbehandelter Hüllmembran durchgeführten Flotierung zeigte sich ein deutliches Protein-Signal für Vipp1 in der Membranfraktion des Gradienten (Abb. 18, - Thermolysin, α -Vipp1, Pfeil), wogegen die mit Thermolysin verdaute Probe in dieser Fraktion lediglich sehr wenig Vipp1-Protein aufwies (Abb. 18, + Thermolysin, α -Vipp1, Pfeil). Als Kontrolle wurde ein Antikörper gegen Tic32 verwendet (α -Tic32). Der Versuch zeigt, dass die innere Hüllmembran bei Zentrifugation im Gradienten nach oben flotiert, gebundenes natives Vipp1 also mit der Membran durch den Gradienten wandert und später in der Membranfraktion des Gradienten detektiert werden kann. Wird das Protein verdaut, ist die Menge des detektierten Vipp1-Proteins in der Membranfraktion erheblich reduziert. Tic32, das von der Protease nicht verdaut wird, ist dagegen sowohl in der unverdauten als auch in der verdauten Membranfraktion vorhanden.

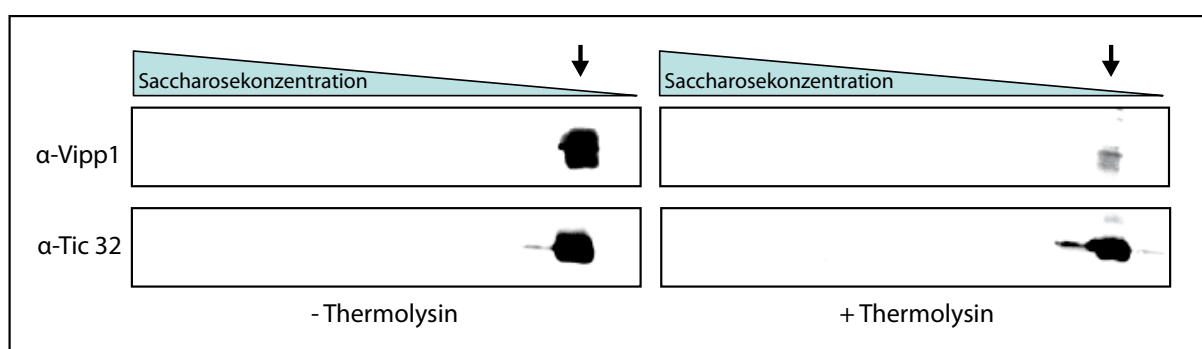


Abbildung 18: Flotierung von unverdauten und verdauten IE-Vesikeln aus Erbse

Verdaute (+ Thermolysin) sowie unverdaute (- Thermolysin) innere Hüllmembran aus Erbse wurde in einem Saccharose-Gradienten flotiert. Die Gradienten wurden anschließend fraktioniert und mittels SDS-PAGE und Western Blot mit Antikörpern gegen Vipp1 und Tic32 analysiert. Der schwarze Pfeil markiert die jeweilige Membranfraktion.

ERGEBNISSE

In der Abbildung 19 sind die verschiedenen Fraktionen der mit rekombinatem Protein durchgeführten Flotierungsversuche gezeigt. Die Flotierungen wurden sowohl mit als auch ohne IE-Vesikel, jedoch immer in Anwesenheit von rekombinatem Protein durchgeführt.

In Abwesenheit der Membranlipide sind alle in den Flotierungsversuchen eingesetzten Proteine ausschließlich im untergeschichteten Auftragsbereich des Gradienten lokalisiert (Abb. 19, - IE-Vesikel). Werden IE-Vesikel hinzugegeben, flotieren im Gradienten sowohl Vipp1-Volllänge, als auch ein um die letzte C-terminale α -Helix verkürztes Vipp1-Konstrukt (Abbildung 19, + IE-Vesikel, Vipp1 VI und Vipp1_1-219). Dies ist deutlich durch ein Proteinsignal in der Membranfraktion (schwarzer Pfeil) zu erkennen. Werden dagegen N-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukte eingesetzt, ist kein Protein in der Membranfraktion (schwarzer Pfeil) identifizierbar (Abb. 19, + IE-Vesikel, Vipp1_21-259 und Vipp1_84-259).

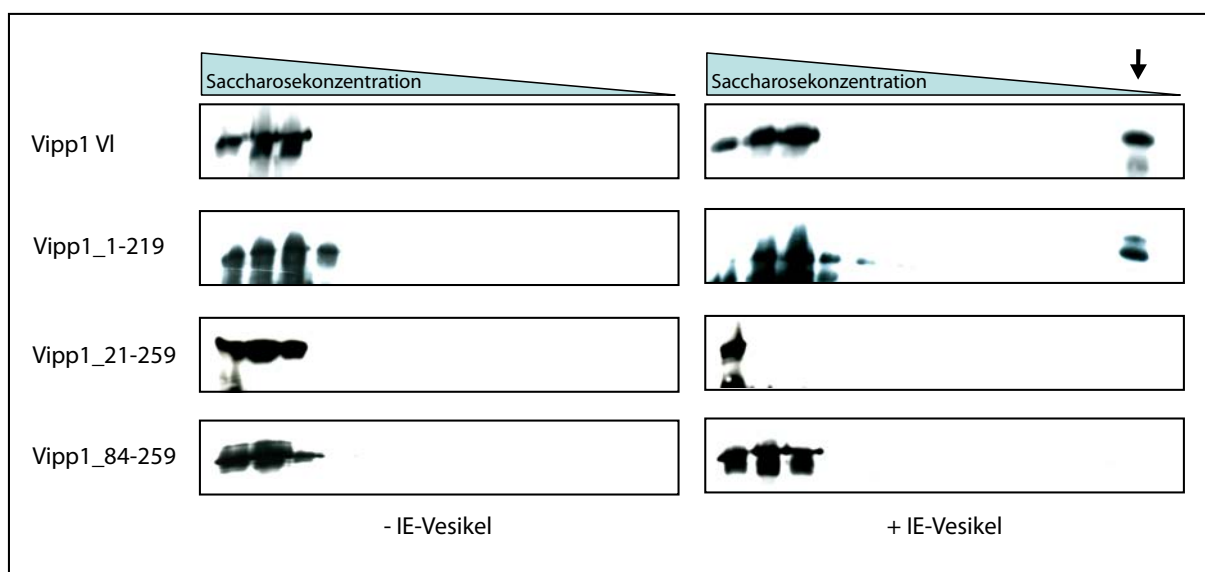


Abbildung 19: Anbindung N- und C-terminal verkürzter Vipp1-Konstrukte an IE-Vesikel

Flotierung von Vipp1 VI sowie diversen N- und C-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukten mit und ohne innere Hüllmembran (IE-Vesikel). Analyse der gesammelten Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem Antikörper gegen Vipp1. Der schwarze Pfeil markiert die Fraktion, in der die Membranvesikel lokalisiert sind.

Da die Flotierungsversuche mit zuvor proteolytisch verdauten Membranvesikeln durchgeführt wurden, lässt sich die Aussage treffen, dass in der Membran lokalisierte Interaktionsproteine für die Anbindung von Vipp1 an Membranlipide der

inneren Hüllmembran nicht nötig sind, sondern Vipp1 vielmehr fähig ist, direkt an Lipide zu binden. Die Interaktion von Vipp1 mit Lipiden korreliert möglicherweise mit der Assemblierung zu einem 2 MDa-Komplex, da N-terminal verkürzte Proteine, die nicht in der Lage sind, diesen Komplex zu bilden, ebenfalls nicht an die innere Membran des Chloroplasten binden können, C-terminal verkürzte Konstrukte dagegen schon. Aus den Flotierungsversuchen geht deutlich hervor, dass die erste α -Helix für die Anbindung des Proteins an Membranlipide essenziell ist. Ob sie direkt für die Interaktion verantwortlich ist oder nur indirekt über die Komplexbildung eine Rolle spielt, soll durch weitere Untersuchungen belegt werden.

3.3.4 Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie

Das Prinzip der Fourier-Transform Infrarotspektroskopie (FTIR-Spektroskopie) besteht darin, dass elektromagnetische Strahlung im infraroten Bereich in der Lage ist, in Molekülen Vibrationsschwingungen anzuregen. Dabei kommt es an den Stellen der Eigenfrequenz dieser Schwingungen zur Absorption der Energie der elektromagnetischen Strahlung, was die Erstellung eines IR-Absorptionsspektrums ermöglicht. Die Spanne des mittleren IR, in dem in der Regel die Spektroskopie molekulspezifischer Schwingungsbanden erfolgt, reicht von 2,5 μm bis 25 μm . Dabei wird die Energie der elektromagnetischen Strahlung über den reziproken Wert der Wellenlänge, die Wellenzahl (ν) definiert. Im mittleren Infrarotbereich werden so Schwingungs-Rotationsübergänge zwischen 400 und 4000 cm^{-1} erfasst. Viele der auftretenden Absorptionsbanden sind auf funktionelle Gruppen in Molekülen zurückzuführen. Die auftretenden IR-Banden dieser Gruppen, die auch als Gruppenfrequenzen bezeichnet werden, ermöglichen die Identifizierung der Substanzklassen von Molekülen. Da mit dieser Technik also eine direkte Aussage über die Existenz infrarotaktiver funktioneller Gruppen von Molekülen getroffen werden kann, eignet sich die Methode gut zur Analyse von Protein-Lipid-Wechselwirkungen.

In *E. coli* exprimiertes Vipp1 sollte zunächst auf Interaktionen mit bakteriellen Lipiden untersucht werden. Die Technik der FTIR-Spektroskopie wurde eingesetzt, um Lipide, die aufgrund einer Wechselwirkung zusammen mit rekombinantem Vipp1 aufgereinigt werden konnten, zu identifizieren.

Mittels der Infrarotstrahlung werden unterschiedliche Schwingungen in Lipidmolekülen angeregt und damit erfasst. Die C-H Streckenschwingungen der Lipid-Acylketten treten beispielsweise im spektralen Bereich von $3000 - 2850 \text{ cm}^{-1}$ auf. Diese Schwingungen werden vorrangig durch Lipide verursacht, die aufgrund der Kettenlänge ihrer Fettsäuren (vorwiegend C:16, C:18) hohe Absorptionen in diesem Abschnitt zeigen. Antisymmetrische Methylenschwingungen können in einem Bereich bei $2916 - 2936 \text{ cm}^{-1}$ beobachtet werden, symmetrische bei $2843 - 2863 \text{ cm}^{-1}$. Charakteristisch für Lipide ist ebenso die bei $1730 - 1740 \text{ cm}^{-1}$ auftretende C=O Schwingung der Estercarbonylgruppe.

In der FTIR-Spektroskopie wurde rekombinantes, zuvor über Ni^{2+} -NTA-Sepharose aufgereinigtes Protein eingesetzt. In Abbildung 20 sind die IR-Spektren von Vipp1 VI sowie eines N-terminal (Vipp1-21-259) und eines C-terminal (Vipp1_1-219) verkürzten Konstrukts dargestellt. Es ist nicht das gesamte IR-Spektrum gezeigt, sondern vielmehr zwei ausgewählte Ausschnitte, die Bereiche der Wellenzahlen $3100 - 2650 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 20A), sowie $1780 - 1500 \text{ cm}^{-1}$ (Abb. 20B) erfassen. Diese Bereiche wurden bewusst ausgewählt, weil sie Abschnitte des Spektrums wiedergeben, die für die Detektion der Lipide von Bedeutung sind, da die funktionellen Gruppen der Lipide in diesen Bereichen absorbieren. In dem von Vipp1 VI erstellten Spektrum treten zwei Banden auf, die von Absorptionen elektromagnetischer Strahlung durch Acylketten zeugen (Abb. 20A). Dabei weist eine Bande ein Absorptionsmaximum bei etwa 2925 cm^{-1} (antisymmetrische Methylenschwingung) auf, ein weiterer Höchstwert lässt sich bei etwa 2855 cm^{-1} (symmetrische Methylenschwingung) verzeichnen (gestrichelte Linien). Beide Banden konnten ebenfalls in einem IR-Spektrum beobachtet werden, das mit dem Konstrukt Vipp1_1-219 erstellt wurde, was auf die Anwesenheit von Lipiden in beiden Proben schließen lässt. Der Bereich des Spektrums, der für die Absorption der Estercarbonylgruppen von Lipiden charakteristisch ist (Abb. 20B, $1730 - 1740 \text{ cm}^{-1}$), zeigte ebenfalls sowohl bei Vipp1 VI als auch bei Vipp1_1-219 eine Absorption, was die Präsenz von Lipiden in diesen Proben bestätigte.

Wurden Vipp1 VI und Vipp1_1-219 vor den IR-Messungen zur Kontrolle mit dem Enzym Lipase behandelt, das die Esterbindungen von Triglyceriden spaltet, änderte sich das Spektrum deutlich (Abb. 20A/B, + Lipase). So waren beispielsweise in den Abschnitten des Spektrums, in denen mit unbehandeltem Volllängenprotein die charakteristische Absorption der Acylketten erfolgte, (Abb. 20A, Vipp1 VI + Lipase) keine spezifischen Banden mehr zu detektieren. Bei dem mit Lipase behandelten C-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukt (Abb. 20, Vipp1_1-219 + Lipase, 3000 - 2850 cm^{-1}) war die Absorption der beiden Maxima (2916 – 2936 cm^{-1} , 2843 - 2863 cm^{-1}) immerhin erheblich reduziert. Ein Rückgang der Absorption in Abhängigkeit vom Lipidverdau zeigte sich ebenfalls im Absorptionsbereich der Ester-Carbonylgruppe für beide Proteine (Abb. 20B, Vipp1 VI + Lipase, Vipp1_1-219 + Lipase). Die Minimierung der Absorption von Acylketten bzw. Ester-Carbonylgruppen im IR-Spektrum durch die Behandlung der Proteine mit Lipase bestätigt die Spezifität der mit unbehandelten Proteinen gemessenen Lipidsignale. Im IR-Spektrum des Vipp1-Konstrukts mit einem verkürzten N-Terminus (Vipp1_21-259) wurden dagegen weder Lipid-spezifische Banden im Absorptionsbereich der Acylketten (Abb. 20A, Vipp1_21-259) noch der Ester-Carbonylgruppen detektiert (Abb. 20B, Vipp1_21-259), was die These stützt, dass dieser Bereich von Vipp1 direkt oder indirekt mit der Lipidbindung in Verbindung steht (siehe auch Abschnitt 3.3.3).

Proteine verursachen durch Schwingung der Peptidbindung zwei sehr prominente Banden: die Amid I –Bande (zwischen 1700 und 1600 cm^{-1}), die auf C = O Schwingungen zurückgeht und die Amid II –Bande (zwischen 1600 und 1500 cm^{-1}), die hauptsächlich durch N - H und C - N Schwingungen erzeugt wird. Vor Allem die Amid I-Bande wird häufig zur Analyse der Sekundärstruktur von Proteinen herangezogen, da ihre Form und Lage im Spektrum sehr charakteristisch für die Struktur des untersuchten Proteins ist und damit die Bestimmung der prozentualen Zusammensetzung seiner Sekundärstrukturelemente (α -Helix, β -Faltblatt, Random Coil) und die Erkennung von Konformationsänderungen ermöglicht. Jegliche Modifikation der Proteinstruktur zeigt sich als spezifisches Absorptionssignal in der Amid I- Bande.

ERGEBNISSE

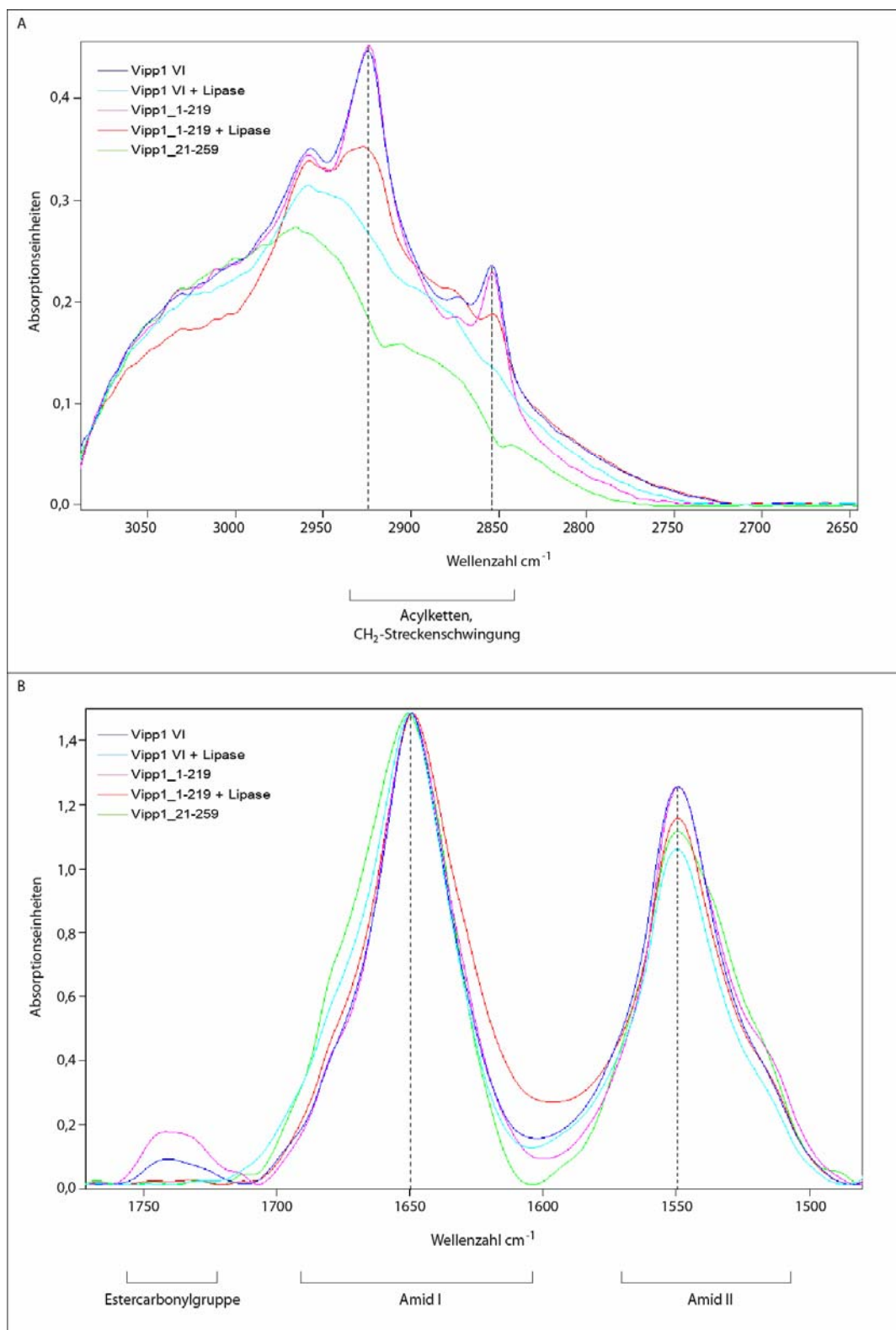


Abbildung 20: Infrarot-Spektren von Vipp1 VI, sowie N- und C-terminal verkürzten Konstrukten mit und ohne Lipase

Vipp1 VI, sowie N- (Vipp1_21-259) und C-terminal (Vipp1_1-219) verkürzte Konstrukte wurden mittels FTIR-Spektroskopie analysiert. Vipp1 VI und Vipp1_1-219 wurden jeweils mit und ohne Lipase in die Spektroskopie eingesetzt. (A) Spektraler Bereich von 3100 – 2650 cm^{-1} . (B) Spektraler Bereich von 1800 – 1500 cm^{-1} .

Wie sein Homolog PspA weist auch Vipp1 eine vorwiegend α -helikale Struktur auf, die typisch ist für Proteine, die hochmolekulare Komplexe bilden (Li *et al.*, 1994). Mit dem IR-Absorptionsspektrum lässt sich von der Amid I-Bande ausgehend die weitgehend α -helikale Struktur aller in der FTIR-Spektroskopie analysierten Vipp1-Proteinvarianten bestätigen. Die Amid I-Bande im IR-Spektrum weist für alle untersuchten Vipp1-Proteine ein Absorptionsmaximum von 1650 cm^{-1} auf und zeigt zudem eine gleichmäßige Form (Abb. 20, Amid I-Bande, gestrichelte Linie), was für α -helikale Strukturen charakteristisch ist. Bei einem N-terminal verkürzten Vipp1-Konstrukt (Vipp1_21-259) lässt sich allerdings feststellen, dass die Amid I-Absorptionsbande mit zunehmender Wellenzahl eine Schulter aufweist, die in der zweiten Ableitung des Spektrums (nicht gezeigt) auf einen deutlich ansteigenden Anteil von unstrukturierten Bereichen mit zunehmender N-terminaler Verkürzung des Proteins hindeutet. Dies ist wohl darauf zurückzuführen, dass durch die Entfernung von α -Helices in verkürzten Vipp1-Konstrukten deren Anteil im Protein reduziert wird und andere Sekundärmerkmale des Proteins im Spektrum deutlicher in den Vordergrund treten. Eine C-terminale Verkürzung des Proteins schlägt sich im Gegensatz dazu nicht im Absorptionsspektrum nieder, was damit erklärt werden kann, dass dem Konstrukt Vipp1_1-219 nicht nur die letzte α -Helix fehlt, sondern ebenfalls ein längerer unstrukturierter-Bereich (Random Coil), der die letzte α -Helix mit dem Rest des Proteins verbindet. Aus diesem Grund ist das α -Helikale Verhältnis vermutlich weiterhin ausgeglichen und lässt keine Veränderung im Spektrum erkennen.

Die Anbindungsversuche von Vipp1 an IE und die Analysen von Vipp1-Proteinen mittels FTIR-Spektroskopie zeigen unabhängig voneinander, dass Vipp1 eindeutig in der Lage ist, stabil Lipide zu binden. Vipp1 interagiert mit Lipiden des chloroplastidären Inneren Envelops und ist darüber hinaus ebenfalls in der Lage, bakterielle Lipide zu binden und diese Assoziation über diverse Reinigungsschritte hinweg aufrechtzuerhalten. Es konnte in diesem Versuchsteil belegt werden, dass die letzten 40 C-terminalen Aminosäuren des Proteins für dessen Assoziation mit Lipiden keine Rolle spielen. Des Weiteren zeigte sich sowohl in den Flotationsversuchen mit IE-Vesikeln als auch in der IR-Spektroskopie, dass der ersten N-terminalen α -Helix eine essenzielle Funktion in der Lipidinteraktion des Proteins zu-

kommt. Es bleibt zu klären, ob diese α -Helix direkt über eine Bindestelle an der Lipidbindung des Proteins beteiligt ist, oder ob sie über die Komplexbildung des Proteins eine eher sekundäre Rolle spielt. Zusätzlich konnte in den FTIR-Untersuchungen die weitgehend α -helikale Struktur von Vipp1 und seinen verkürzten Konstrukten bestätigt werden.

3.4 Funktion der C-terminalen Domäne von Vipp1

Vipp1 und sein Homolog PspA zeigen eine ähnliche Sekundärstruktur, die hauptsächlich α -Helices aufweist (siehe Einleitung) und beide Proteine sind in der Lage, zu hochmolekularen Homooligomeren zu assemblieren. Vipp1 unterscheidet sich von PspA allerdings durch eine C-terminale Verlängerung von 30 - 40 Aminosäuren, die in allen Vipp1-Proteinen vorkommt, PspA aber fehlt. Dieser „C-Terminus“ des Proteins beinhaltet eine α -Helix, die über eine längere unstrukturierte Domäne (Random Coil) mit dem N-terminalen, PspA-ähnlichen Bereich des Proteins verbunden ist. Vipp1 hat sich aus PspA vermutlich durch Genduplikation entwickelt (Westphal *et al.*, 2001b). Während in Cyanobakterien häufig sowohl Vipp1 als auch PspA vorkommen, kann in Chloroplasten von höheren Pflanzen allein Vipp1 detektiert werden, wo dem Protein bei der Ausbildung der Thylakoidmembranen der Chloroplasten eine wichtige Bedeutung zukommt (Kroll *et al.*, 2001). Da die C-terminale Domäne von Vipp1 einen offensichtlichen strukturellen Unterschied zu PspA darstellt, lag die Vermutung nahe, dass dieser Bereich eine mehr oder weniger essenzielle Rolle bei der neuen Funktion des Vipp1-Proteins in den Chloroplasten höherer Pflanzen spielt. Deshalb war auch für diese Arbeit die Entschlüsselung der Funktion des Vipp1 C-Terminus von großem Interesse. Allerdings konnte die Relevanz dieser Domäne bei keiner Eigenschaft von Vipp1 nachgewiesen werden, die bislang bekannt und offensichtlich für die Funktion des Proteins von Bedeutung ist (Komplexbildung, Lipidanbindung). Dennoch stellt der C-Terminus ein charakteristisches Strukturmerkmal von Vipp1-Proteinen dar, das untersucht werden soll.

3.4.1 Komplementation von Vipp1-Mutanten mit Vipp1_1-219

Eine Möglichkeit, die Funktion bestimmter Domänen von Proteinen zu analysieren besteht darin, Proteinvarianten in einer ‚knock-out‘ Mutante zu exprimieren und eventuelle phänotypische Veränderungen zu untersuchen. Viele bisherige Untersuchungen zur Funktion von Vipp1 wurden allerdings bisher mit einer Mutante durchgeführt, die durch eine Unterbrechung in der Promotorregion des Vipp1-Gens zwar einen drastisch reduzierten Vipp1-Anteil aufweist, jedoch noch etwa 20 % des Wildtyp-Gehaltes von Vipp1 exprimieren kann. Eine erst seit kurzem zur Verfügung stehende, vollständige Vipp1-Knockout-Mutante ($\Delta vipp1$), die durch eine TDNA-Insertion im dritten Exon des Vipp1-Genes charakterisiert ist (Abb. 21A), stellt hingegen eine gute Möglichkeit dar, um solche Funktionsanalysen durchzuführen. Dazu sollte im genetischen Hintergrund dieser Mutante ein C-terminal verkürztes Vipp1-Konstrukt (Vipp1_1-219) exprimiert werden, um aufgrund eines möglichen Phänotyps die Aufgabe der C-terminalen, Vipp1-spezifischen Verlängerung ableiten zu können.

Zunächst wurden PCR-Analysen mit diversen Primerkombinationen durchgeführt, um sowohl die Insertion der TDNA als auch des 35S::Vipp1_1-219-Konstrukts in den untersuchten Pflanzen zu bestätigen. Es wurde zu diesem Zweck drei verschiedene Primerpaare verwendet, mit denen das Wildtypallel, die das Vipp1 Gen unterbrechende TDNA und das 35S::Vipp1_1-219-Konstrukt (soweit vorhanden) nachgewiesen werden konnten. Mit von Wildtyp-Pflanzen isolierter DNA konnte in der PCR wie erwartet nur das Vipp1-Wildtyp-Allel amplifiziert werden (Abb. 21B, Wt 1-3). Im Gegensatz dazu ließ sich bei der Vipp1-Mutante die Homozygotie für die TDNA-Insertion dadurch bestätigen, dass zwar Bereiche der TDNA amplifiziert werden konnten, nicht aber das Wildtyp-Allel (Abb. 21B, $\Delta vipp1$, 1 + 2). In der PCR einer Vipp1-Knockout-Mutante, die zusätzlich das C-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukt aufwies ($\Delta vipp1$ + Vipp1_1-219), ließ sich ebenfalls kein Wildtyp-Allel amplifizieren (Abb. 21B, $\Delta vipp1$ + Vipp1_1-219), was beweist, dass die Mutante homozygot ist für die TDNA-Insertion. Hingegen konnte die Insertion von 35S::Vipp1_1-219 nachgewiesen werden (Abb. 21B, $\Delta vipp1$ + Vipp1_1-219), was nahe legt, dass es sich hierbei um den gewünschten Pflanzentyp handelt.

ERGEBNISSE

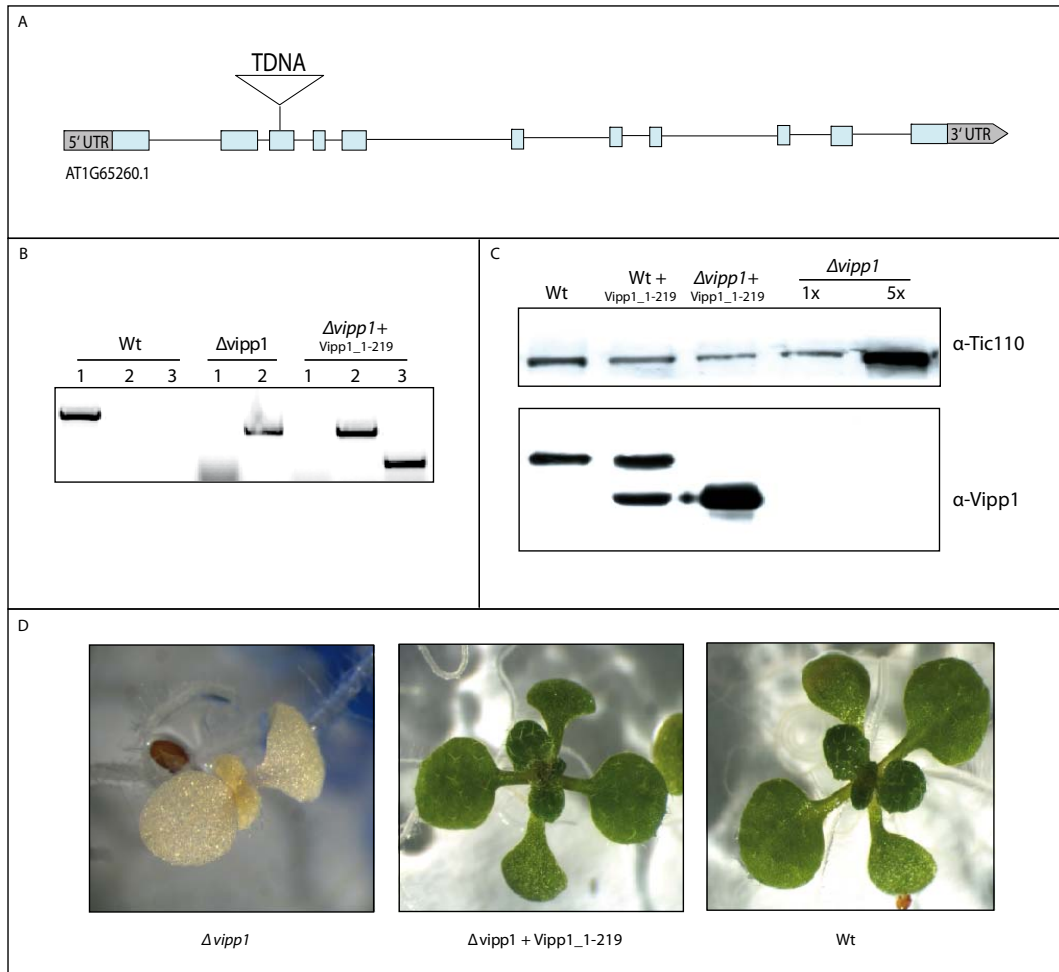


Abbildung 21: Expression von Vipp1_1-219 im Hintergrund der homozygoten Vipp1-Knock Out-Mutanten $\Delta vipp1$

(A) Lage der TDNA-Insertion im Vipp1-Gen (At1g65260.1) (B) PCR-Analyse der Vipp1-Knock-Out-Mutanten ($\Delta vipp1$), sowie der mit Vipp1_1-219 komplementierten Mutanten ($\Delta vipp1 + Vipp1_{1-219}$) und dem Wildtyp (Wt); Die PCR wurde mit drei Primern durchgeführt, mit denen folgende Bereiche (soweit vorhanden) amplifiziert werden konnten: 1: Wildtyp-Allel, 2: TDNA-Insertion, 3: 35S::Vipp1_1-219-Insertion (C) SDS-PAGE-Analyse mit Pflanzenextrakten. Wt: Wildtyp, Wt + Vipp1_1-219: Wildtyp, in dessen Hintergrund das Konstrukt Vipp1_1-219 exprimiert wurde, Re: mit dem Konstrukt Vipp1_1-219 komplementierte Vipp1-Mutante, $\Delta vipp1$: homozygote Vipp1-Mutante. Vipp1 mit einem gegen Vipp1 gerichteten Antikörper nachgewiesen (α -Vipp1). Als Ladekontrolle wurde Tic110 verwendet (α -Tic110). (D) Vergleich der homozygoten Vipp1-Knockout-Mutanten ($\Delta vipp1$), einer mit dem Konstrukt Vipp1_1-219 komplementierten Vipp1-Knockout-Mutante ($\Delta vipp1 + Vipp1_{1-219}$) und dem Wildtyp (Wt).

Vipp1-Mutanten, die keinerlei Vipp1 exprimieren können, zeigen einen albinotischen Phänotyp (Abb. 21D, $\Delta vipp1$). Dieser ähnelt dem für die Promotormutante beschriebenen Phänotyp (Kroll *et al.*, 2001), welcher hier nur entsprechend stärker ausgeprägt ist. Die Pflanzen sind unter autotrophen Bedingungen nicht lebensfähig und auch auf zuckerhaltigen Medien erreichen sie nur das in Abb. 21 dargestellte Stadium. Wurde das um den C-Terminus von Vipp1 verkürzte Konstrukt in

diesen Mutanten exprimiert, so konnte kein offensichtlicher Unterschied zwischen dem Wildtyp und den mit Vipp1₁₋₂₁₉ komplementierten Vipp1-Mutanten detektiert werden (Abb. 21D, $\Delta vipp1 + Vipp1_{1-219}$). Die Pflanzen, welche Vipp1₁₋₂₁₉ exprimieren, unterschieden sich weder in der Größe, noch in Form oder der Färbung von den Wildtyppflanzen (Wt). Dies lässt vermuten, dass Vipp1 auch ohne die C-terminale Domäne im Wesentlichen seine Funktion für die Thylakoidbiogenese erfüllen kann. Eventuell gibt eine detaillierte Untersuchung auf zellulärer Ebene mittels TEM-Analyse Aufschluss über Änderungen z.B. der Thylakoidstruktur. Möglicherweise lässt sich auch durch die Veränderung der Umgebungsverhältnisse ein Phänotyp erzielen, allerdings konnte unter den in diesem Versuch verwendeten Bedingungen kein Hinweis auf eine essenzielle Funktion der C-terminalen Domäne ermittelt werden.

3.4.2 Interaktion des Vipp1 C-Terminus mit cpHsp70

Pull down-Assays werden häufig eingesetzt, um Interaktionen zwischen Proteinen nachzuweisen. Da die Identifikation von Interaktionspartnern oft hilfreich ist, um die Funktion eines Proteins zu entschlüsseln, sollten in diesem Arbeitsteil mithilfe eines Pull down-Assays Interaktionspartner von Vipp1 aufgereinigt und analysiert werden. Die C-terminale Domäne von Vipp1, die nicht zur Oligomerisierung benötigt wird und darüber hinaus offensichtlich nicht in den Protein-Kernkomplex integriert ist (siehe Abschnitt 3.2.5 und Aseeva *et al.*, 2004) sondern sich außerhalb des Oligomers befindet, stellt aufgrund ihrer Lokalisation eine potentielle Bindestelle für Interaktionsproteine dar. Da es bislang keine Anhaltspunkte dafür gibt, welche Rolle diesem Bereich des Proteins in der Vipp1-Funktion zukommt, wäre die Identifikation von Proteinen, die mit der C-terminalen Vipp1-Domäne assoziiert sind, sehr hilfreich für die Aufklärung dieser Fragestellung.

Interaktionspartner von Vipp1, die an den C-Terminus (V_{C-term}) des Proteins binden, sollten mit einem Pull down-Assay identifiziert werden. Die Gensequenz von V_{C-term} wurde zu diesem Zweck in einen Vektor kloniert, der das Protein bei Expression über einen Polylinker mit Protein A fusionierte. Das in *E. coli* exprimierte Fusionsprotein konnte nun an die Säulenmatrix, in diesem Fall IgG-Sepharose, gekoppelt und mit potentiellen Interaktionspartnern inkubiert werden. Die Pull down-Experimente wurden zunächst mit stromalen Proteinen aus Arabidopsis

ERGEBNISSE

durchgeführt, da die Lokalisation von Vipp1 an der inneren Hüllmembran des Chloroplasten nachgewiesen werden konnte (Aseeva *et al.*, 2004) und eine dem Stroma zugewandte Ausrichtung des Proteins als logisch galt. Spezifisch an V_{C-term} gebundenes Protein wurde mit 0,3 M Essigsäure (pH 3,4) von der Säule eluiert und nach SDS-PAGE durch eine Silberfärbung detektiert (Abb. 22).

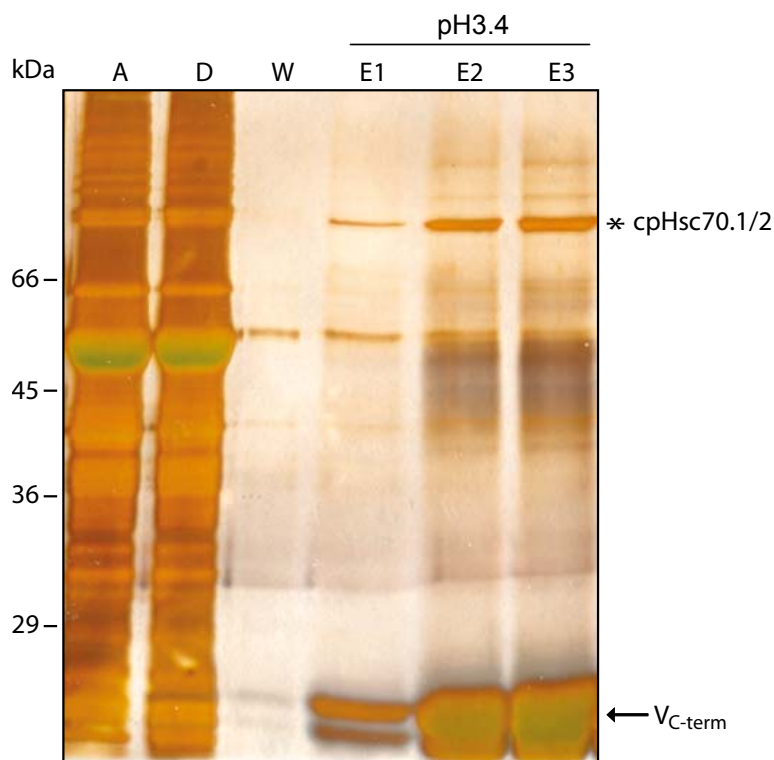


Abbildung 22: Pull down-Assay mit V_{C-term} an IgG-Sephrose

Der Pull down-Assay wurde mit stromalen Proteinen aus *A. thaliana* durchgeführt. Nach der Elution mit 0,3 M HAc, pH 3.4 erfolgte die Analyse der eluierten Proteine mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. (A: Auftrag, D: Durchlauf, W: Wasch, E1 - 3: Eluate)

Auf diese Weise konnte eine spezifische Proteinbande mit einer Größe von etwa 70 kDa identifiziert werden (Sternchen). Massen-Spektrometrische (MS) Analysen ergaben, dass es sich bei diesem Protein um zwei im Stroma von Chloroplasten lokalisierte Hsp70-Homologe, cpHsc70.1 und cpHsc70.2 aus *A. thaliana* handelte. Mitglieder der „Heat Shock Protein“ (Hsp) -Familie erfüllen wichtige Funktionen in der Proteinfaltung, Proteintranslokation und Stressantwort von nahezu allen Organismen und sind darüber hinaus in fast allen subzellulären Kompartimenten vertreten.

ERGEBNISSE

cpHsc70-1	MASSAAQIHVLGGIGFAS S--SSSKRNLNKGGTFMPRSFAFFGTRTGPSTPTSAFLRMG	5 8
cpHsc70-2	MASSAAQIHLGGIGFNPNSFCSSSTKNLNDKNTN S-I PRS VVF GNRTSPFSTPTSAFLRMG	5 9
*****:*****_* *_:*. * . : :*. * * . * . *****		
cpHsc70-1	TRNGGASRYAVGPVRRVNEKVVGIDLGTNSAVAAMEGGKPTIVTNAEQ R ^{TPSVVAY}	118
cpHsc70-2	RRNNN-ASRYTVGPVRRVNEKVVGIDLGTNSAVAAMEGGKPTIVTNAEQ R ^{TPSVVAY}	118
*_ . * ***:*****:*****		
cpHsc70-1	TKSGDRLVGQIAKRQAVVNPENTFFSVKRFGRKMNEVDEESKQVSYRVRDINNPKLE	17 8
cpHsc70-2	TKSKDRLVGQIAKRQAVVNPENTFFSVKRFGR ^{RMNEVAEESKQVSYRVIKDENG} NV KLD	178
*** *****:*****:*****:*****:*****:		
cpHsc70-1	CPAINKQFAAEEISAQVLRKLVDDAS R ^{FLN} DKVTKAVITVPAYFNDSQRTATKDAGR ^{IAG}	238
cpHsc70-2	CPA ^{IAG} KQFAAEEISAQVLRKLVDDAS R ^{FLN} DKVTKAVITVPAYFNDSQRTATKDAGR ^{IAG}	238
****_*****:*****:*****:*****:*****:*****		
cpHsc70-1	LEVLRIINEPTAASLAYGFRKANETILVFDLGGGTFDVSLEVGDGVFEVLSTSGDTHL	29 8
cpHsc70-2	LEVLRIINEPTAASLAYGF ^{ER} KSNETILVFDLGGGTFDVSLEVGDGVFEVLSTSGDTHL	29 8
*****:****:*****:*****:*****:*****		
cpHsc70-1	GGDDFDKRVVDLAAEFK ^{KDE} GIDLLKDKQALQRLTEAAEKAKIELSSLTQTNMSLPFIT	35 8
cpHsc70-2	GGDDFDKRVVDLAAEFK ^{KDE} GIDLLKDKQALQRLTEAAEKAKIELSSLTQTNMSLPFIT	35 8
*****: *****:*****:*****:*****:*****		
cpHsc70-1	ATADGPKH ^{IE} TTLTRAKFEELCDLLDRVTPVENS ^{LRD} AKLSFKD ^{IDE} VILVGGSTRIP	418
cpHsc70-2	ATADGPKH ^{IE} TTLTRGKFEE ^{LC} SDLLDRVTPVENS ^{LRD} AKLSFKD ^{IDE} VILVGGSTRIP	418
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
cpHsc70-1	AVQELVRKVTGKEPNVTVNPDEVVALGAAVQAGVLAGDVSDIVLLDVTPLSIGLET ^{LG} GV	47 8
cpHsc70-2	AVQDLVRKLTGKEPNVSVNPDEVVALGAAVQAGVLAGDVSDIVLLDVTPLSIGLET ^{LG} GV	47 8
:*:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
cpHsc70-1	MTKII PRNTT ^L PTSKSEV ^F STAADGQT ^S VEINVL ^Q GE REFV ^R DNKSLG ^S FR ^{LD} GIP ^{PA} PR	538
cpHsc70-2	MTKII PRNTT ^L PTSKSEV ^F STAADGQT ^S VEINVL ^Q GE REFV ^R DNKSLG ^S FR ^{LD} GIP ^{PA} PR	538
*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****:*****		
cpHsc70-1	GVPQIEV ^K FDIDANGILSVSAVDKGTGKKQDITITGASTLPKDEVDQMVQEAERFAK ^{DD} K	59 8
cpHsc70-2	GVPQIEV ^K FDIDANGILSVSASDQGTGKKQDITITGASTLPKDEVDQMVQEAERFAK ^{DD} K	59 8
*****:*****_*:*****:*****:*****_*:***		
cpHsc70-1	EKRDAIDTKN ^Q ADSVVYQTEKQLKELGE KIPGEVKEKVEAKLQELKDKIGSGSTQEI ^{KD} A	65 8
cpHsc70-2	EKRDAIDTKN ^Q ADSVVYQTEKQLKELGE KIPGPVKEKVEAKLQELKEKIASGSTQEI ^{KD} T	65 8
*****:*****:*****_*:*****_*:*****_*:*****_*:*****_*:*****_*:*****_*:*****_*		
cpHsc70-1	MAALNQEV ^M QIGQSLYNQPAGGPGAGPSPGGEGASSG D--SSSSKGGD-GDDVIDAD ^{FT} D	71 6
cpHsc70-2	MAALNQEV ^M QIGQSLYNQPQPG G--ADSPPGGEASSSDTS ^{SAK} G ^{GG} NGGVD ^{ID} AD ^{FT} D	71 6
*****:*****_*_* *_ . * . . ***:*. * * * * * * * . *****		
cpHsc70-1	SQ	718
cpHsc70-2	SN	718
*:		

Abbildung 23: Sequenzvergleich der beiden mittels Massen-Spektrometrie identifizierten Hsp70-Homologe aus *A. thaliana*

Alignment der beiden mittels MS-Analyse identifizierten Hsp70-Homologe aus *A. thaliana*. Farblich markierte Bereiche stellen die jeweiligen durch MS identifizierten Peptide dar (cpHsc70.1: grün, cpHsc70.2: rot).

Ein mit dem Programm Clustal W (Jeanmougin *et al.*, 1998) erstelltes Alignment zeigt den Sequenzvergleich der beiden in den MS-Analysen identifizierten Hsp70-Homologe (Abb. 23). Die ermittelten Peptidsequenzen sind dabei farblich markiert. CpHsc70.1 und cpHsc70.2 weisen eine hohe Homologie auf, trotzdem konnten in den MS-Analysen eindeutig beide Proteine nachgewiesen werden. Sowohl für Hsc70.1 als auch für Hsc70.2 wurden Peptidsequenzen von Bereichen identifiziert,

ERGEBNISSE

in denen sich die beiden Chaperone unterscheiden (Hsc70.2: AS 177 - 184, AS 244 - 259; Hsc70.1: AS 374 - 386, AS 417 - 426).

Um zu überprüfen, ob es sich zwischen den beiden stromalen Chaperonen und V_{C-term} tatsächlich um eine spezifische Interaktion handelt, wurden die Pull down-Assays mit rekombinantem Hsc70 wiederholt. Hierzu wurde cpHsc70.2 zunächst in *E. coli* exprimiert, über Ni^{2+} -NTA-Sepharose aufgereinigt und anschließend in den Pull down-Assay eingesetzt. Da bekannt ist, dass Hsp70-Chaperone ihre Substrate abhängig vom Nukleotidstatus binden (Gassler *et al.*, 2001, Mayer und Bukau, 2005, McCarty *et al.*, 1995), wurden die Pull down-Assays sowohl in An-, als auch in Abwesenheit von 2.5mM ATP durchgeführt (Abb. 24). Um das ATP zuverlässig aus dem Ansatz zu entfernen, wurde Apyrase verwendet, ein Enzym, das ATP und ADP zu AMP und anorganischem Phosphat hydrolysieren kann. Spezifisch gebundenes Protein wurde wie zuvor beschrieben eluiert und anschließend nach SDS-PAGE und Western-Transfer mit einem gegen cpHsc70.2 gerichteten Antikörper nachgewiesen (Abb. 24A).

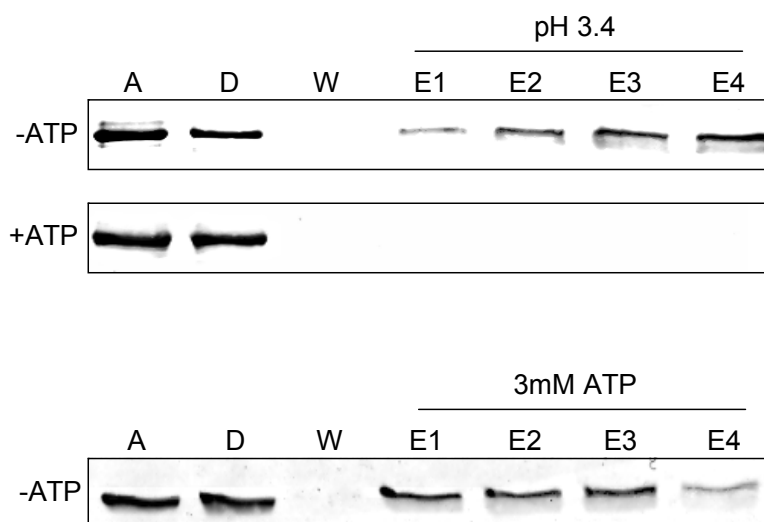


Abbildung 24: Pull down-Assay mit rekombinantem cpHsc70.2

Der Pulldown-Assay mit rekombinantem cpHsc70.2 aus *A. thaliana* und V_{C-term} an IgG-Sepharose wurde sowohl in An- als auch in Abwesenheit von 2.5 mM ATP durchgeführt (+/- ATP). Die Elution des spezifisch gebundenen Proteins erfolgte mit (A) 0.3M HAc, pH 3,4 oder (B) 3.0mM ATP. Das Protein wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodekoration mit einem Antikörper gegen cpHsc70.2 detektiert. A: Auftrag, D: Durchlauf, W: Wasch, E1-4: Eluate.

Rekombinantes cpHsc70.2 wurde nur in den Eluaten des Ansatzes nachgewiesen, der zuvor mit Apyrase behandelt wurde, also keinerlei ATP aufwies (Abb. 24A,- ATP). In dem Assay, der 2,5 mM ATP enthielt (+ ATP), konnte kein Protein in den Fraktionen nach Elution detektiert werden, was bedeutet, dass cpHsc70.2 unter diesen Bedingungen nicht in der Lage war, an V_{C-term} zu binden. Die Interaktion von cpHsp70.2 und V_{C-term} erfolgt also durchaus nukleotidabhängig, wie es für Hsp70-Chaperone üblich ist.

In einem weiteren Ansatz wurde nun getestet, ob die in Abwesenheit von ATP an V_{C-term} gebundenen Chaperone mit ATP von der Säule eluiert werden können (Abb. 24B). In dem Ansatz, in dem zuvor mit Apyrase sämtliches ATP entfernt worden war, ließ sich das gebundene cpHsp70 unter Einsatz von 3 mM ATP von der Säule lösen, was die Spezifität der Anbindung bestätigt.

Weitere Pull down-Assays wurden mit stromalen Proteinen aus Erbse und V_{C-term} an IgG-Sepharose unter den zuvor beschriebenen Bedingungen durchgeführt. Die Elution des spezifisch gebundenen Proteins erfolgte dabei wie zuvor beschrieben. Von der Säule eluiertes Protein wurde wieder durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western Transfer mit einem Antikörper gegen cpHsc70.2 nachgewiesen (Abb. 25).

In Abwesenheit von ATP war auch in diesem Ansatz eine deutliche Anbindung von Hsp70 aus Erbse mit V_{C-term} auszumachen, die nicht stattfand, wenn dem Assay 2,5 mM ATP zugesetzt wurde (Abb. 25A). An V_{C-term} gebundenes Hsp70 konnte ebenfalls mit 3 mM ATP von der Säule eluiert werden.

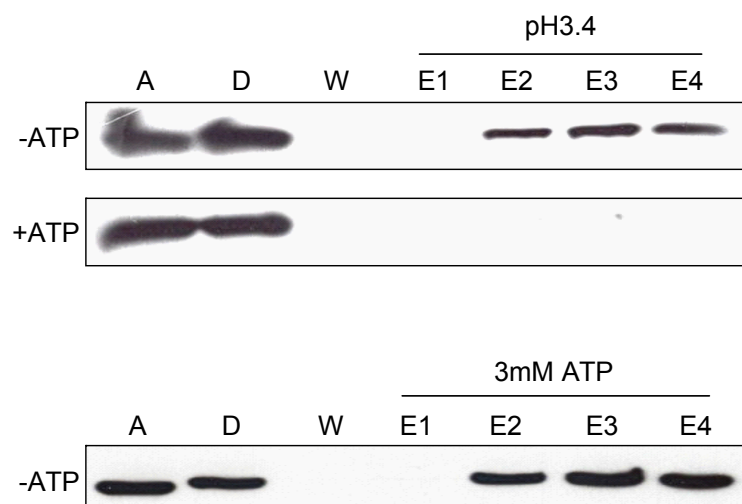


Abbildung 25: Pull down-Assay mit stromalen Proteinen aus Erbse

Der Pull down-Assay mit stromalen Proteinen aus Erbse und V_{C-term} an IgG-Sepharose wurde in An- und Abwesenheit von 2.5 mM ATP durchgeführt (+ / - ATP). Die Elution des gebundenen Proteins erfolgte mit (A) 0.3 M HAc, pH 3,4 oder (B) 3.0 mM ATP. Eluiertes Protein wurde mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodekoration mit einem Antikörper gegen cpHsc70B.2 detektiert. A: Auftrag, D: Durchlauf, W: Wasch, E1 - 4: Eluate.

Zusammenfassend lässt sich erläutern, dass der C-Terminus von Vipp1 aus *A. thaliana* mit stromalen Hsc70-Chaperonen interagiert. Dies wurde mit der MS-Analyse von eluierenden Proteinen aus Pull down-Assays, die mit Stroma aus *A. thaliana* durchgeführt wurden, ermittelt und zusätzlich mit Pull down-Assays, in die rekombinantes Protein eingesetzt wurde, bestätigt. Offensichtlich ist Vipp1 auch in der Lage, neben den cpHsc70-Homologen aus *A. thaliana* auch Hsp70-Homologe aus Erbse zu binden. Die Interaktion der Proteine erfolgte abhängig vom Nucleotidstatus ausschließlich in der Abwesenheit von ATP. An V_{C-term} gebundenes Protein konnte darüber hinaus mit 3 mM ATP von der Säule eluiert werden. Diese Untersuchungen legen eine spezifische Interaktion der C-terminalen Domäne von Vipp1 mit Hsp70-Chaperonen nahe. Ob es sich dabei *in vivo* tatsächlich um stromale Chaperone handelt, muss im Zusammenhang mit Versuchen zur Lokalisierung von Vipp1 (siehe Abschnitt 3.3.2) bestätigt werden.

3.5 Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung von Vipp1

3.5.1 Behandlung von Vipp1 mit zweiwertigen Ionen

Um die Reaktion von Vipp1 auf zweiwertige Ionen zu untersuchen, wurde Vipp1 VI enthaltendes Bakterienlysat in Anwesenheit von jeweils 2,5 mM Calcium- (CaCl_2), Magnesium- (MgCl_2), Nickel- (Ni_2SO_4), Kupfer- (CuCl_2) oder Zink- (Zn_2SO_4) Ionen inkubiert. Wurde der Ansatz anschließend in eine lösliche und eine unlösliche Fraktion aufgeteilt und auf einem SDS-Gel mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert, so ließ sich feststellen, dass Vipp1 in Anwesenheit einiger zweiwertiger Metallionen ausfällt (Abb. 26). Dies galt nicht für Calcium oder Magnesium-Ionen. Wurde dem Ansatz zusätzlich zu den Ionen 2.5 mM EDTA hinzugefügt, so fiel das Protein nicht aus, sondern verblieb in jedem Ansatz löslich im Überstand (Daten nicht gezeigt).

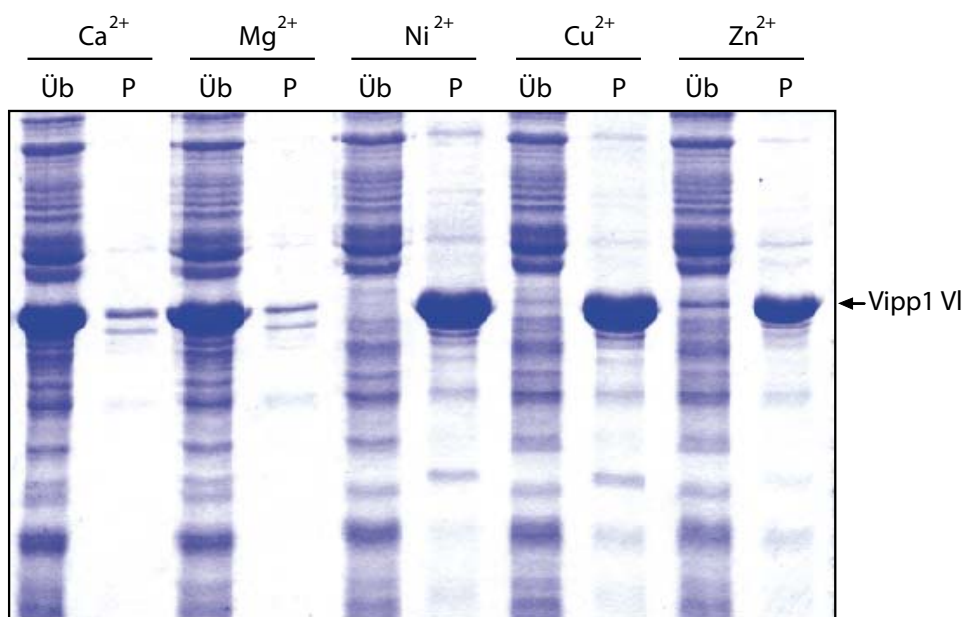


Abbildung 26: Behandlung von Vipp1 mit zweiwertigen Kationen

Das Bakterienlysat Vipp1 VI-exprimierender *E. coli* -Zellen wurde mit verschiedenen zweiwertigen Ionen behandelt und nach Zentrifugation in eine lösliche (Üb) und eine unlösliche (P) Fraktion aufgeteilt. Die Fraktionen wurden in einer SDS-PAGE mit Coomassie angefärbt.

3.5.2 Kristallisierung von Vipp1

Bislang existiert weder für Vipp1 noch für sein Homolog PspA eine Kristallstruktur. Da diese allerdings Aufschluss über den räumlichen Aufbau des Vipp1-Komplexes geben und zur Aufklärung von dessen Wirkweise beitragen würde, wurde der Versuch unternommen, einen Proteinkristall von Vipp1 aus *A. thaliana* herzustellen, der anschließend einer Kristallstrukturanalyse unterzogen werden sollte.

Um Proteinkristalle zu erhalten, sind große Mengen hochreinen Proteins notwendig. Da sich Kristalle von Proteinen mit gleichmäßiger, kompakter Struktur wesentlich besser analysieren lassen, wurde für die Kristallisation das Vipp1-Konstrukt Vipp1_1-219 ausgewählt, das um die Vipp1-spezifische, C-terminale Domäne verkürzt ist. Das in *E. coli* heterolog exprimierte und über Ni²⁺NTA-Sepharose aufgereinigte Protein wurde mit Trypsin verdaut, um den C-terminalen Histidin-Tag zu entfernen und verunreinigende Proteine zu eliminieren. Anschließend wurde Vipp1 über eine Größenausschluss-Chromatographie von der Protease getrennt, entsalzt und aufkonzentriert. Von Vipp1 gebundene, bakterielle Lipide wurden in einem zweiten Ansatz mit einer Lipasebehandlung entfernt. Über TEM-Analyse wurde weiterhin sichergestellt, dass solchermaßen behandelte Proteine noch in hochmolekularer Struktur vorliegen. Anschließend wurden sie in einer Kollaboration mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. M. Groll (TUM, München) diversen Puffern ausgesetzt, um eine Kristallisation zu provozieren. Bislang konnten allerdings unter den getesteten Bedingungen keine Proteinkristalle erzeugt werden. Dies könnte u.a. daran liegen, dass hochmolekulare Komplexe im Allgemeinen schwerer kristallisieren als monomere Proteine. Andererseits müssen noch weitere Bedingungen getestet und die Methode optimiert werden.

3.5.3 Yeast Two Hybrid-Screens

Mithilfe eines Yeast-2-Hybrid-Screens sollten Interaktionspartner des Vipp1-Voll-längenproteins identifiziert werden. Es wurden dazu zwei kommerzielle Screens (Hybrigenics, Paris) mit zwei unterschiedlichen Fusionsgenen (LexA und GAL4) durchgeführt. Allerdings konnten auf diese Weise nur insgesamt acht mögliche Interaktionspartner identifiziert werden, von denen bei Vieren eine Wechselwirkung mit Vipp1 ausgeschlossen wurde (sogenannte Falschpositive, die immer wieder in den Screens auftauchen). Die anderen Ergebnisse wurden nur mit einer

„moderaten“ Wahrscheinlichkeit der spezifischen Interaktion bewertet, was bedeutet, dass sie einer Gruppe zugeordnet wurden, die sowohl Falschpositive als auch aus verschiedenen Gründen schwer zu detektierende Assoziationen umfasst. Deshalb müssen diese Ergebnisse mit Vorsicht interpretiert werden. Die in den Screens nachgewiesenen potentiellen Interaktionspartner von Vipp1 sind in der Tabelle 2 aufgelistet. Ein Interaktionsprotein stellt Vipp1 dabei selbst dar.

Tabelle 2: Im Yeast Two Hybrid Screen ermittelte Interaktionspartner von Vipp1. Es ist der Name, die Lokalisation und die Funktion der Interaktionsproteine soweit bekannt angegeben.

Protein	Lokalisation	Funktion
Vipp1	Chloroplast	Thylakoidbiogenese
At1g31150	Zellkern	Transkriptionsfaktor
At2g27980	unbekannt	Bindung von Zink-Ionen
JmjC	Zellkern	Transkriptionsfaktor

Probleme treten bei der Yeast Two Hybrid-Methode dann auf, wenn sich das Protein, welches auf Interaktionen geprüft werden soll, in dem verwendeten System nicht richtig faltet. Da Vipp1 einen homooligomeren Komplex bildet, ist die detektierte Interaktion mit Vipp1-Molekülen ein Hinweis darauf, dass das Protein in dem verwendeten System seine natürliche Struktur aufweist. Allerdings benötigt die Vipp1-Vipp1-Interaktion das Protein per se erstmal nur in seiner Monomeren Form. Für die Interaktion mit weiteren Partnern ist jedoch ggf. eine Komplexbildung von Vipp1 Voraussetzung, welche in diesem Screen möglicherweise nicht gewährleistet war.

Zwei der vier aufgelisteten Proteine sind Transkriptionsfaktoren (At1g31150 und JmjC) und im Zellkern lokalisiert. Aufgrund der unterschiedlichen Lokalisationen ist eine spezifische Interaktion mit Vipp1 eher unwahrscheinlich. Vom dritten Protein (At2g27980) ist die Lokalisation nicht bekannt. Die in vorangegangenen Versuchen ermittelte Interaktion von Vipp1 mit stromalem Hsp70 (siehe 3.4.2) konnte mit diesem Yeast Two Hybrid-System noch nicht bestätigt werden. Es wurden

auch keine anderen Proteine des Chaperonsystems über diese Methode identifiziert.

Um eine Interaktion der Proteine mittels Yeast Two Hybrid zu ermitteln, muss diese im Zellkern stattfinden, da die Transkription des Fusionsgens nur dort ablaufen kann. Es ist allerdings durchaus möglich, dass der Vipp1-Komplex aufgrund seiner Größe nicht in der Lage ist, die Poren des Zellkerns zu überwinden und nur monomere Vipp1-Moleküle in den Zellkern gelangen. Dies würde sowohl das positive Resultat (Vipp1) als auch die fehlende Erkennung anderer Interaktionspartner erklären. Andere Methoden, wie etwa Split-Ubiquitin könnten in diesem Falle bessere Ergebnisse liefern.

4 Diskussion

Trotz der Relevanz des Thylakoidsystems im Prozess der oxygenen Photosynthese von Chloroplasten ist noch sehr wenig bekannt über Faktoren, die am Aufbau dieser Membranstrukturen beteiligt sind. Das 1994 von Li und Mitarbeitern beschriebene chloroplastidäre Protein Vipp1 (Vesicle inducing protein in plastids 1) wurde aufgrund des Phänotyps von Mutanten, die eine TDNA-Insertion in der Promoterregion des Vipp1-Genes aufweisen und deshalb nur etwa 20 % des Vipp1-Wildtypgehalts exprimieren können, mit diesem Prozess in Verbindung gebracht (Kroll, *et al.*, 2001). Pflanzen, deren Vipp1-Gehalt drastisch reduziert ist, zeigen ein albinotisches Erscheinungsbild und sind nicht mehr in der Lage, oxygenen Photosynthese zu betreiben. Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Chloroplasten dieser Mutanten zeigen ein ungenügend entwickeltes Thylakoidmembran-System, was auf eine essenzielle Funktion des Proteins in der Thylakoidbiogenese hinweist.

4.1 Sekundärstruktur

Vipp1 aus Cyanobakterien und höheren Pflanzen wurde in Form eines hochmolekularen Komplexes identifiziert, der 48 - 64 Vipp1-Monomere umfasst und ein Molekulargewicht von 1.5 – 2 MDa aufweist (Aseeva *et al.*, 2004, Fuhrmann *et al.*, 2009, Liu *et al.*, 2005). Auch für das Vipp1-Homolog PspA aus *E. coli* wurden Oligomere von >1 MDa beschrieben, die aus mindestens 36 Einzelmolekülen zusammengesetzt sind (Hankamer *et al.*, 2004, Standar *et al.*, 2008). Außerdem konnte mittels Elektronen-Mikroskopie eine ringförmige Struktur der sowohl von PspA als auch von Vipp1 gebildeten Komplexe eruiert werden (Aseeva *et al.*, 2004, Fuhrmann *et al.*, 2009, Hankamer *et al.*, 2004). Da die Assemblierung von Vipp1 zu einem hochmolekularen Komplex in verschiedenen Organismengruppen (Cyanobakterien, Grünalgen, höhere Pflanzen) konserviert ist, war anzunehmen, dass die Oligomerisierung des Proteins eine wichtige Rolle für dessen Funktionalität spielt. Tatsächlich konnte indirekt eine Verbindung zwischen der Assemblierung des Proteins zum homooligomeren Komplex und dessen Aufgabe in der Thylakoidbiogenese nahegelegt werden (Aseeva *et al.*, 2007). Obwohl Vipp1

offensichtlich als Komplex fungiert, ist bislang nicht ganz klar, welche Bereiche des Proteins für die Komplexbildung essenziell sind.

Vipp1 besitzt eine weitgehend α -helikale Struktur, die in *A. thaliana* nach einer Analyse mit dem Strukturvorhersageprogramm JPred aus acht α -Helices aufgebaut ist, welche durch kurze unstrukturierte Bereiche (Random coils) voneinander getrennt sind (Abb. , Asseva, 2007). Dieses Strukturmerkmal ist für Proteine, die hochmolekulare Komplexe bilden, durchaus üblich. Die Zuordnung der α -helikalen Bereiche in einzelne Helices ist allerdings nicht ganz eindeutig. So identifizierten sowohl Elderkin *et al.*, (2005) als auch Joly *et al.* (2009) lediglich vier α -helikale Domänen für PspA aus *E. coli* (Abb. 27). Dabei ist die Gesamtstruktur im Vergleich zu Vipp1 aus *A. thaliana* trotzdem konserviert, es wurden im Strukturmodell von PspA lediglich einige in Vipp1 getrennt definierte Helices zu einer einzelnen Helix zusammengefügt, so dass sich die Gesamtstrukturen der Proteine etwas unterscheiden (Abb. 27, PspA, Helix 1 und 4). Zum Teil sind die Bereiche der Helices 2 und 3 des PspA- Proteins im Vergleich zu Vipp1 leicht verschoben (Abb. 27).

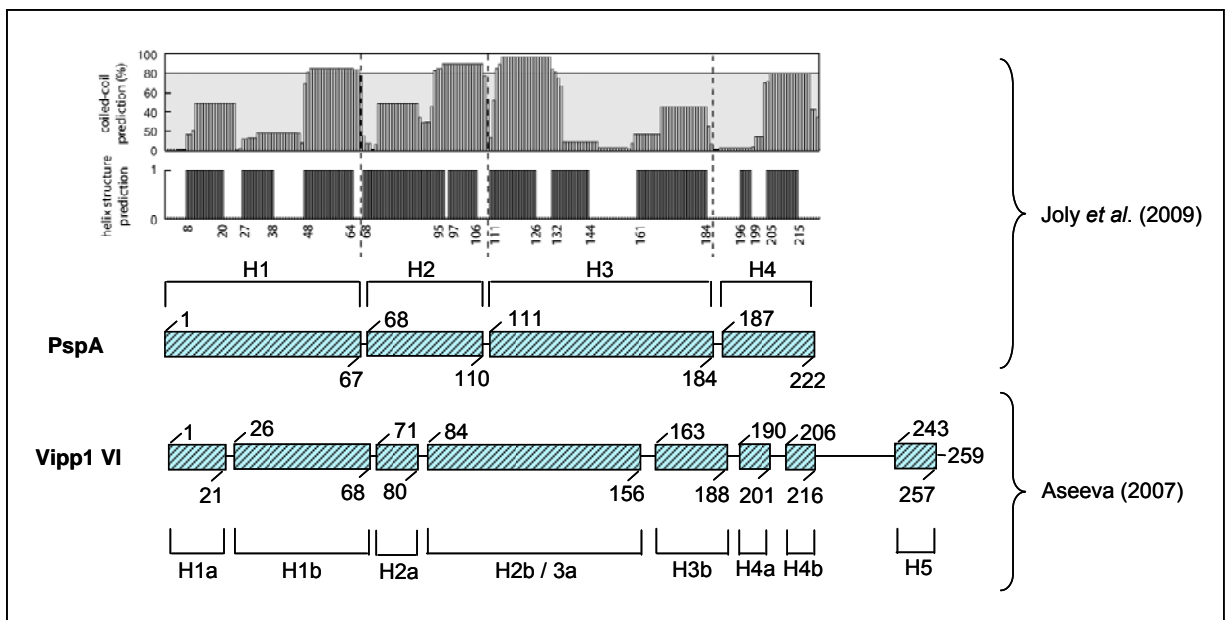


Abbildung 27: Vergleich der für PspA und Vipp1 ermittelten Sekundärstruktur

In der Abbildung sind die für Vipp1 und sein Homolog PspA anhand von diversen Analyseprogrammen erstellten Strukturmodelle dargestellt. Die jeweiligen Quellen sind angegeben und die entsprechenden α -Helices (H) sind nummeriert.

Zum besseren Verständnis ist in der Abbildung 27 ein Vergleich der Strukturen von PspA nach Joly *et al.* (2009) und von Vipp1 nach Aseeva *et al.* (2007) dargestellt. Es ist allerdings zu beachten, dass es sich bei beiden Darstellungen zunächst um theoretische Strukturanalysen handelt, deren Definition nicht eindeutig ist und unterschiedlich ausgelegt werden kann.

4.2 Oligomerisierung

Um herauszufinden, welche α -Helices von Vipp1 zur Oligomerisierung benötigt werden, wurde die Assemblierung von rekombinantem Vipp1-Volllängenprotein sowie diversen C- und N-terminal verkürzten Konstrukten mittels Größenausschluss-Chromatographie (GAC), Saccharose-Dichte-Zentrifugation und Negativkontrastierung analysiert (Abschnitte 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4). Dabei stellte sich heraus, dass bereits die Entfernung der ersten N-terminalen α -Helix des Proteins in der Bildung tetramerer Strukturen anstelle des 2 MDa-Oligomers resultiert, während das Protein am C-terminalen Ende um bis zu drei α -Helices verkürzt werden kann, ohne dass dies Einfluss auf die Oligomerisierung des Proteins zum 64 mer nimmt. Die in diesen Experimenten ermittelten Ergebnisse bestätigen somit zuvor erzielte Resultate, nach denen Teile der N-terminalen, PspA-ähnlichen Domäne von Vipp1 für die Komplexbildung benötigt werden, die Vipp1-spezifische C-terminale Verlängerung allerdings für dieses Charakteristikum ohne Bedeutung ist (Aseeva *et al.*, 2004). Strukturanalysen von verkürzten PspA-Konstrukten mittels GAC zeigten allerdings, dass alle α -Helices des Vipp1-Homologs aus *E. coli* für dessen Oligomerisierung zum 36 mer notwendig sind (Joly *et al.*, 2009). Diesen Analysen zufolge war allein das PspA-Volllängenprotein in der Lage, zu einem hochmolekularen Komplex zu assemblieren, nicht aber N- oder C-terminal verkürzte Konstrukte. Es muss natürlich beachtet werden, dass das Vipp1-Volllängenprotein im Gegensatz zu PspA am C-terminalen Ende um etwa 30 Aminosäuren verlängert ist. Diese Extension entspricht der Vipp1-spezifischen C-terminalen Domäne, die in PspA-Proteinen nicht vorkommt. Ein PspA-Konstrukt, das lediglich aus den Aminosäuren 1 - 186 des Volllängenproteins zusammengesetzt ist, bildet nach Joly *et al.* (2009) keinen hochmolekularen Komplex mehr, sondern kann in GAC-Analysen vielmehr als Homodimer identifiziert werden. Im Gegensatz dazu zeigen

die in dieser Arbeit mit einem vergleichbaren Vipp1-Konstrukt (Vipp1₁₋₁₈₈) durchgeführten Analysen, dass ein derart verkürztes Vipp1-Protein zu einem hochmolekularen Komplex assemblieren kann, was einen strukturellen Unterschied zu PspA darstellt (Abschnitt, 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4). Trotz seinem Hang zur Aggregatbildung kann Vipp1₁₋₁₈₈ vor allem in TEM-Aufnahmen eindeutig als Komplex identifiziert werden. Ein um vier α -Helices verkürztes Vipp1-Konstrukt (Vipp1₁₋₁₆₃) wurde in GAC-Analysen ebenfalls als hochmolekulare Struktur identifiziert. Dies ist natürlich ein Hinweis auf eine mögliche Assemblierung zu einem 64-mer und wäre im Zusammenhang damit eine weitere Einschränkung der für die Komplexbildung essenziellen Domäne. Die Oligomerisierung des Konstrukts konnte allerdings aufgrund sehr geringer Expressionsraten nicht mit anderen Methoden verifiziert werden und ist deshalb unter Vorbehalt zu diskutieren.

Joly *et al.* (2009) erzielten in ihren Arbeiten zur Strukturanalyse von PspA aus *E. coli* des weiteren Ergebnisse die belegen, dass die Verkürzung des PspA-Volllängenproteins um die ersten 68 Aminosäuren zur Bildung eines Hexamers anstelle eines 36 mers führt. Das von Joly *et al.* verwendete Konstrukt setzte sich aus den Aminosäuren 68-222 des PspA-Volllängenproteins zusammen und lässt sich in etwa mit dem in dieser Arbeit verwendeten Konstrukt Vipp1₇₁₋₂₅₉ vergleichen. Dabei ist zu beachten, dass alle N-terminal verkürzten Vipp1- Konstrukte zusätzlich die Vipp1-spezifische C-terminale Verlängerung aufweisen, die allerdings die Komplexbildung nachweislich nicht beeinflusst (Asseva *et al.* 2004, Abschnitte 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4). Somit wurde bereits für PspA gezeigt, dass die ersten 68 Aminosäuren des Proteins für dessen Assemblierung zum hochmolekularen Komplex von Bedeutung sind. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Aussage für das Vipp1-Protein aus *A. thaliana* bestätigt werden. Es wurde zusätzlich nachgewiesen, dass schon eine N-terminale Verkürzung um 21 Aminosäuren die Assemblierung des Proteins zum 64 mer verhindert. In der Annotierung durch Aseeva *et al.* stellt dieser Bereich eine separate α -Helix dar (Abb. 27). Da das N-terminal verkürzte Protein in FTIR-Analysen das charakteristische Spektrum eines vorwiegend α -helikalen Proteins zeigte (Abschnitt 3.3.4), konnte ein Effekt aufgrund unkorrekter Faltung durch die Verkürzung des Proteins ausgeschlossen werden. Die erste α -Helix von Vipp1 ist allerdings wahrscheinlich nicht allein für dessen Komplexbildung verantwortlich. In vorangegangenen Strukturanalysen konnte

schon der zentralen α -Helix (Abb. 27 Vipp1, H4, AS 85-156) von Vipp1 aus *A. thaliana* eine Rolle in der Oligomerisierung des Proteins zum 2 MDa-Komplex zugesprochen werden (Aseeva *et al.*, 2004). Aufgrund dieser Ergebnisse kann nun zusätzlich die erste α -Helix von Vipp1 als essenziell für die Komplexbildung deklariert werden. Die Tatsache, dass Vipp1 trotz stringenter N-terminaler Verkürzung als Tetramer auftritt, lässt sich mit einer großflächigen Interaktion der einzelnen Monomere erklären, die letztendlich die vier N-terminalen α -Helices des Proteins in die Tetramerbildung integriert. Die Assemblierung N-terminal verkürzter Vipp1-Konstrukte zu stabilen Tetrameren ist ebenfalls ein Indiz für eine derartige Struktur als Untereinheit des Vipp1-Komplexes. Tatsächlich wurde bereits ein Tetramer als kleinste funktionale Untereinheit von Vipp1-Komplexen aus *Synechocystis* PCC 6803 thematisiert und experimentell bestätigt (Fuhrmann *et al.*, 2009, Bultema *et al.*, 2010).

Der Vipp1-Komplex deassembliert in Anwesenheit von 6 M Harnstoff zu stabilen Oktameren (Abschnitt 3.2.6). In vorangegangenen Versuchen wurde gezeigt, dass das hochmolekulare Vipp1-Oligomer unter Einsatz von 4 mM SDS ebenfalls in Oktamere, aber auch in Tetra- und Dimere zerlegt werden kann (Fuhrmann *et al.*, 2009). Die Bildung von stabilen Oktameren in Anwesenheit von Harnstoff und SDS deutet auf eine starke Bindung der Moleküle in diesen Strukturen hin. Fraglich ist nun, ob das Vipp1-Oktamer eine funktionelle Untereinheit des Vipp1-Komplexes darstellt und wie ein aus Oktameren gebildetes 64 mer mit 12-fach-Symmetrie aufgebaut ist. Aus den durchgeführten Untersuchungen geht klar hervor, dass die erste α -Helix bereits für die Assemblierung zu Oktameren essenziell ist, während diese zur Bildung von Tetrameren nicht benötigt wird. Die Identifizierung der Kristallstruktur des Vipp1-Oligomers würde in diesem Fall hilfreich sein, um den Aufbau des Proteinkomplexes besser zu verstehen.

Vipp1 und sein Vorläufer PspA zeigen zwar eine eher niedrige Homologie in ihrer Primärsequenz, allerdings ist die Sekundärstruktur beider Proteine hoch konserviert (Bultema *et al.*, 2010). Sowohl Vipp1 als auch PspA weisen weitgehend α -helikale Strukturen auf, die durch eine hohe Neigung zur Bildung von Coiled Coil-Domänen gekennzeichnet sind (Li *et al.*, 1994, Fuhrmann *et al.*, 2009, Bultema *et al.*, 2010). Das Coiled Coil-Strukturmotiv ist oft an der Interaktion von

Molekülen beteiligt und charakteristisch für Proteine, die zu hochmolekularen Oligomeren assemblieren. Die von Vipp1 und PspA gebildeten Komplexe sind allerdings strukturell sehr unterschiedlich aufgebaut. Während der PspA-Komplex aus *E. coli* ausschließlich in einer neunfachen Symmetrie angeordnet ist (Hankamer *et al.*, 2004), konnte bei Vipp1-Oligomeren aus *Synechocystis* PCC 6803 mittlerweile von Fuhrmann *et al.*, eine 12-17-fache Rotationssymmetrie ermittelt werden. Eine 12-fach rotationssymmetrische Struktur wurde auch in dieser Arbeit für rekombinantes Vipp1 aus *A. thaliana* beobachtet (Abschnitt 3.2.4). Aufgrund der variierenden Größen der mittels Negativkontrastierung dargestellten Proteinkomplexe ist eine Mehrfach-Symmetrie bei Vipp1 aus höheren Pflanzen aber ebenfalls nicht auszuschließen.

Ein PspA-Oligomer ist aus 36 PspA-Molekülen aufgebaut, welches neun Tetrameren entspricht. Bei einer gleichmäßigen 12-fachen Symmetrie müssten Vipp1 Komplexe aus 48 bzw. 96 Vipp1-Monomeren aufgebaut sein, um eine tetramere bzw. oktamere Substruktur zu gewährleisten. Unabhängig von der Substruktur, wirkt sich dies entsprechend auf die Größen der Komplexe aus, die sich bei PspA auf etwa 1 MDa belaufen und bei Vipp1 zwischen 1,6 MDa und 2 MDa betragen (Hankamer *et al.*, 2004, Aseeva *et al.*, 2004, Bultema *et al.*, 2009). Zusätzlich wurde für das PspA 36-mer aus *E. coli* ein Durchmesser von 20 nm und eine Höhe von 8,5 nm ermittelt. Hochmolekulare Vipp1-Oligomere weisen allerdings Durchmesser von 25 - 40 nm und Höhen zwischen 14 und 22 nm auf (Hankamer *et al.*, 2004, Aseeva *et al.*, 2004, Bultema *et al.*, 2009). Die Analyse der Vipp1-Sequenz aus *Synechocystis* PCC6803 mit einem 3D-Strukturvorhersageprogramm bestätigte ebenfalls, dass sich Vipp1- und PspA-Komplexe im grundsätzlichen Aufbau signifikant unterscheiden müssen (Bultema *et al.*, 2010). Die strukturell unterschiedliche Anordnung der Monomere erklärt die Differenzen, die bei N- und C-terminaler Verkürzung von Vipp1 und PspA auftreten und lässt abweichende Wirkweisen vermuten. Trotzdem scheint Vipp1 durchaus in manchen Situationen die Funktionen von PspA übernehmen zu können. So belegten DeLisa *et al.* (2004), dass in *E. coli* exprimiertes Vipp1 aus *Synechocystis* PCC 6803 in der Lage war, die Blockierung des Tat-Wegs in Abwesenheit von PspA abzubauen. Allerdings zeigte die Mutation des Vipp1-Gens in *Synechocystis* PCC 6803 trotz der Anwesenheit von PspA einen drastischen Phänotyp, was

darauf schließen lässt, dass das Homolog die Funktion von Vipp1 in diesen Organismen nicht komplementieren kann (Westphal *et al.*, 2001).

4.3 Membranassoziation

Vipp1 wurde in vorangegangenen Versuchen in *Synechocystis* sowie auch in Chloroplasten höherer Pflanzen als membranassoziiert beschrieben (Li *et al.*, 1994, Kroll *et al.*, 2001, Westphal *et al.*, 2001, Aseeva *et al.*, 2004, Fuhrmann *et al.*, 2009). Auch das Vipp1-Homolog PspA aus *E. coli* ist in Bakterienzellen an der Plasmamembran lokalisiert (Brissette *et al.*, 1990). PspA interagiert dazu mit zwei integralen Membranproteinen, PspB und PspC, die ebenfalls durch das *psp*-Operon kodiert werden (Adams *et al.*, 2003). Darüber hinaus ist das Protein durchaus in der Lage, direkt mit Membranlipiden zu wechselwirken (Kobayashi *et al.*, 2007). Es bindet dabei bevorzugt die Phospholipide Phosphatidylserin und Phosphatidylglycerol, wie durch Flotationsversuche mit rekombinantem Protein ermittelt werden konnte (Kobayashi *et al.*, 2007). Die bakterielle Plasmamembran besteht hauptsächlich aus Phospholipiden. Phosphatidylglycerol ist in der bakteriellen Plasmamembran zu 17,3 % enthalten, Phosphatidylserin dagegen macht in bakteriellen Membranen nur einen sehr kleinen Anteil (<1 %) aus (White *et al.*, 1971). Eine unmittelbare Assoziation mit Lipiden konnte nun auch für das Vipp1-Protein aus *A. thaliana* nachgewiesen werden (Abschnitt 3.3.3, 3.3.4). Vipp1 bindet an Lipide der inneren Chloroplastenmembran und ist außerdem in der Lage, mit bakteriellen Lipiden zu interagieren. Da die bakterielle Plasmamembran fast ausschließlich aus Phospholipiden zusammengesetzt ist (White *et al.*, 1971), ist dieses Ergebnis ein Hinweis darauf, dass Vipp1 wie auch sein Homolog PspA an Phospholipide binden kann. Ob die Interaktion von Vipp1 spezifisch mit Phospholipiden erfolgt oder ob im Laufe der Evolution eine Anpassung an die Lipide der inneren Hüllmembran der Chloroplasten erfolgte, muss in weiteren Versuchen geklärt werden. Die innere Hüllmembran von Chloroplasten ist größtenteils aus Galaktolipiden (~84 %) aufgebaut, allerdings sind auch Phospholipide (~10 %) und Sulfolipide (~4 %) vorhanden (Douce und Joyard, 1990). Eine detaillierte Analyse der mit Vipp1 assoziierten Lipide würde hierüber Aufschluss geben.

Die in Flotationsexperimenten und FTIR-Analysen mit rekombinantem Protein ermittelten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Membrananbindung des Proteins und dessen Oligomerisierung zu einem hochmolekularen Komplex miteinander korrelieren. So zeigte das N-terminal verkürzte Vipp1-Konstrukt (Vipp1₂₁₋₂₅₉), das in GAC-Analysen lediglich als Tetramer identifiziert wurde, weder in Flotationsversuchen noch in IR-Analysen eine Lipidinteraktion (Abschnitt 3.3.3, 3.3.4). Bei einem C-terminal verkürzten Konstrukt (Vipp1₁₋₂₁₉) konnte dagegen mit beiden Methoden eine Assoziation mit Lipiden nachgewiesen werden. Zumindest die N-terminale erste α -Helix scheint für die Interaktion von Vipp1 mit Membranlipiden essenziell zu sein, was eine Parallele zu der Komplexbildung des Proteins darstellt. Ob dieser Bereich direkt mit Lipiden interagieren kann oder nur sekundär über die Komplexbildung des Proteins von Bedeutung ist, geht aus den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen allerdings nicht hervor. Dennoch kann ein Zusammenhang von Komplexbildung und Lipidbindung ernsthaft in Betracht gezogen werden, da ebenfalls der vierten α -Helix von Vipp1 (Vipp1 _{Δ 85-156}) eine essenzielle Rolle in beiden Prozessen zugesprochen werden konnte (Aseeva *et al.*, 2004). Die Bereiche, die einem dieser Konstrukte fehlen, sind jeweils im anderen vorhanden, womit als wesentliche Korrelationspunkte beider Konstrukte deren Defizite in der Komplexbildung hervorgehoben werden können. In dieser Arbeit wurde ebenfalls nachgewiesen, dass die Behandlung rekombinanten Proteins mit Harnstoff in einem Abbau der 2 MDa Vipp1-Komplexe zu Oktameren resultiert (Abschnitt 3.2.6). Wird innere Chloroplastenmembran aus Erbse mit 6 M Harnstoff inkubiert, so löst sich der Vipp1-Komplex von der Membran und ist in der löslichen Fraktion zu detektieren (siehe Abschnitt 3.3.2). Ein Zusammenhang zwischen der Deassemblierung des Vipp1-Komplexes in Anwesenheit von Harnstoff und der Ablösung des Proteins von den Membranlipiden kann allerdings nur vermutet werden, da aus den Ergebnissen nicht klar hervorgeht, ob Vipp1 sich tatsächlich ausschließlich aufgrund der Deassemblierung des Proteinkomplexes von der Membran löst, oder das salzhaltige Milieu der Grund dafür ist. Auch wenn bisher der endgültige experimentelle Beweis fehlt, kann die fehlende Komplexbildung aufgrund der bislang erzielten Ergebnisse als Ursache für eine verhinderte Bindung an Membranen bzw. Lipide als wahrscheinlich erachtet werden.

Des Weiteren wurde in dieser Arbeit die Funktion der Vipp1-spezifischen C-terminalen Domäne näher untersucht. Als charakterisierendes Merkmal der Vipp1-Proteine wurde diesem Bereich eine mehr oder weniger wichtige Rolle bei der Thylakoidbiogenese zugesprochen (Westphal *et al.*, 2001, Aseeva *et al.*, 2004). Obwohl die Aminosäuresequenz dieser Domäne zwischen Vipp1-Proteinen unterschiedlicher Organismen wenig konserviert ist, stellt sie doch in allen analysierten Vipp1-Proteinen eine kurze α -Helix dar, die über eine Random coil-Sequenz mit dem PspA-ähnlichen Bereich des Proteins in Verbindung steht. Da die C-terminale Verlängerung nicht in den Vipp1-Kernkomplex integriert ist, sondern mehr oder weniger frei zugänglich aus dem Oligomer heraussteht (Aseeva *et al.*, 2004, Abschnitt 3.2.5), kann dieser Bereich des Proteins als potentielle Anlaufstelle für Interaktionspartner fungieren.

4.4 Interaktionspartner

Ein Pull Down-Assay, der mit dem an IgG-Sepharose gekoppelten Vipp1_{C-Term} und Stroma aus Arabidopsis-Chloroplasten durchgeführt wurde, resultierte in der Identifikation der beiden stromalen Chaperone cpHsp70.1 und cpHsp70.2 als Interaktionspartner von Vipp1 (Abschnitt 3.4.2). Die Anbindung an V_{C-term} erfolgte dabei ausschließlich in Abwesenheit von ATP und die mit Vipp1 assoziierten Chaperone konnten durch die Zugabe von 3 mM ATP von der Säule eluiert werden, was die Spezifität dieser Interaktion unterstreicht. Eine Wechselwirkung von Vipp1 mit stromalen Hsp70-Homologen aus Erbse und *A. thaliana* wurde schon zuvor mit dem Vipp1-Volllängenprotein nachgewiesen (Aseeva *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnte zusätzlich ermittelt werden, dass diese Interaktion, wie für Chaperone üblich, in einer nukleotidabhängigen Art und Weise erfolgt und direkt an der C-terminalen Verlängerung von Vipp1 stattfindet. Die Substratbindung von Hsp70-Chaperonen erfolgt in einem Zyklus, der zwischen einem ATP-gebundenen Ausgangsstatus mit niedriger Substrataffinität und einem ADP-gebundenen Status mit hoher Substrataffinität wechselt (Reviews: Mayer und Bukau, 2005, Young, 2010). Deshalb ist die Bindung von ATP, sowie dessen Hydrolyse essenziell für die Funktion des Proteins. Der ATPase-Zyklus wird von Co-Chaperonen aus der Familie der J-Domäne-Proteine kontrolliert. Hsp70-Proteine werden mithilfe der

J-Domäne-Co-Chaperone zu ihren Substraten geleitet, wo die ATP-Hydrolyse in Gang gesetzt wird. Durch die Hydrolyse von ATP wird die Substrat-Bindehöhle geschlossen und das Substrat fest an Hsp70 gekoppelt. Zum Chaperonsystem gehören des Weiteren sogenannte Nukleotid-Austauschfaktoren, die Hsp70 wieder in den ATP-gebundenen Ausgangszustand zurückversetzen und somit die Freisetzung des Substrates gewährleisten. Da Hsp70-Chaperone eng mit ihren Co-Chaperonen zusammenarbeiten, wäre es zu erwarten, weitere Bestandteile des Chaperonsystems in Verbindung mit Vipp1 zu identifizieren.

In *Chlamydomonas* konnte bereits die Interaktion des Vipp1-Volllängenproteins mit dem aus Hsp70B, CDJ1 und CGE1 bestehenden stromalen Chaperon-System nachgewiesen werden (Liu *et al.*, 2005, Liu *et al.*, 2007). In dieser Arbeit konnten jedoch außer den Hsp70-Homologen keine weiteren Mitglieder des stromalen Chaperonsystems aus Erbse und Arabidopsis als Interaktionspartner von Vipp1_{C-term} identifiziert werden. Mit der C-terminalen Domäne wurde allerdings ein relativ kurzer Bereich des Proteins analysiert. Bindestellen von Hsp70-Chaperonen und J-Domäne Proteinen sind allerdings oft an unterschiedlichen Bereichen des Proteins lokalisiert (Han und Christen, 2003). Möglicherweise bindet Vipp1_{C-term} ausschließlich Hsp70 und die Bindestellen für die Co-Chaperone liegen in anderen Abschnitten des Proteins. In diesem Fall müssten weitere Pull down-Assays mit Vipp1 VI durchgeführt werden, um ebenfalls die Co-Chaperone zu identifizieren. Des Weiteren wurde ermittelt, dass das Verhältnis des an Vipp1 bindenden CDJ2 zumindest in *Chlamydomonas* generell um etwa den Faktor 10 kleiner ist als bei Hsp70 (Liu *et al.*, 2007), so dass ein mit V_{C-term} interagierendes stromales Co-Chaperon in den in dieser Arbeit durchgeführten Pull down-Assays aufgrund der geringen Menge womöglich einfach nicht im Silbergel detektiert werden konnte.

Darüber hinaus lässt sich auch nicht gänzlich ausschließen, dass die Bindung von stromalem Hsp70 zu Vipp1 nicht spezifisch ist. Generell ist die Substratbindedomäne von Hsp70-Proteinen sehr konserviert (Rüdiger *et al.*, 1997, Mayer und Bukau, 2005). Die Spezifikation der Interaktion zwischen Hsp70 und seinen Substraten wird deshalb durch J-Domäne Proteine gewährleistet, die das Substrat zu Hsp70 leiten und die ATP-Hydrolyse in Gang setzen. Die Tatsache, dass Hsp70-Proteine eine sehr konservierten Substratbindedomäne besitzen, bestätigte

sich in den in dieser Arbeit durchgeführten Pull down-Assays dahingehend, dass ebenfalls Hsp70-Homologe aus *E. coli* mithilfe eines gegen cpHsp70.2 gerichteten Antikörpers in den Elutionen detektiert werden konnten, also offensichtlich in der Lage waren, an V_{C-term} zu binden (Daten nicht gezeigt). Ebenfalls in den mit löslichen Proteinen des Zellextrakts aus *Chlamydomonas* durchgeführten Pull-down-Assays wurde ein mitochondrielles Hsp70-Homolog (Hsp70C) in den Elutionsfraktionen identifiziert, was eine unspezifische Bindung an Vipp1 impliziert (Liu *et al.*, 2005). Der Pull Down-Assay wurde aufgrund der Annahme, Vipp1 sei in Chloroplasten auf der stromalen Seite der inneren Hüllmembran lokalisiert, mit Stroma aus *A. thaliana* durchgeführt. Es ist allerdings durchaus möglich, dass die als Substrat von Vipp1 identifizierten Chaperone aufgrund ihrer konservierten Substratbindedomäne zwar an den C-Terminus von Vipp1 binden konnten, Vipp1 allerdings kein echtes Substrat dieser Proteine darstellt. Diese These wird durch die Tatsache unterstützt, dass bislang noch kein weiterer Bestandteil des Chaperonsystems, wie ein chloroplastidäres DnaJ-Homolog oder ein Nukleotid-austauschfaktor, als Interaktionspartner von Vipp1 identifiziert werden konnte. Wenn dies der Fall wäre, müssten die Pull down-Assays mit Gesamtchloroplasten wiederholt werden, um das mit Vipp1 interagierende Chaperonsystem in seiner Vollständigkeit zu ermitteln.

Um einen Hinweis auf die Funktion der C-terminalen Domäne im Hinblick auf die Thylakoidbiogenese zu erhalten, wurde ein C-terminal verkürztes Vipp1-Konstrukt, dem die Vipp1-Spezifische Domäne fehlte (Vipp1₁₋₂₁₉) im Hintergrund einer vollständigen Vipp1-Mutante exprimiert. Vor diesem Hintergrund sollte die Funktion der C-terminalen Vipp1-Domäne eruiert werden. Allerdings zeigten die mit Vipp1₁₋₂₁₉ komplementierten Vipp1-Mutanten unter den verwendeten Bedingungen im Erscheinungsbild keinen offensichtlichen Unterschied zum Wildtyp (Abschnitt 3.4.1). Somit bleibt bislang die Funktion der C-terminalen Domäne von Vipp1 eine noch zu beantwortende Frage. Allerdings könnte möglicherweise eine nähere Untersuchung der Chloroplasten mittels TEM oder die Behandlung der Pflanzen mit verschiedenen Stressoren einen Phänotyp identifizieren, der über eine besondere Funktion der C-terminalen Domäne Aufschluss gibt.

4.5 Orientierung

Letztendlich warfen die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche zu Vipp1 unter Verwendung innerer Hüllmembranen auch eine unerwartete Frage auf. Vesikel der inneren Chloroplastenmembran aus Erbse, die nach dem Protokoll von Waegemann und Soll (1995) isoliert wurden, weisen hauptsächlich eine korrekte „inside out“-Orientierung auf (Cline *et al.*, 1985, Lübeck *et al.*, 1996). Dies konnte anhand eines Proteolyseverdau ebenfalls für die in dieser Arbeit separierten Membranvesikel bestätigt werden (Abschnitt 3.3.1). Dazu wurden diverse Markerproteine ausgewählt, die vor und nach dem Verdau der Membranvesikel mittels SDS-PAGE verglichen wurden. Wie erwartet waren Tic 62, Tic 32 und FNR aufgrund ihrer Lokalisation an der dem Stroma zugewandten Seite der inneren Chloroplastenmembran vor einem Verdau durch Thermolysin geschützt, da die Protease nicht ins Innere der Vesikel vordringen kann (Küchler *et al.*, 2002, Hörmann *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu zeigte Vipp1 sich bei der Behandlung der Membranvesikel mit Thermolysin proteasesensitiv (Abschnitt 3.3.1). Daraus müsste man schließen, dass Vipp1 an der dem Intermembranraum zugewandten Seite der inneren Hüllmembran lokalisiert ist und deshalb für die Protease zugänglich war. Dies widerspricht jedoch den bisherigen Literaturangaben:

Über die Lokalisation von Vipp1 gibt es verschiedene Theorien. Vipp1 wurde zunächst in Erbse als Protein beschrieben, welches in den Chloroplasten transloziert wird und dort sowohl an der Inneren Envelopmembran lokalisiert ist, als auch an den Thylakoiden (Li *et al.*, 1994). Diese Lokalisation wurde für Vipp1 aus *A. thaliana* bestätigt (Kroll *et al.*, 2001). Fraktionierungsexperimente sowie EM-Aufnahmen von immunomarkierten *Synechocystis* PCC 6803-Zellen zeigten eine ausschließliche Assoziation von Vipp1 mit der inneren Cytoplasmamembran (Westphal *et al.*, 2001b). Fuhrmann *et al.* (2009) beobachteten allerdings im gleichen Organismus die Lokalisation von Vipp1 an der inneren Cytoplasmamembran, den Thylakoiden und dem Cytoplasma. Liu *et al.* (2005) identifizierten Vipp1 in der inneren Membran, sowie dem Stroma und den Thylakoiden von *Chlamydomonas*-Chloroplasten. Auch das Vipp1-Homolog PspA wurde als membranassoziiertes Protein beschrieben, das ebenfalls frei im Cytoplasma vorkommt, allerdings nicht im Periplasma (Brissette *et al.*, 1990).

Aufnahmen von mit GFP-fusionierten Vipp1-Protein transformierte Protoplasten zeigten eine ausnahmslose Lokalisation des Proteins an der inneren Envelopmembran von Tabak-Chloroplasten (Aseeva *et al.*, 2004). Aus den Aufnahmen geht nicht hervor, von welcher Seite das Protein an die Membran bindet. Eine dem Intermembranraum zugewandte Lokalisation ist von diesen Ergebnissen ausgehend prinzipiell möglich. Allerdings gibt es dann keine Erklärung dafür, wie das Vipp1-Konstrukt nach Entfernung der zentralen α -Helix ins Stroma des Chloroplasten gelangt und dort ein GFP-Signal erzeugt (Aseeva *et al.*, 2004).

Werden alle diese Thesen berücksichtigt, so ist die Lokalisation von Vipp1 bislang alles andere als eindeutig. Aufgrund der in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse lässt sich nun die neue Theorie einer Assoziation von Vipp1 mit der dem Intermembranraum zugewandten Seite der inneren Hüllmembran anschließen, was allerdings mit eindeutigen Experimenten verifiziert werden muss. Eine solche Möglichkeit wird seit Kurzem auch von anderen Gruppen in Betracht gezogen (Sakamoto, persönliche Kommunikation). Um Aufschluss über die Funktion von Vipp1 zu erhalten, ist die Identifikation der genauen Lokalisation von Vipp1 von großer Wichtigkeit und sollte daher mit hoher Priorität geklärt werden.

5 Zusammenfassung

Das Protein Vipp1 ist ein essenzieller Faktor der Biogenese und Instandhaltung von Thylakoidmembranen in Cyanobakterien und Pflanzen. Eine starke Reduktion des Vipp1-Gehalts führt sowohl in *Synechocystis* als auch in *Arabidopsis* zu einer Unfähigkeit der Zelle, ein funktionales Thylakoidmembransystem aufzubauen. In *Arabidopsis* resultiert eine drastische Verminderung der Vipp1-Menge zudem im Verlust des chloroplastidären Vesikeltransfers, was vermuten lässt, dass beide Prozesse miteinander in Verbindung stehen und außerdem von Vipp1 abhängig sind. Vipp1 bildet hochmolekulare Komplexe, die 2 MDa umfassen und aus etwa 64 Vipp1-Molekülen zusammengesetzt sind. Da die Oligomerisierung für die Funktion des Proteins als essenziell beschrieben wurde, beschäftigt sich die vorliegende Arbeit damit, Domänen des Proteins, die für die Komplexbildung von Bedeutung sind, zu identifizieren. Strukturelle Analysen verkürzter Vipp1-Konstrukte identifizierten die erste α -Helix von Vipp1 als essenziell für die Assemblierung des Proteins zum 64 mer, da die Entfernung dieser Domäne in der Bildung von Tetrameren anstelle hochmolekularer Komplexe resultiert. Die Tetramerisierung benötigt dabei offensichtlich nur einen kurzen zentralen Bereich des Proteins, da erhebliche N- und C-terminale Verkürzungen die Bildung tetramerer Strukturen nicht beeinflussen. Vipp1 ist in Chloroplasten und Cyanobakterien mit der inneren Hüll- bzw. Plasmamembran assoziiert. Interessanterweise inhibiert die Entfernung der ersten α -Helix von Vipp1 ebenfalls dessen Anbindung an Membranlipide, was einen Zusammenhang zwischen beiden Prozessen vermuten lässt. Dagegen ist die C-terminale Verlängerung von Vipp1, die das Protein von seinem prokaryotischen Vorgänger PspA unterscheidet, weder für die Oligomerisierung noch für dessen Assoziation an Membranlipide von Bedeutung, was die Frage nach der Aufgabe dieser Domäne aufwirft. Die Expression eines C-terminal verkürzten Vipp1-Konstruktes im genetischen $\Delta vipp1$ -Hintergrund konnte diese Frage aufgrund eines fehlenden Phänotyps nicht beantworten. Mithilfe von Pulldown-Assays wurde allerdings eine nukleotidabhängige Interaktion mit der C-terminalen Verlängerung von Vipp1 und dem stromalen Chaperon cpHsp70 in *Arabidopsis* nachgewiesen. Möglicherweise dient dieser Teil des Proteins als Anlaufstelle für Interaktionspartner, da der Rest von Vipp1 in einem kompakten Komplex verborgen ist.

6 Abstract

The vesicle inducing protein in plastids 1 (Vipp1) plays an essential role in the biogenesis and maintenance of thylakoid membranes. A loss of Vipp1 content in both Arabidopsis and Synechocystis leads to an inability of the cell to build up a functional thylakoid membrane system. In Arabidopsis the depletion of Vipp1 results further in the abolishment of the chloroplast vesicle transport. This indicates that both processes, vesicle transport and thylakoid biogenesis, are somehow linked and depend on the presence of Vipp1. The protein is comprised of a predominantly alpha-helical structure and there is evidence that oligomerization of Vipp1 to a high molecular mass complex of 2 MDa comprising about 64 Vipp1 molecules is important for the functionality of the protein. Therefore, the aim of this work was to identify domains of Vipp1 essential for complex formation. In this context, the first 20 amino acid long α -helix of Vipp1 could be directly related to oligomerization. Removal of this domain resulted in the formation of tetramers instead of the large oligomer. Tetramer formation only requires a small central part of the protein since removal of several N- and C-terminal alpha-helices did not affect tetramerization. Vipp1 furthermore associates with the inner envelope membrane of the chloroplast and areas of the protein essential for this trait have been elucidated. Interestingly, the first α -helix that plays a role in complex formation, also affects membrane association. No binding to inner envelope lipids took place if this part of the protein was removed, indicating a correlation between complex formation and lipid binding. Interestingly, a Vipp1-specific, C-terminal domain, which distinguishes this protein from its prokaryotic ancestor PspA, plays no role in membrane association or oligomerization raising the question of the function of this particular domain. To gain insight into the function of the Vipp1-specific C-terminal domain, a construct lacking this region was expressed in the background of a complete Vipp1 knockout mutant. However, no visible phenotype was observed in those plants under the chosen conditions. Thus, the role of the C-terminal extension so far remains elusive. Nevertheless, a nucleotide dependent interaction with the C-terminal domain of Vipp1 and the stromal chaperone cpHsp70 could be demonstrated, indicating that since the rest of the protein is part of a very compact complex, this part of Vipp1 might serve as a contact point for interacting proteins.

7 Referenzen

- Adams, H., Teertstra, W., Demmers, J., Boesten, R. and Tommassen, J.** (2003) Interactions between phage-shock proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **185**, 1174-1180.
- Archibald, J.M.** (2009) The puzzle of plastid evolution. *Curr Biol*, **19**, R81-88.
- Arnon, D.I.** (1949) Copper Enzymes in Isolated Chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta Vulgaris*. *Plant Physiol*, **24**, 1-15.
- Aseeva, E., Ossenbuhl, F., Eichacker, L.A., Wanner, G., Soll, J. and Vothknecht, U.C.** (2004) Complex formation of Vipp1 depends on its alpha-helical PspA-like domain. *J Biol Chem*, **279**, 35535-35541.
- Aseeva, E., Ossenbuhl, F., Sippel, C., Cho, W.K., Stein, B., Eichacker, L.A., Meurer, J., Wanner, G., Westhoff, P., Soll, J. and Vothknecht, U.C.** (2007) Vipp1 is required for basic thylakoid membrane formation but not for the assembly of thylakoid protein complexes. *Plant Physiol Biochem*, **45**, 119-128.
- Balsera, M., Goetze, T.A., Kovacs-Bogdan, E., Schurmann, P., Wagner, R., Buchanan, B.B., Soll, J. and Bolter, B.** (2009) Characterization of Tic110, a channel-forming protein at the inner envelope membrane of chloroplasts, unveils a response to Ca²⁺ and a stromal regulatory disulfide bridge. *J Biol Chem*, **284**, 2603-2616.
- Benning, C.** (2009) Mechanisms of lipid transport involved in organelle biogenesis in plant cells. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **25**, 71-91.
- Bergler, H., Abraham, D., Aschauer, H. and Turnowsky, F.** (1994) Inhibition of lipid biosynthesis induces the expression of the PspA gene. *Microbiology*, **140 (Pt 8)**, 1937-1944.
- Blum, H., Beier, H. and Gross, H.J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels *Electrophoresis*, **8**, 93-99.
- 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.
- Brissette, J.L., Russel, M., Weiner, L. and Model, P.** (1990) Phage shock protein, a stress protein of *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **87**, 862-866.

- Bultema, J.B., Fuhrmann, E., Boekema, E.J. and Schneider, D.** (2010) Vipp1 and PspA: Related but not twins. *Commun Integr Biol*, **3**, 162-165.
- 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.
- Cline, K., Andrews, J., Mersey, B., Newcomb, E.H. and Keegstra, K.** (1981) Separation and characterization of inner and outer envelope membranes of pea chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **78**, 3595-3599.
- Cole, C., Barber, J.D. and Barton, G.J.** (2008) The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res*, **36**, W197-201.
- Cserzo, M., Wallin, E., Simon, I., von Heijne, G. and Elofsson, A.** (1997) Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method. *Protein Eng*, **10**, 673-676.
- Darwin, A.J.** (2005) The phage-shock-protein response. *Mol Microbiol*, **57**, 621-628.
- DeLisa, M.P., Lee, P., Palmer, T. and Georgiou, G.** (2004) Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. *J Bacteriol*, **186**, 366-373.
- Douce, R. and Joyard, J.** (1990) Biochemistry and function of the plastid envelope. *Annu Rev Cell Biol*, **6**, 173-216.
- Dworkin, J., Jovanovic, G. and Model, P.** (2000) The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of sigma(54)-dependent transcription. *J Bacteriol*, **182**, 311-319.
- Elderkin, S., Bordes, P., Jones, S., Rappas, M. and Buck, M.** (2005) Molecular determinants for PspA-mediated repression of the AAA transcriptional activator PspF. *J Bacteriol*, **187**, 3238-3248.
- Elderkin, S., Jones, S., Schumacher, J., Studholme, D. and Buck, M.** (2002) Mechanism of action of the *Escherichia coli* phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF. *J Mol Biol*, **320**, 23-37.
- Fuhrmann, E., Bultema, J.B., Kahmann, U., Rupprecht, E., Boekema, E.J. and Schneider, D.** (2009) The vesicle-inducing protein 1 from *Synechocystis* sp. PCC 6803 organizes into diverse higher-ordered ring structures. *Mol Biol Cell*, **20**, 4620-4628.

- Gassler, C.S., Wiederkehr, T., Brehmer, D., Bukau, B. and Mayer, M.P.** (2001) Bag-1M accelerates nucleotide release for human Hsc70 and Hsp70 and can act concentration-dependent as positive and negative cofactor. *J Biol Chem*, **276**, 32538-32544.
- Han, W. and Christen, P.** (2003) Mechanism of the targeting action of DnaJ in the DnaK molecular chaperone system. *J Biol Chem*, **278**, 19038-19043.
- Hanahan, D.** (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol*, **166**, 557-580.
- Hankamer, B.D., Elderkin, S.L., Buck, M. and Nield, J.** (2004) Organization of the AAA(+) adaptor protein PspA is an oligomeric ring. *J Biol Chem*, **279**, 8862-8866.
- Hörmann, F., Kuchler, M., Sveshnikov, D., Oppermann, U., Li, Y. and Soll, J.** (2004) Tic32, an essential component in chloroplast biogenesis. *J Biol Chem*, **279**, 34756-34762.
- Jeanmougin, F., Thompson, J.D., Gouy, M., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.** (1998) Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci*, **23**, 403-405.
- Joly, N., Burrows, P.C., Engl, C., Jovanovic, G. and Buck, M.** (2009) A lower-order oligomer form of phage shock protein A (PspA) stably associates with the hexameric AAA(+) transcription activator protein PspF for negative regulation. *J Mol Biol*, **394**, 764-775.
- Jovanovic, G., Weiner, L. and Model, P.** (1996) Identification, nucleotide sequence, and characterization of PspF, the transcriptional activator of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. *J Bacteriol*, **178**, 1936-1945.
- Kleerebezem, M., Crielgaard, W. and Tommassen, J.** (1996) Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) of *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *EMBO J*, **15**, 162-171.
- Kleerebezem, M. and Tommassen, J.** (1993) Expression of the PspA gene stimulates efficient protein export in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **7**, 947-956.
- Kobayashi, R., Suzuki, T. and Yoshida, M.** (2007) *Escherichia coli* phage-shock protein A (PspA) binds to membrane phospholipids and repairs proton leakage of the damaged membranes. *Mol Microbiol*, **66**, 100-109.

- Kroll, D., Meierhoff, K., Bechtold, N., Kinoshita, M., Westphal, S., Vothknecht, U.C., Soll, J. and Westhoff, P.** (2001) VIPP1, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4238-4242.
- Küchler, M., Decker, S., Hormann, F., Soll, J. and Heins, L.** (2002) Protein import into chloroplasts involves redox-regulated proteins. *EMBO J*, **21**, 6136-6145.
- Kyhse-Andersen, J.** (1984) Electroblothing 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.
- Li, H.M., Kaneko, Y. and Keegstra, K.** (1994) Molecular cloning of a chloroplastic protein associated with both the envelope and thylakoid membranes. *Plant Mol Biol*, **25**, 619-632.
- Liu, C., Willmund, F., Golecki, J.R., Cacace, S., Hess, B., Markert, C. and Schroda, M.** (2007) The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyse assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. *Plant J*, **50**, 265-277.
- Liu, C., Willmund, F., Whitelegge, J.P., Hawat, S., Knapp, B., Lodha, M. and Schroda, M.** (2005) J-domain protein CDJ2 and HSP70B are a plastidic chaperone pair that interacts with vesicle-inducing protein in plastids 1. *Mol Biol Cell*, **16**, 1165-1177.
- Lloyd, L.J., Jones, S.E., Jovanovic, G., Gyaneshwar, P., Rolfe, M.D., Thompson, A., Hinton, J.C. and Buck, M.** (2004) Identification of a new member of the phage shock protein response in *Escherichia coli*, the phage shock protein G (PspG). *J Biol Chem*, **279**, 55707-55714.
- Lübeck, J., Soll, J., Akita, M., Nielsen, E. and Keegstra, K.** (1996) Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J*, **15**, 4230-4238.
- Lyons, T.W.** (2007) Palaeoclimate: oxygen's rise reduced. *Nature*, **448**, 1005-1006.
- Mayer, M.P. and Bukau, B.** (2005) Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cell Mol Life Sci*, **62**, 670-684.

- McCarty, J.S., Buchberger, A., Reinstein, J. and Bukau, B.** (1995) The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J Mol Biol*, **249**, 126-137.
- Model, P., Jovanovic, G. and Dworkin, J.** (1997) The *Escherichia coli* phage-shock-protein (psp) operon. *Mol Microbiol*, **24**, 255-261.
- Muehlethaler, K. and Frey-Wyssling, A.** (1959) [Development and structure of proplastids]. *J Biophys Biochem Cytol*, **6**, 507-512.
- Pope, B. and Kent, H.M.** (1996) High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, **24**, 536-537.
- Rüdiger, S., Buchberger, A. and Bukau, B.** (1997) Interaction of Hsp70 chaperones with substrates. *Nat Struct Biol*, **4**, 342-349.
- Sambrook, J. and Russel, D.W.** (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual CSHL Press.
- Schünemann, D.** (2007) Mechanisms of protein import into thylakoids of chloroplasts. *Biol Chem*, **388**, 907-915.
- Seigneurin-Berny, D., Salvi, D., Joyard, J. and Rolland, N.** (2008) Purification of intact chloroplasts from *Arabidopsis* and spinach leaves by isopycnic centrifugation. *Curr Protoc Cell Biol*, **Chapter 3**, Unit 3 30.
- Standar, K., Mehner, D., Osadnik, H., Berthelmann, F., Hause, G., Lunsdorf, H. and Bruser, T.** (2008) PspA can form large scaffolds in *Escherichia coli*. *FEBS Lett*, **582**, 3585-3589.
- Stengel, A., Soll, J. and Bölter, B.** (2007) Protein import into chloroplasts: new aspects of a well-known topic. *Biol Chem*, **388**, 765-772.
- Vothknecht, U.C. and Soll, J.** (2005) Chloroplast membrane transport: interplay of prokaryotic and eukaryotic traits. *Gene*, **354**, 99-109.
- Waegemann, K. and Soll, J.** (1995) Characterization and isolation of the chloroplast protein import machinery. *Methods Cell Biol*, **50**, 255-267.
- Waegemann, K. and Soll, J.** (1991) Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *The Plant Journal*, 149-158.
- Wessel, D. and Flügge, U.I.** (1984) A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal Biochem*, **138**, 141-143.

REFERENZEN

- Westphal, S., Heins, L., Soll, J. and Vothknecht, U.C.** (2001a) Vipp1 deletion mutant of *Synechocystis*: a connection between bacterial phage shock and thylakoid biogenesis? *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 4243-4248.
- Westphal, S., Soll, J. and Vothknecht, U.C.** (2001b) A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Lett*, **506**, 257-261.
- White, D.A., Albright, F.R., Lennarz, W.J. and Schnaitman, C.A.** (1971) Distribution of phospholipid-synthesizing enzymes in the wall and membrane subfractions of the envelope of *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, **249**, 636-642.
- Xiong, J. and Bauer, C.E.** (2002) Complex evolution of photosynthesis. *Annu Rev Plant Biol*, **53**, 503-521.
- Young, J.C.** Mechanisms of the Hsp70 chaperone system. *Biochem Cell Biol*, **88**, 291-300.

DANKSAGUNG

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. Ute Vothknecht für die Bereitstellung des interessanten Themas, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und vielfältige Unterstützung, sowie die Möglichkeit, meine Arbeit auf nationalen und internationalen Konferenzen präsentieren zu können und nicht zuletzt für das gute Arbeitsklima.

Ich möchte mich darüber hinaus von ganzem Herzen bei Fatima Chigri bedanken, die mich seelisch und moralisch in dieser Zeit unterstützt hat, immer ein offenes Ohr für meine Probleme hatte und mir stets mit guten Lösungsansätzen zur Seite stand.

Des Weiteren danke ich der Arbeitsgruppe Soll für die bereitwillige Erlaubnis zur Nutzung verschiedener Geräte sowie die Bereitstellung diverser Antikörper.

Ich danke ebenfalls meiner Arbeitsgruppe, allen voran Claudia Sippel für ihre großartige Hilfe sowie die fachmännische Klonierung diverser Konstrukte.

Außerdem möchte ich mich bei Norbert, Sandra, Monika, Geraldine, Augostinho und Nargis dafür bedanken, dass ich immer gern zur Uni gekommen bin und mich rundum wohlfühlt habe. Ihr habt entscheidend dazu beigetragen!

Natürlich bedanke ich mich auch bei Johanna Bussemer für eine ganz tolle Zeit und viel Spaß im Labor.

Des Weiteren danke ich Herrn Prof. Dr. Wanner (LMU), mit dessen Hilfe die schönen EM-Aufnahmen entstanden sind, PD Dr. Paula Braun (LMU), die die IR-Messungen durchgeführt hat und ebenfalls Herrn Prof. Dr. Groll und Eva Huber (TUM) für ihre Hilfe bei den Kristallisationsversuchen von Vipp1.

Ich möchte mich darüber hinaus ganz herzlich bei meiner Familie bedanken, für ihr großes Verständnis und eine liebevolle Unterstützung zu jeder Zeit. Danke, dass es euch gibt!

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde: Eike, Maxi, Anne, Hanne, Ari, Anja, Kristin, Steffi, Luca, Robert und Thilo, ich danke euch dafür, dass ich mich gut in München eingelebt habe und auf diesen Lebensabschnitt mit Freuden zurückblicken kann! Danke für die vielen schönen Momente!

Robert gilt ein herzlicher Dank für seine Hilfsbereitschaft, die ständige Motivation und seine positive Denkweise, sowie für sein Verständnis und seine Geduld. Danke, dass Du immer für mich da bist!

Ich möchte mich ebenfalls ganz herzlich bei Manu, Allegra und Juliane für ihre jahrelange Freundschaft auch über große Entfernungen hinweg bedanken sowie für ihre großartige Unterstützung in allen Lebenslagen, was mir sehr viel bedeutet.

Lebenslauf

Name	Stephanie Otters
Geburtsdatum	21. Juli 1981 in Bottrop
Staatsangehörigkeit	deutsch

Ausbildung

Okt. 2001 – Juli 2006	Studium der Biologie an der Heinrich Heine-Universität in Düsseldorf Abschluß: Diplom
Seit Januar 2007	wissenschaftliche Mitarbeiterin der Ludwig-Maximilians-Universität München mit Promotion, Fachbereich Zellbiologie