

**Biochemische Charakterisierung von
potentiellen Substraten der plastidären
HSP90/HSP70-Chaperone**

Diplomarbeit

angefertigt Mai 2006 bis März 2007
an der Fakultät für Biologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

vorgelegt von
Mareike Possienke

Betreuer: Jun.-Prof. Dr. Michael Schroda
Leiter: Prof. Dr. Wolfgang Haehnel

Fast alle Aspekte des Lebens sind auf molekularer Stufe organisiert;
Wenn wir also die Moleküle nicht verstehen,
können wir über das Leben selbst nur sehr oberflächlich Bescheid wissen.

Francis Crick

Ein Forscher fühlt sich dann dem noch nicht Erkannten gegenüber wie ein
Kind, das der Erwachsenen überlegenes Walten zu begreifen sucht.

Albert Einstein



CHLAMYDOMONAS

Inhaltsverzeichnis

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	V
1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG.....	3
2.1. Der Modellorganismus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3
2.2. Das HSP70/HSP90-Chaperonsystem	4
2.2.1. HSP70, HSP90, ihre Cochaperone und Funktionen.....	4
2.2.2. Das plastidäre Chaperonsystem	5
2.3. Zielsetzung.....	10
3. MATERIAL UND METHODEN.....	11
3.1. Material	11
3.1.1. Verwendete Software/ Internet Adressen.....	11
3.1.2. Geräte.....	11
3.1.3. Antikörper.....	12
3.1.4. Bakterienstämme.....	12
3.1.5. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> - Stämme	13
3.2. Arbeiten mit Bakterien.....	13
3.2.1. Medien	13
3.2.2. Bestimmung der optischen Dichte	13
3.2.3. Hitzeschock-Transformation.....	13
3.2.4. Minipräparation von Plasmid-DNA.....	14
3.3. Arbeiten mit <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	14
3.3.1. Kulturbedingungen	14
3.3.2. Medien	14
3.3.3. Bestimmung der Zellzahl.....	15
3.3.4. Transformation.....	15
3.3.5. Zellernte	15
3.4. Molekularbiologische Methoden	16
3.4.1. RNA-Isolierung.....	16
3.4.2. Gelelektrophorese	17
3.4.3. Northern-Transfer und Hybridisierung	18
3.4.4. DNA Konzentrationsbestimmung	19
3.4.5. PCR.....	20
3.4.6. RT-PCR	21
3.4.7. DNA-Präzipitation	21
3.4.8. Restriktionsverdau	21
3.4.9. Ligation.....	22
3.4.10. DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Jetsorb).....	22
3.4.11. Klonierung von <i>SecA</i> in den TYB11-Expressionsvektor	22
3.4.12. Klonierung von verschiedenen Deletionen des <i>CDJ2</i> in pCB785.....	23
3.4.13. Klonierung von <i>CDJ2</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in pCB785	24

3.5. Biochemische Methoden.....	25
3.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970).....	25
3.5.2. Gelfärbungen.....	26
3.5.3. Westerntransfer und immunologischer Proteinnachweis	26
3.5.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen	28
3.5.5. Überexpression	29
3.5.6. Ni-NTA-Pulldown-Assay	30
3.5.7. Immunopräzipitation	30
3.5.8. Protein-Identifikation mittels Massenspektrometrie	32
3.6. Zellbiologische Methoden.....	33
3.6.1. Kinetiken.....	33
3.6.2. Grobe Fraktionierung.....	34
3.6.3. Chloroplasten-Isolation.....	35
3.6.4. Mitochondrien-Isolation nach Eriksson et al. (1995).....	36
4. ERGEBNISSE	38
4.1. Biochemische Charakterisierung von VAP, 70-kDa-Protein und Thioesterase als mögliche Interaktionspartner des HSP70/HSP90-Chaperonsystems	38
4.1.1. Lichtinduzierbarkeit der Gene von <i>VAP</i> , <i>VIPP</i> und <i>70-kD-Protein</i>	38
4.1.2. Lokalisierung von VAP, 70-kDa-Protein und Thioesterase.....	39
4.1.3. Co-Immunopräzipitationen aus <i>Chlamydomonas</i> -Zellextrakten zum Nachweis von Interaktionspaaren	41
4.2. HSP90C-RNAi zur Auffindung charakteristischer Phänotypen	43
4.2.1. Transformation und Screening.....	44
4.2.2. Suche nach Phänotypen auf Protein-Ebene.....	45
4.2.3. Hitzestress-Überlebensexperiment.....	49
4.2.4. Suche nach Phänotypen auf RNA-Ebene.....	50
4.3. SecA als möglicher Interaktionspartner von CDJ2	51
4.3.1. Überexpression von CDJ2 und CDA2.....	52
4.3.2. Ni-NTA „Pulldown-Assay“	55
4.3.3. Massenspektrometrische Untersuchung der potentiellen Interaktionspartner.....	57
4.3.4. Arbeiten mit dem Antikörper gegen SecA aus <i>E.coli</i>	60
4.3.5. Co-Immunopräzipitation von SecA und CDJ2 aus <i>Chlamydomonas</i> -Zellextrakten	61
4.3.6. Verhalten der SecA-Konzentration während der CDJ2 Überexpression	63
4.3.7. Einfluss von Triton X-100 auf die Interaktion von SecA und CDJ2.....	64
4.3.8. Klonierung der <i>SecA</i> -cDNA in den Expressionsvektor pTYB11.....	66
4.3.9. Klonierung der N-terminalen Deletionen von <i>CDJ2</i> in pCB785	68
4.3.10. Klonierung von <i>CDJ2</i> aus <i>Arabidopsis thaliana</i> in pCB785	70
4.3.11. Wachstumskurve von <i>E.coli</i> -Stämmen, die CDJ2 aus <i>Arabidopsis</i> und deletierte Versionen von CDJ2 aus <i>Chlamydomonas</i> exprimieren	71
5. DISKUSSION	74
5.1. VAP und 70-kDa-Protein sind keine Interaktionspartner von VIPP1 und HSP70B.....	74
5.2. Keine charakteristischen Phänotypen durch Unter-expression von HSP90C.....	74
5.3. Mögliche Verbindung zwischen dem HSP70-Chaperon-system und dem Sec-Translokationssystem	75
5.3.1. Wachstumsstopp durch heterologe Expression von CDJ2 in <i>E.coli</i>	75
5.3.2. Bakteriell SecA interagiert mit plastidärem CDJ2.....	75
5.3.3. Störung der Interaktion von CDJ2 und SecA durch Detergenzien.....	78
5.3.4. Interaktionsstelle liegt in 43 AS langem Sequenzabschnitt	80
5.3.5. Keine Interaktion zwischen AtCDJ2 und bakteriellem SecA nachweisbar.....	81

5.3.6. Zusammenhang zwischen dem HSP70-Chaperonsystem und dem Proteintransport über die Thylakoidmembran	82
5.4. Ausblick	86
5.4.1. Nachweis der Interaktion von CDJ2 und SecA in Chlamydomonas.....	86
5.4.2. Nachweis der Interaktion bei höheren Pflanzen.....	87
6. LITERATURVERZEICHNIS	VII
ANHANG	XII
DANKSAGUNG	XVI
ERKLÄRUNG.....	XVII

Abkürzungsverzeichnis

α (bei Antikörpern)	gegen
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure(n)
At	Arabidopsis thaliana
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CBD	Chitin-Bindedomäne
cDNA	complementary DNA
Chl	Chlorophyll
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzentimeter
Cyt f	Cytochrom f
ddH ₂ O	Doppelt destilliertes Wasser
DDM	Dodecylmaltosid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
ECL	Enhanced Chemiluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESI	Elektronenspray Ionisation
EST	expressed sequence tag
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunden
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazine-N´-(2-ethansulfonic acid)
HRP	Meerrettich-Peroxidase
HSP	Hitzeschockprotein
IP	Immunopräzipitation
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IgG	Immunglobulin G (Antikörper)
kb	Kilobasenpaare
kDa	Kilodalton
KH	Kalium-Hepes
KMH	Kalium-Hepes-Magnesiumchlorid
l	Liter
LB	Luria Broth
LDM	low density membranes

mA	Milliampère
MDa	Megadalton
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MOPS	3-(N-Morpholino)-propanesulfonic acid
mRNA	messenger-RNA
MS	Massenspektrometrie
μCi	Mikrocurie
μE	Mikroeinstein
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ng	Nanogramm
Ni-NTA	Nickel-Nitrilotriessigsäure
nm	Nanometer
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerase Chain Reaction
PMF	Proton-motive force
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidon
rpm	Umdrehungen pro Minute
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interference
RT	Raumtemperatur
RT	reverse Transkription
s	Sekunden
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Sucrose-EDTA-MOPS
s.o.	siehe oben
SSC	Saline sodium citrat
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TAP	Tris-Acetat-Phosphat
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	Units
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WC	whole cells
z.B.	zum Beispiel
Ø	Durchmesser

1. Zusammenfassung

Im Chloroplasten von *Chlamydomonas* sorgen J-Domänen-Proteine für eine spezifische Auswahl von Substraten für das Hitzeschockprotein HSP70B. Wird CDJ2, eines dieser Cochaperone, heterolog in *E.coli* exprimiert, erfolgt nach dem Induktionszeitpunkt ein dramatischer Wachstumsstopp der Bakterien. Dies geht mit einer Abnahme des Gesamtproteins von bis zu mehr als 30 % innerhalb von drei Stunden einher. Um die Ursache dieser außergewöhnlich starken Wachstumshemmung zu ergründen, sollten mit CDJ2 interagierende Proteine bestimmt werden. Zusammen mit dem J-Domänen-Protein konnte in einem Ni-NTA „Pull-down-Assay“ ein Protein angereichert werden, das mit Massenspektrometrie als SecA identifiziert wurde. Mit einem Antikörper gegen SecA aus *E.coli* konnte die Interaktion zwischen bakteriellem SecA und plastidärem CDJ2 mit einem immunologischen Nachweis bestätigt werden. Für eine Detektion von SecA aus *Chlamydomonas* war der Antikörper jedoch nicht geeignet, so dass eine Klonierung des plastidären SecA in ein bakterielles Expressionssystem notwendig wurde. Diese wurde erfolgreich durchgeführt und soll im Anschluss an diese Arbeit zur Gewinnung des Proteins und der Herstellung von polyklonalen Antikörpern verwendet werden.

Mehrere Ni-NTA Proteinanreicherungen mit verschiedenen Triton-Konzentrationen zeigten eindeutig eine Störung der Interaktion zwischen CDJ2 und SecA durch das Detergenz. Zudem konnte gezeigt werden, dass SecA in *E.coli* nicht durch die Überexpression von CDJ2 induziert wird.

Durch die Klonierung und heterologe Expression von N-terminal deletierten Versionen von CDJ2 konnte ein 43 Aminosäuren langer Sequenzabschnitt als potentielle Interaktionsstelle zwischen CDJ2 und SecA ausgemacht werden. Dieser Sequenzabschnitt ist ausreichend, um den Wachstumsstopp in *E.coli* auszulösen. Auch das CDJ2-Homolog aus *Arabidopsis* (AtCDJ2) wurde in *E.coli* kloniert und exprimiert. Eine Verbindung zwischen AtCDJ2 und SecA konnte bis jetzt jedoch noch nicht festgestellt werden.

Die Interaktion zwischen SecA und CDJ2 lässt einen Zusammenhang zwischen dem HSP70-Chaperonsystem und dem Sec-Translokationssystem in Chloroplasten erwarten.

In einem weiteren Teilabschnitt dieser Diplomarbeit konnten zwei Proteine als potentielle Interaktionspartner des HSP70/HSP90-Chaperonsystems ausgeschlossen werden. Die mit den Arbeitsnamen VAP und 70-kDa-Protein bezeichneten Proteine ließen sich über Co-Immunopräzipitationen nicht zusammen mit VIPP1 und HSP70B aus den Chloroplasten von *Chlamydomonas* anreichern. Bei dem potentiellen Substrat von HSP90C, einer Thioesterase, konnte aufgrund des unzureichenden Antikörpers keine endgültige Aussage erreicht werden.

Weiterhin wurde zur Untersuchung der Funktion von HSP90C im Chloroplasten eine Unterexpression durch RNAi durchgeführt. Charakteristische Phänotypen, bedingt durch das Fehlen des Chaperons, konnten jedoch weder auf Protein- noch RNA-Ebene festgestellt werden.

transformiert werden. Es besteht zudem eine Datenbank mit aus *Chlamydomonas* isolierten ESTs (Expressed Sequence Tags), also partiellen Sequenzen von cDNA, die aus reverser Transkription von mRNA gewonnen wurden (Asamizu et al., 1999; 2000; Shrager et al., 2003). Dadurch kann ein besserer Überblick über tatsächlich exprimierte Gene sowie deren Exon-Intron-Struktur gewonnen werden. Außerdem können diese cDNAs zur heterologen Expression von *Chlamydomonas*-Proteinen verwendet werden.

2.2. Das HSP70/HSP90-Chaperonsystem

2.2.1. HSP70, HSP90, ihre Cochaperone und Funktionen

Mitglieder der HSP70-Chaperon Proteinfamilie kommen in praktisch allen Organismen vor und sind in jedem Kompartiment der eukaryotischen Zelle zu finden (Bukau and Horwich, 1998; Mayer and Bukau, 2005). Durch Stress können HSP70-Proteine ebenso wie andere Hitzeschockproteine (HSP) induziert werden. Sie enthalten eine N-terminale ATPase-Domäne sowie eine C-terminale Substratbindedomäne und zeichnen sich durch ATP-abhängige Interaktion mit ihren Substraten aus. HSP70-Chaperone erfüllen viele verschiedene Zellfunktionen. Am bekanntesten ist ihre Hilfe bei der Faltung neu synthetisierter Proteine, sie sind aber auch an der Rückfaltung denaturierter Proteine, der Auflösung von Aggregaten sowie der Membrantranslokation beteiligt (Mayer and Bukau, 2005). Ebenso liegt eine Funktion in der Aktivitätskontrolle regulatorischer Proteine. Die Schlüsselproteine von Signaltransduktionswegen werden in einer inaktiven Form fixiert und können bei entsprechendem Signal schnell aktiviert werden. Für diese Haltefunktion sind dabei neben HSP70 einige Cochaperone sowie HSP90 notwendig. Dieser Heterokomplex besteht aus mindestens vier Proteinen: HSP90, HSP70, Hop, das die beiden Hitzeschockproteine verbindet und HSP40, ein Cochaperon mit charakteristischer J-Domäne (Pratt and Toft, 2003). Zur Reifung von Hormonrezeptoren arbeitet der Komplex mit p23 und Immunophilinen zusammen. CDC37 dagegen wird gemeinsam mit dem Heterokomplex für die Reifung von Kinasen benötigt.

Generell ist HSP90 an der zellulären Stressantwort sowie an Signaltransduktionsprozessen beteiligt: Normalerweise bindet es an Regulatoren der Transduktionswege und trägt zu deren Reifung bei. Bei Stresseinfluss, z.B. durch Hitze

wird HSP90 aber zusätzlich für die Korrektur von entstehenden Fehlfaltungen benötigt (Rutherford and Lindquist, 1998). HSP90 kommt in allen eukaryotischen Zellen vor; in bakteriellen Systemen und Organellen sind seine Substrate und die damit verbundenen Funktionen aber noch nicht genau bekannt. Eine Ausnahme stellt das in Cyanobakterien identifizierte, an der Tetrapyrrol-Biosynthese beteiligte HemeE dar, ein Substrat des HSP90-Homolog HtpG (Watanabe et al., 2007).

Eine wichtige Klasse der Cochaperone des HSP70/HSP90-Systems sind die J-Domänen-Proteine. Sie zeichnen sich durch eine hoch konservierte J-Domäne aus, die ihnen eine Interaktion mit HSP70 ermöglicht. Zusätzlich enthalten sie weitere Proteinbindungsdomänen, die jedoch variieren. Damit ermöglichen sie HSP70 ein weites, aber spezifisches Spektrum an Substraten (Liu et al., 2005). Mehrere J-Domänen-Proteine können für ein HSP70 Substrate rekrutieren, was eine Zahl von 89 dieser Cochaperone in *Arabidopsis thaliana* für nur 12 HSP70-Proteine erklärt (Miernyk, 2001; Sung et al., 2001).

Eine weitere Gruppe von Hilfsproteinen steht den Chaperonen mit den Nukleotidaustauschfaktoren zur Seite. Im Cytosol befinden sich den Austausch von ADP durch ATP erleichternde (Bag-1) und erschwerende Proteine (Hip). Andere vermindern die ATPase Aktivität von HSP70 und verhindern die Ablösung der Substrate (CHIP). In Prokaryoten steht HSP70 der Nukleotidaustauschfaktor GrpE zur Verfügung. Er erfüllt die gleiche Funktion wie Bag-1 ist diesem jedoch nicht homolog.

Nur durch den kontrollierten Austausch von ADP durch ATP und regulierte ATP-Hydrolyse können HSP70-Chaperone ihren vielen spezifischen Aufgaben in der Zelle gerecht werden.

2.2.2. Das plastidäre Chaperonsystem

Nicht nur in Bakterien und im Cytosol eukaryotischer Organismen sind Chaperonsysteme zu finden, sondern auch in den Zellorganellen. Sowohl Mitochondrien wie auch Chloroplasten verfügen über Hitzeschockproteine, die dort verschiedene Aufgaben erfüllen.

Für diese Arbeit am wichtigsten stellt sich aber das HSP70-HSP90-System im Stroma der Chloroplasten dar. Daher soll im Folgenden auf die einzelnen Beteiligten eingegangen werden.

2.2.2.1. HSP70B und seine Partner

Es sind insgesamt drei plastidäre HSP70-Chaperonsysteme gefunden worden (Schroda, 2004), von denen eines im Stroma lokalisiert ist. Dieses, dort als HSP70B bezeichnete Chaperon ist an Proteinfaltung beteiligt, scheint aber auch die Zelle durch Reparatur des Photosystems II bei Schäden durch zu starke Lichteinstrahlung (Photoinhibition) zu schützen. Es kann sowohl durch Hitzeschock wie auch durch Licht nach einer Dunkelphase (Dunkel-Licht-Shift) induziert werden (Drzymalla et al., 1996; Schroda et al., 1999). Das stromale HSP70B ähnelt seinen bakteriellen Homologen wie DnaK aus *Escherichia coli* mehr als den cytosolischen in Eukaryoten. Wie DnaK besitzt auch HSP70B Cochaperone, die spezifische Funktionen vermitteln. Dabei handelt es sich z.B. um das Homolog des Nukleotidaustauschfaktors GrpE, das im Chloroplasten mit CGE1 (chloroplast GrpE homolog) bezeichnet wird. Es sind zwei Isoformen dieses Proteins gefunden worden, die durch Temperatur-abhängiges Splicing entstehen. Sie unterscheiden sich in nur zwei zusätzlichen Aminosäuren in CGE1b gegenüber CGE1a, was CGE1b aber eine höhere Affinität in der Bildung von Komplexen mit HSP70B verleiht. Sie werden wie dieses durch Hitzeschock und Licht induziert und bilden über eine N-terminale Coiled-coil-Domäne funktionelle Dimere (Willmund et al., 2007; Schroda et al., 2001).

Des Weiteren sind im Stroma der Chloroplasten auch Mitglieder der J-Domänen-Proteine zu finden. Über eine Suche in EST-Datenbanken von *Chlamydomonas* ESTs, die für Proteine mit Chloroplastentransitsequenz und J-Domäne kodieren, wurden mehrere potentielle Cochaperone von HSP70B identifiziert. Das als CDJ1 (chloroplast DnaJ protein 1) bezeichnete Protein weist dabei eine große Ähnlichkeit zu DnaJ aus *E.coli* auf und wird vermutlich denaturierte Proteine an HSP70B übergeben. CDJ2 dagegen weist keine Homologie zu bakteriellen J-Domäne-Proteinen auf und erfüllt andere Funktionen mit HSP70B (Liu et al., 2005).

2.2.2.2. CDJ2 und VIPP1

Da CDJ2 im Rahmen dieser Diplomarbeit eine wichtige Rolle spielt, soll es hier etwas ausführlicher vorgestellt werden. Es handelt sich dabei um ein lösliches Protein mit einer Größe von 31,8 kDa, das nicht durch Hitzeschock induziert wird. CDJ2 ist vornehmlich im Stroma der Chloroplasten lokalisiert. Mit HSP70B konnte eine direkte Interaktion durch Co-Immunopräzipitation nachgewiesen werden (Liu et al., 2005). Auch wenn CDJ2 aus *Chlamydomonas* sich vom bakteriellen DnaJ unterscheidet, finden sich trotzdem Homologe in höheren Pflanzen z.B. in *Arabidopsis* und Reis, jedoch nicht in Cyanobakterien. CDJ2 enthält ein N-terminales Chloroplasten-Transitpeptid und eine J-Domäne. Zwei Regionen der Sequenz bilden aller Voraussicht nach Coiled-coil Strukturen, zwei weitere sind scheinbar nur in *Chlamydomonas* und nicht in höheren Pflanzen anzutreffen. Die Funktion dieser Sequenzen liegt zurzeit noch im Dunkeln.



Abb. 2: Alignment der CDJ2-AS-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* (A.t.), *Oryza sativa* (O.s.) und *Chlamydomonas reinhardtii* (C.r.). Das Chloroplasten-Transitpeptid ist durch eine unterbrochene Linie gekennzeichnet, die J-Domäne gepunktet und mögliche Coiled-coil-Domänen mit durchgehender Linie unterstrichen. Quelle: Liu et al. (2005)

Da sich CDJ2 von CDJ1 in den Domänen für die Proteinbindung deutlich unterscheidet, liegt die Rolle von CDJ2 als Cochaperon daher wohl in der Rekrutierung von speziellen Substraten für HSP70B. CDJ2 konnte bis jetzt vor allem mit einem Substrat in Verbindung gebracht werden: VIPP1 (vesicle inducing protein 1). Nachgewiesen ist in *Chlamydomonas* eine bestehende Interaktion zwischen VIPP1, CDJ2, HSP70B und CGE1 (Liu et al., 2005; 2007). Dabei kann HSP70B zusammen mit CDJ2 und CGE1 den Auf- und Abbau von ringförmigen Strukturen mit Größen von mehr

als 1 MDa aus VIPP1 durchführen und ist zumindest am Abbau von stäbchenförmigen VIPP1 Komplexen in Ringe beteiligt (Liu et al., 2007).

2.2.2.3. VIPP1 und seine vermuteten Funktionen im Chloroplasten

Das Protein VIPP1 wurde 1994 in *Pisum sativum* (Erbse) identifiziert und stellt ein Homolog zum bakteriellen PspA (phage shock protein A) dar (Li et al., 1994). Es wurde als essentieller Bestandteil der Thylakoidmembranbildung und -instandhaltung identifiziert, wobei die genaue Funktion noch unklar ist. Mutationen in VIPP1 führen zu Defekten an der Biogenese der Thylakoidmembran in *Arabidopsis* und zum erkennbaren Verlust von Vesikelbildung zwischen der inneren Membran der Chloroplasten und der Thylakoidmembran. Obwohl keine Ähnlichkeit zu Bestandteilen von Transportsystemen des Cytoplasmas feststellbar ist, wird daher eine Beteiligung an der Bildung von Transportvesikeln erwartet (Kroll et al., 2001). Alternativ kann jedoch auch eine Funktion in Verbindung mit Importvorgängen in das Lumen als mögliche Ursache für den auftretenden Phänotyp vermutet werden. Defekte an den Sec- und Tat-Importsystemen zeigen nachweislich einen vergleichbaren Phänotyp, also Defekte bei der Thylakoidmembran-Biogenese, wobei der Verlust der Fähigkeit zur Vesikelbildung dann wohl auf einen sekundären Effekt zurückzuführen ist (Settles et al., 1997). Das VIPP1-Homolog PspA stellt in Bakterien den erfolgreichen und effektiven Transport aus der Zelle über die Sec- und Tat-Translokationswege sicher (Kleerebezem and Tommassen, 1993; DeLisa et al., 2004). Eine verwandte Funktion von VIPP1 beim Proteintransport über die Thylakoidmembran wäre daher durchaus zu erwarten.

2.2.2.4. HSP90C: Auf der Suche nach seiner Funktion mit RNAi

HSP90C ist nur in einem Teil dieser Arbeit von Bedeutung und soll daher nur kurz vorgestellt werden. Während für cytosolisches HSP90 zahlreiche Cochaperone und Interaktionspartner bekannt sind, konnten in Chloroplasten und anderen Organellen lange keine Interaktionspartner ausgemacht werden. Wie Untersuchungen an *Chlamydomonas* zeigen, kommt das plastidäre HSP90 hauptsächlich im Stroma vor, ist aber auch assoziiert an Thylakoidmembran und innerer Hüllmembran zu finden. Plastidäres HSP90 in *Chlamydomonas* wird als HSP90C bezeichnet und liegt in aktiver Form als Dimer vor; es ist löslich und zeigt ATPase-Aktivität. Durch Hitzeschock ist es klar induzierbar. Am

wichtigsten aber ist der Nachweis, dass HSP90C mit dem stromalen HSP70B in höhermolekularen Komplexen interagiert (Willmund and Schroda, 2005). Damit scheint auch im Chloroplasten ein HSP70/HSP90-Multichaperonsystem vorzuliegen. Beteiligte Cochaperone und Substrate müssen allerdings noch identifiziert werden.

Erste Informationen über die Bedeutung und mögliche Funktionen von plastidärem HSP90 wurden jedoch bereits durch *Arabidopsis*-Mutanten gewonnen. Die dort als chlorate resistant 88 (cr88) bezeichnete Mutation bewirkt eine verzögerte Chloroplastenentwicklung und Deethiolierung in Rotlicht sowie reduzierte Expression von einigen normalerweise lichtinduzierten Genen (*NR2*, *CAB* und *RBCS*). Daher lässt diese Punktmutation im C-Terminus des *HSP90*-Gens eine Rolle des Chaperons in der Signaltransduktion vom Chloroplasten in den Kern vermuten (Lin and Cheng, 1997; Cao et al., 2000; 2003).

Durch Verwendung von RNA-Interferenz zur Unterexpression von HSP90C kann vielleicht über die Entstehung charakteristischer Phänotypen ein Einblick in die Funktion des plastidären Chaperons geworfen werden.

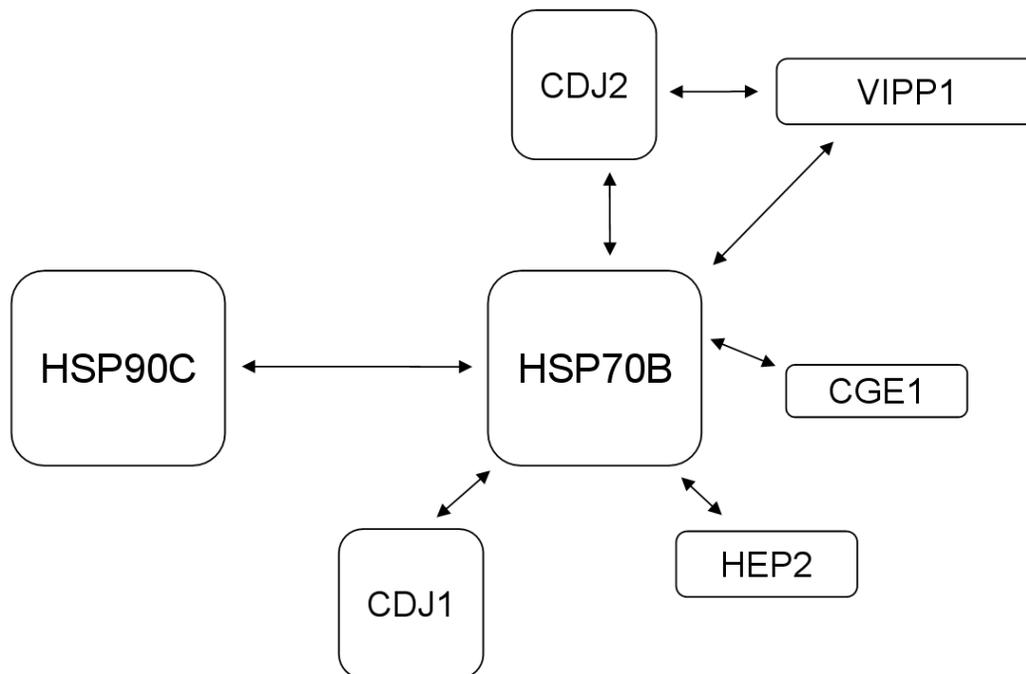


Abb. 3: Schematische Darstellung des HSP70/HSP90-Chaperonsystems im Stroma der Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii*. Die Abbildung stellt den zu Beginn der Arbeit bekannten Erkenntnisstand dar. Nachgewiesene Interaktionen werden durch Pfeile angedeutet.

2.3. Zielsetzung

Aufgrund der bereits vorliegenden Ergebnisse im Zusammenhang mit dem HSP70/HSP90-Chaperonsystem im Chloroplasten von *Chlamydomonas reinhardtii* sollten im Rahmen dieser Arbeit mehrere Teilgebiete des Chaperonsystems untersucht werden.

Im ersten Teil der Arbeit stand die Überprüfung und Charakterisierung möglicher Interaktionspartner der Proteine HSP70B, HSP90C und VIPP1 im Vordergrund. Dies sollte unter Verwendung bereits vorhandener Antikörper gegen die potentiellen Substrate erfolgen.

Über eine grobe Fraktionierung in lösliche und membrangebundene Proteine sowie die genaue Lokalisierung im Chloroplasten sollte die theoretische Möglichkeit zur Interaktion der Chaperone mit den Partnerproteinen festgestellt werden. Ein Vorkommen im gleichen Kompartiment der Chloroplasten ist selbstverständlich unbedingte Voraussetzung für die biologische Funktion einer Interaktion. Die Überprüfung der Induzierbarkeit durch Licht stellt einen ersten Schritt zur Einordnung der Funktion dar. Durch Co-Immunopräzipitationen sollte dann eine gemeinsame Anreicherung beider Partner durch spezifische Antikörper und damit eine Interaktion gezeigt werden.

Ein weiterer Teilabschnitt dieser Arbeit sollte sich mit der Suche nach Anzeichen der Beteiligung von HSP90C an der Lichtsignaltransduktion beschäftigen. Durch gezielte Unterexpression von HSP90C mithilfe der Technik der RNA-Interferenz sollte daher eine Reihe von Untersuchungen wie Hitzeschockkinetik, Dunkel-Licht-Shift und Proteindisplay Auskunft über einen möglichen charakteristischen Phänotyp geben.

Der dritte und damit letzte Aspekt zielte auf eine Beschäftigung mit dem Cochaperon CDJ2 und der Suche nach weiteren Interaktionspartnern. Ein Wachstumsstopp bei der Überexpression des Proteins in *E.coli* führte zu der Fragestellung, was das *Chlamydomonas*-Protein CDJ2 im Bakterium bewirkt, um diesen Phänotyp auszulösen. Durch Massenspektrometrie sollten mit CDJ2 in *E.coli* interagierende Proteine identifiziert werden.

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Verwendete Software/ Internet Adressen

- Scannen von Gelen bzw. dem Erstellen des Autoradiogramms von Phosphor-Imager-Platten mit Quantity One (BIORAD)
- Klonieren *in silico* mit Clone Manager
- Multiple Sequenzvergleiche (Alignments) mit dem Programm ClustalW:
<http://align.genome.jp>
- BLAST-Suche:
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
- Genom von *Chlamydomonas reinhardtii*:
<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>
- ESTs:
<http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/index.html>
- Translation (Nukleotidsequenz → Proteinsequenz):
<http://www.expasy.org/tools/dna.html>

3.1.2. Geräte

- Zentrifugen
 - Sorvall RC-5
 - Sorvall RC-56
- Tischzentrifugen
 - Eppendorf 5415R
 - Eppendorf 5415D
 - Eppendorf 5415C
- SpeedVac
 - Backofer; Vacuum Concentrator
- Ultrazentrifuge
 - Beckman LE70

3.1.2.1. Westernblot

- Amersham Bioscience Hofer™ TE 77
- Semidry Transfer

3.1.2.2. Scanner

- Molecular Imager FX (BIORAD)
- Gelscanner 701 Calibrated Imaging (BIORAD)

3.1.2.3. PCR-Block

- PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research)

3.1.2.4. Zellaufschluss

- Sonizierer: Sinifier 250 (Branson)
- Glas-Col Nebulizer

3.1.2.5. Photometer

- Ultrospec 1100pro (AmershamBioscience)

3.1.3. Antikörper

Der Antikörper gegen SecA aus *E.coli* (α SecA) wurde von der Arbeitsgruppe M. Müller des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie in Freiburg zur Verfügung gestellt.

Für die Experimente wurde von allen Antikörpern die dritte Blutung verwendet.

Tabelle 1 Verwendete Antikörper, Verdünnung und Herkunft

Antikörper	Verdünnung	Herkunft
α SecA	1:2000 / 1:1000	AG Müller
α HSP70B	1:10000 / 1:2000	AG Schroda
α HSP90C	1:3000	AG Schroda
α CDJ2	1:2000 bis 1:500	AG Schroda
α DnaK	1:2000	AG Schroda
α PspA	1:1000	AG Schroda
α VIPP	1:5000	AG Schroda
α 70-kDa-Protein	1:2000	AG Schroda
α Thioesterase	1:2000 / 1:200	AG Schroda
α VAP	1:10000 / 1:200	AG Schroda
α CGE1	1:10000	AG Schroda
α Cytf	1:10000	AG Wollman (Paris)

3.1.4. Bakterienstämme

E.coli-Zellen:

- DH5 α
- M15[pREP4] (Qiagen)
- ER2566 (NEB)

3.1.5. *Chlamydomonas reinhardtii* - Stämme

In den Experimenten dieser Arbeit wurden verschiedene Stämme der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* verwendet.

- A1⁻, ein Wildtypstamm
- CF54, ein Stamm ohne Zellwand und Geißeln; Arbeitsname CW15(2) (Schroda et al., 1999)
- Stamm 325 *arg7* aus Liège zur Transformation

3.2. Arbeiten mit Bakterien

3.2.1. Medien

LB Flüssigmedium (1 Liter)

10 g Bacto-Trypton
5 g Bacto-Hefe-Extrakt
10 g NaCl
950 ml ddH₂O
mit NaOH auf pH 7 eingestellt

LB Agarplatten (mit Ampicillin)

pro 1 Liter LB Medium
15 g Agarose
100 µg/ml Ampicillin

3.2.2. Bestimmung der optischen Dichte

Die optische Dichte (OD) wurde bei einer Wellenlänge von 600 nm photometrisch ermittelt. Gemessen wurde die entsprechende Kultur in Einmalküvetten gegen LB Medium als Referenz.

3.2.3. Hitzeschock-Transformation

Zu 50 µl kurz angetauten, chemokompetenten *E.coli* Zellen (hergestellt nach Sambrook et al., (1989)) wurden 0,4 µl (10 µl nach einer Ligationsreaktion) der zu transformierenden Plasmidlösung gegeben, beides vermischt und für 30 min auf Eis gestellt. Anschließend wurde das Gefäß für 2 min im Heizblock bei 42°C inkubiert und erneut für 5 min auf Eis gestellt. Dann wurden 800 µl LB Medium zugegeben und der Reaktionsansatz für 1 h bei 37°C aufbewahrt. 200 µl (800 µl nach Ligationsreaktion) der Zellen wurden anschließend auf eine LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen. Nachdem die Flüssigkeit auf den Platten getrocknet war, wurden diese ü.N. bei 37°C inkubiert. Danach konnten die Platten bis zur Verwendung bei 4°C aufbewahrt werden.

3.2.4. Minipräparation von Plasmid-DNA

<u>Lösung I</u>	<u>Lösung II</u>	<u>Lösung III</u>	<u>TE-Puffer</u>
50 mM Glucose	0,2 N NaOH	3 M Kaliumacetat	10 mM Tris-HCl pH 7,5
25 mM Tris-HCl pH 8,0	1% SDS	5 M Acetat	2 mM EDTA
10 mM EDTA pH 8,0			

3 ml *E.coli*-Kultur wurden aus Kolonien transformierter *E.coli*-Zellen in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicilin bei 37°C ü.N. unter Schütteln inkubiert. 1,5 ml wurden davon in Eppendorf-Gefäße gegeben und 20 s bei 13000 rpm (Tischzentrifuge) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I resuspendiert und mit 200 µl Lösung II versetzt. Die Gefäße wurden vorsichtig invertiert, bis die Probe klar wurde, dann wurden 150 µl Lösung III zugegeben und geschüttelt. Die genomische DNA und präzipitierte Proteine wurden danach 10 min bei 12500 rpm abzentrifugiert und der Überstand anschließend in neue Gefäße überführt, in die 280 µl Isopropanol vorgelegt wurden. Der Ansatz wurde gemischt, 30 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (15 min bei 4°C). Das nun Plasmid-DNA enthaltende Pellet wurde in 400 µl 70% Ethanol aufgenommen, gemischt, 5 min bei 4°C zentrifugiert und im Vakuum getrocknet. Nach vollständiger Trocknung wurde es in 50 µl TE-Puffer mit 20 µg/ml RNaseA resuspendiert.

3.3. Arbeiten mit *Chlamydomonas reinhardtii*

3.3.1. Kulturbedingungen

Die Kulturen wurden photomixotroph in flüssigem TAP Medium (Harris, 1989) auf einem rotierenden Schütter oder auf TAP-Agarplatten bei 23°C und Dauerlicht (30 µE m⁻²·s⁻¹; Leuchtröhren L36W/25 von Osram) angezogen.

3.3.2. Medien

TAP (Flüssig-Medium)

5 mM K-Phosphatpuffer pH 7
 0,5% Spurenelementlösung (v/v)
 0,02 x Beijerincksalz-Lösung
 pH auf 7,2 mit Essigsäure eingestellt

Phosphatpuffer

250 mM K₂KPO₄
 pH mit 1 M KH₂PO₄
 auf 7 eingestellt

Spurenelementlösung (1 Liter)

11,4 g H₃BO₃
 22 g ZnSO₄·4H₂O
 5,06 g MnCl₂·4H₂O
 4,99 g FeSO₄·7 H₂O
 1,61 g CoCl₂·6 H₂O
 1,57 g CuSO₄·5 H₂O
 1,1 g (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O

Beijerincksalz-Lösung (1 Liter)

10 g NH₄Cl
 2 g CaCl₂·2H₂O
 4 g MgSO₄·7H₂O

3.3.3. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Neubauer-Kammer bestimmt. Es wurden 8 Großquadrate mit jeweils 16 Kleinquadraten ausgezählt. Die Fläche eines Großquadrates beträgt 0,2 mm² und die Tiefe 0,1 mm. Die durchschnittliche Zellzahl berechnet sich also wie folgt:

Durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat / (4·10⁻³ mm³) = Zellen/μl bzw.

Durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat · ¼ · 10⁶ = Zellen/ml

3.3.4. Transformation

24 ml *Chlamydomonas*-Kultur (Stamm 325 *arg7* aus Liège) mit einer Zelldichte von etwa 5,5x 10⁶ Zellen/ml wurden für 5 min bei 4000 rpm und RT zentrifugiert. Die dafür benutzten GSA-Gefäße wurden vorher mit 70 % Ethanol gewaschen und unter der Sterilbank getrocknet. Das Pellet wurde in 330 μl TAP vorsichtig durch Schwenken resuspendiert. Mit einer mit 70%igem Ethanol gewaschenen Pipette wurden die 330 μl der Zellen in 2 ml-Gefäße gefüllt, in denen 0,5 g sterile Glaskügelchen (Ø: 0,4-0,6 mm) und 300 ng DNA vorgelegt waren. Die Ansätze wurden genau 15 s durch Vortexen gemischt. Nach Zugabe von je 670 μl TAP-Medium wurden die Zellen anschließend auf je zwei Agarplatten ausplattiert und ins Licht gestellt.

3.3.5. Zellernte**3.3.5.1. Zellernte für RNA- und Protein-Extraktion**DTT-Carbonat

0,1 M DTT
 0,1 M Na-Carbonat

2x Lysepuffer

100 mM Tris-HCl pH 8.0
 600 mM NaCl
 4% SDS (w/v)
 10 mM EDTA

SDS-Sucrose-Puffer

5% SDS (w/v)
 30% Sucrose (w/v)

Die Proben wurden direkt nach Probenentnahme mit Eis versetzt, in den Corex-Gefäßen 5 min bei 5000 rpm und 4°C (SS-34 Rotor) zentrifugiert, der Überstand entfernt und das

Pellet durch Vortexen resuspendiert. Die Zellen wurden anschließend in Eppendorf-Gefäße überführt und mit ddH₂O auf ~600 µl aufgefüllt. 100 µl davon wurden in ein weiteres Gefäß gegeben und kurz abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und zum Pellet 60 µl DTT-Carbonat gegeben (**Proteinprobe**). Zu den verbliebenen 500 µl im ersten Gefäß wurde 500 µl 2x Lysepuffer gegeben und ausgiebig gemischt (**RNA-Probe**).

Die Proteinproben wurden vor dem Beladen auf das SDS-Gel mit 55 µl SDS-Sucrosepuffer versetzt, 45 s gekocht, die Proteinkonzentration bestimmt und das Volumen so eingestellt, dass jeweils gleiche Proteinmengen auf ein Gel geladen wurden.

3.3.5.2. Zellernte RNAi-Stämme

Von den ausgewählten Transformanten wurden Zellkulturen von jeweils 3 ml angezogen. Es wurden von jeder Kultur 3 ml geerntet und in der oben angegebenen Menge DTT-Carbonat (60 µl) und SDS-Sucrose (55 µl) aufgenommen. Für das Screening wurden je 25 µl auf ein großes Gel geladen.

3.4. Molekularbiologische Methoden

3.4.1. RNA-Isolierung

Die gefrorenen Zellen wurden 10 min bei 65°C aufgeschlossen, 132 µl 2M KCl zugesetzt, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Dann wurden sie für 15 min bei RT und 12500 rpm zentrifugiert (Tischzentrifuge) und der Überstand in ein neues Gefäß überführt, in dem 500 µl Phenol/Chloroform vorgelegt waren. Diese Lösungen wurden ausgiebig gemischt, zentrifugiert (s.o.) und die Oberphase in ein neues Gefäß überführt, in dem 500 µl Chloroform/Isoamylalkohol vorgelegt waren. Die Gefäße wurden erneut gut gemischt und zentrifugiert, die Oberphase in 300 µl 8M LiCl überführt und ü.N. bei 4°C inkubiert. Nun wurde die RNA für 15 min bei 12500 rpm und 4°C pelletiert und der Überstand vollständig entfernt. Das Pellet wurde in 180 µl DEPC-H₂O resuspendiert, 20 µl 3M Na-Acetat zugegeben, gemischt, 500 µl 100%iger Ethanol zugegeben und 15 min auf Eis präzipitiert. Anschließend wurde 15 min bei 12500 rpm und 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und 500 µl 70%iger Ethanol zugegeben. Dies wurde

gemischt, erneut 5 min zentrifugiert, dann der Überstand vollständig entfernt und das Pellet bei RT getrocknet. Das trockene Pellet wurde in 30 µl DEPC-Wasser resuspendiert und bei -80°C gelagert.

Die Konzentration der RNA wurde dadurch bestimmt, dass 1,5 µl RNA in 600 µl destilliertes Wasser gegeben wurde und die Absorption bei 260 nm gegen reines Wasser gemessen wurde. Der Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet.

3.4.2. Gelelektrophorese

3.4.2.1. Formaldehyd-Gelelektrophorese

10x MOPS-Puffer

10 mM EDTA
80 mM Na-Acetat
200 mM MOPS

Denaturierungspuffer

69% Formamid (v/v)
7% MOPS (v/v)
8,9% Formaldehyd (v/v)

Formaldehydgel-Ladepuffer

50% Glycerin (v/v)
1 mM EDTA
3,5% Bromphenolblau (v/v)

Formaldehydgel

1,2% Agarose (w/v)
1x MOPS
2,2 M Formaldehyd

Bis maximal 11 µg RNA, abhängig von der RNA-Konzentration der Proben, wurden mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 8 µl gebracht, 21,1 µl Denaturierungspuffer zugegeben und gemischt. Dies wurde dann 15 min bei 68°C erhitzt, auf Eis wieder abgekühlt und 3 µl Formaldehyd-Ladepuffer mit 1 µg Ethidium-Bromid pro Probe zugegeben. Pro Probe wurden 30 µl auf das vorbereitete Formaldehyd-Gel geladen. Die Elektrophorese wurde bei 85 V in 1x MOPS als Laufpuffer durchgeführt. Zur Kontrolle wurde das Gel anschließend auf dem UV-Tisch fotografiert.

3.4.2.2. Agarose-Gelelektrophorese

Für die Auftrennung von DNA-Fragmenten der Größe 300-2.500 bp wurden 1%ige Agarosegele mit großen Taschen für anschließende Extraktion aus dem Gel oder mit kleinen Taschen für Testverdauansätze verwendet.

50 x TAE Puffer

20 mM Tris-Acetat
0,5 mM EDTA

Agarosegel

1 bzw 2% Agarose
0,5 x TAE Puffer
0,5 µg/ml Ethidium-Bromid

6x Ladepuffer

0,25% Bromphenolblau
0,25% Xylenecyanol FF
30% Glycerol

Zu 15 μ l einer DNA-Probe wurde 3 μ l 6x Ladebuffer zugegeben, diese auf das Gel geladen und die Elektrophorese bei 100 V in 0,5x TAE Laufpuffer durchgeführt.

3.4.3. Northern-Transfer und Hybridisierung

3.4.3.1. Northern-Transfer

<u>Alkali-Puffer</u>	<u>Neutralisierungspuffer</u>	<u>1M Phosphatpuffer pH 6,5</u>
50 mM NaOH 10mM NaCl	100 mM Tris-HCl pH 7,5	1 M Na ₂ HPO ₄ 1 M NaH ₂ PO ₄

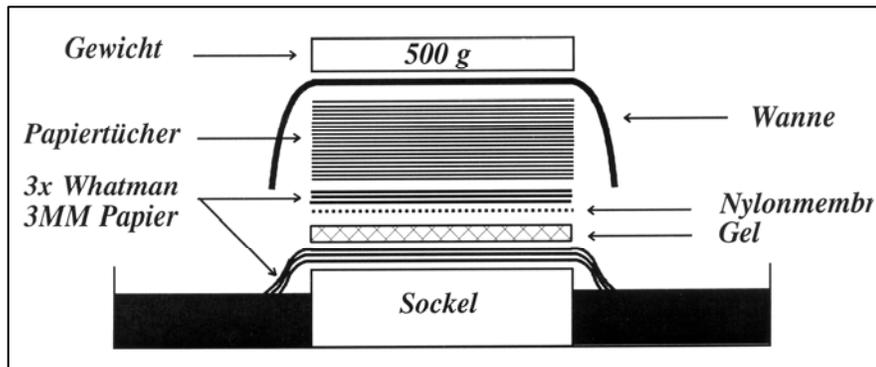


Abb. 4: Aufbau eines Northern-Transfers, schematisch (aus: Biochemisches Großpraktikum, Skript Schroda)

Nach der Formaldehyd-Gelelektrophorese wurde das Gel so zugeschnitten, dass Erhebungen am Rand des Gels entfernt wurden. Das Gel wurde für 30 min in der Alkalilösung unter vorsichtigem Schütteln inkubiert, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und für 10 min in Neutralisationspuffer gelegt. Die Blottingwanne wurde währenddessen mit ca. der Hälfte des Phosphatpuffers gefüllt und drei Lagen Whatman-Papier auf 19 x 45 cm zugeschnitten. Zusätzlich wurden zwei Whatman-Papiere sowie die Membran (Hybond N; Amersham) auf Gelgröße zugeschnitten. Die Transferapparatur wurde gemäß Abb. 4 aufgebaut. Der Transfer fand ü.N. statt (mindestens 16 h).

3.4.3.2. Hybridisierung

<u>100x Denhardt's</u>	<u>20x SSC (1 Liter), pH 7</u>
2% BSA (w/v)	175,2 g NaCl
2% Ficoll-400 (w/v)	88,2 g Na-Citrat
2% PVP (w/v)	800 ml ddH ₂ O

0,2x SSC-Hybridisierungslösung

55% Formamid (v/v)
10x Denhardt's
50 mM Tris-HCl pH 7,5
1x SSC
0,1 % Na-Pyrophosphat (v/v)
1% SDS (v/v)
200 µg/ml Heringssperma-DNA
800 µl H₂O
1 g Dextransulfat

10x Nukleotidlösung

200 µM dATP
200 µM dTTP
200 µM dGTP
500 mM Tris-HCl pH 7,8
50 mM MgCl₂
100 mM β-Mercaptoethanol

Die Hybridisierungsröhrchen wurden mit etwas 2x SSC gespült und die Membran mit der RNA-Seite zum Rohrrinnenraum eingeschoben. Dann wurde diese mit etwas 2x SSC benetzt, 10 ml Hybridisierungslösung zugegeben und mindestens 2 h bei 65°C vorhybridisiert. Währenddessen wurden die Sonden vorbereitet und radioaktiv markiert: In ein Eppendorfgefäß wurden 7 µl TE-Puffer und 5 µl 1 M HEPES-KOH pH 6,7, sowie 0,5 µl Primer (3 µg/µl) zugegeben. Dazu kamen 12-25 ng des DNA-Fragments. Der Ansatz wurde 10 min gekocht, kurz zentrifugiert und für 15 min bei RT abgekühlt. Anschließend wurden 2,5 µl 100 mM β-Mercaptoethanol und 2,5 µl Nukleotidlösung hinzupipettiert. Im Isotopenlabor wurden dann 0,5 µl Klenow-Fragment mit 2-5 U/µl zugegeben. Die Sonde wurde mit 2,5 µl ³²P-dCTP (10 µCi/µl; Amersham) radioaktiv markiert.

Die Probe wurde 2-5 h bei 37°C inkubiert, nach Zusatz von 75 µl TE 5 min bei 95°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und direkt in das Hybridisierungsröhrchen gegeben. Die Hybridisierung verlief ü.N. Nach Entfernen der Hybridisierungslösung wurde die Membran zweimal mit 2x SSC und einmal mit 1x SSC/1% SDS (30 min) gewaschen. Die Membran wurde erneut in 0,2x SSC gewaschen und konnte dann in einer Klarsichthülle auf einer Phosphor-Imager Platte (Fuji) exponiert werden. Die Platte wurde am nächsten Tag eingelesen.

3.4.4. DNA Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentration wurde mit 1,5 µl DNA in 600 µl destilliertem Wasser gegen eine Referenz reinen Wassers durch die Absorption bei 260 nm gemessen. Der Wert wurde mit dem Verdünnungsfaktor verrechnet und in µg/µl angegeben.

3.4.5. PCR

Tabelle 2 Liste der verwendeten Primer

Nr.	Name	Sequenz 5' - 3'	Gen/Konstrukt	Datum
26	Bam-Nco-cpDnaJ	AAGGATCCATGGCAGCGAAGAAGCTTCTACGAC	CDJ2	06/06
27	cpDnaJ-BstEII	CGTGGGTAACCTAGCTTATTGAGCTTCTTCTTGAGC	CDJ2	06/06
293	SecA-XhoI	GGATCTCGAGCTTCTCCACACTGGTGGTTCC	SecA	11/06
294	SecA-SpeSap	GGACTAGTGCTCTTCCAACGCcTTCTTCAACAAGCTTTTTAAGAC	SecA	11/06
295	AtCDJ2-BamHI	GTtggatccGCTAGATCtTCTCCTTACGAGATTC	AtCDJ2	11/06
296	AtCDJ2-BstEII	CGTGGGTAACCTTGAAGCCAAGATCTTCTTC	AtCDJ2	11/06
297	CDJ2-D1	aAggatcCTATACGCAGGAGCCGCTGCC	CDJ2	11/06
298	CDJ2-D2	aaggatcCGGtCGGCCCAAGACGCTGG	CDJ2	11/06
299	CDJ2-D3	aaGgatcCGCCGCCTTCCGTGAGACTTC	CDJ2	11/06
300	CDJ2-D4	aaggAtcCCAACAAAGGCGCCAACAG	CDJ2	11/06
301	CDJ2nurJ-BstEII	AGTTGGTAACCGTACTCGGCCCTCTGCTTG	CDJ2	11/06

50µl Ansatz:

- 1x Taq-Puffer
- 3µl 25 mM MgCl₂
- 1 µl 10 mM dNTPs
- 2,5 µl DMSO
- je 1 µl 20µM Primer
- ~50 ng DNA
- auf 50 µl mit ddH₂O auffüllen

Der PCR-Block wurde auf 85°C vorgeheizt und 0,5 µl Taq-/Pfu-Polymerase (24:1) (5 U/µl, Fermentas) zugegeben.

Tabelle 3 Zyklus der PCR

Schritt	Temperatur	Zeitdauer	Temperatur
1. Erste Denaturierung	94°C	5 min	94°C
2. Denaturierung	94°C	30 s	94°C
3. Annealing	X °C	30 s	55°C
4. Elongation	72°C	1 min/kb	72°C
5. Ende	72°C	5 min	72°C
	4°C	∞	5°C

Die Schritte 2 bis 4 wurden 39 Mal wiederholt. Die Annealing-Temperatur betrug hier bei allen Templates 58°C. Die Elongationszeit lag für SecA bei 1,5 min, für alle anderen Konstrukte bei 1 min.

3.4.6. RT-PCR

Zur Klonierung von *CDJ2* aus *Arabidopsis thaliana* wurde zunächst eine Reverse Transkription mit den Primern „AtCDJ2-BamHI“ und „AtCDJ2-BstEII“ durchgeführt. Diese dauerte 30 min bei 50°C. Auf dem erhaltenen cDNA-Produkt wurde eine PCR-Reaktion vorgenommen. Durch die Temperaturabhängigkeit der verwendeten Enzyme können beide Schritte direkt in einem Ansatz erfolgen. Verwendet wurde das One-Step RT-PCR Kit von Qiagen.

50 µl Ansatz:

- 1x Puffer
- 2 µl 10 mM dNTPs
- je 2 µl 20µM Primer
- 2 µl Enzymmix (Reverse Transkriptase + Polymerase)
- 0,5 µl RNase out
- 1 µl RNA aus *A. thaliana*
- auf 50 µl mit ddH₂O (RNase frei) auffüllen

3.4.7. DNA-Präzipitation

Nach einer PCR-Reaktion wurde die DNA zunächst präzipitiert und aufgereinigt: 50 µl der Reaktion wurden mit 200 µl Chloroform-Isoamylalkohol (Verhältnis 24:1) gemischt und die Phasen durch eine fünfminütige Zentrifugation in der Tischzentrifuge bei maximaler Geschwindigkeit und Raumtemperatur wieder getrennt. Die obere wässrige Phase wurde in einem neuen Eppendorfgefäß mit 5 µl 3 M Natriumacetat und 125 µl 100%-Ethanol versehen. Durch eine Inkubation auf Eis für 30 min präzipitierte die DNA, die dann 15 min bei 13.000 rpm und 4°C in der Tischzentrifuge pelletiert wurde. Die DNA wurde anschließend mit 300 µl 70 % Ethanol gewaschen und für weitere 5 min bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C zentrifugiert. Das vakuumgetrocknete Pellet wurde in 25 µl TE-Puffer aufgenommen.

3.4.8. Restriktionsverdau

Für einen Restriktionsverdau wurden die zu den entsprechenden Restriktionsenzymen gehörigen mitgelieferten Puffer von NEB/Fermentas (gegebenenfalls mit BSA) 1:10

verdünnt, die zu schneidende DNA und 0,5 µl bzw. 2 U des Enzyms zugegeben und das Volumen mit ddH₂O auf 15 µl eingestellt. Zum Schneiden der DNA wurde der Ansatz ü.N. bei 37°C inkubiert.

3.4.9. Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten wurde T4-DNA-Ligase (Fermentas) eingesetzt, die sowohl *sticky*- als auch *blunt*-Ligationen katalysiert. Im Ansatz wurde das Endverhältnis der Inserts zum Vektor auf ~4:1 eingestellt. Dazu kamen 1 µl 10x Ligationspuffer (Fermentas) und 0,5 µl des Enzyms. Mit ddH₂O wurde auf 10 µl Endvolumen aufgefüllt, und der Ansatz 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde eine Hitzeschock-Transformation in den entsprechenden *E.coli*-Stamm durchgeführt.

3.4.10. DNA-Extraktion aus Agarosegelen (Jetsorb)

Aus dem Gel wurde die entsprechende Bande ausgeschnitten und die DNA mit dem Jetsorb Gel Extraction Kit der Firma Genomed aus dem SDS-Gel extrahiert. Das Gelstück wurde dazu in 300 µl Puffer A1 aufgenommen und mit 10 µl Jetsorb-Glaskügelchen gemischt. Um die Agarose auszulösen, wurde die Mischung 15 min bei 50°C unter mehrmaligem Schnippen erhitzt. Die Kügelchen mit der adsorbierten DNA wurden wie auch in den übrigen Schritten für 30 s bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Dann wurden sie einmal mit 300 µl Puffer A1 und zweimal mit 300 µl Puffer A2 gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet 5-10 min im Vakuum im offenen Eppendorfgefäß getrocknet. Die Elution fand mit 25 µl TE-Puffer für 5 min bei 50°C statt. Nach der Zentrifugation wurde der die DNA enthaltende Überstand in ein neues Eppendorfgefäß überführt.

3.4.11. Klonierung von SecA in den TYB11-Expressionsvektor

Die cDNA von *Chlamydomonas-SecA* (AV642591) wurde vom Kazusa Research Institute (Japan) erhalten. Die cDNA ist mit den Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI in den Bluescript Vektor (Stratagene) kloniert.

Für die Überexpression sollten nur die Sequenzen, die für das reife Protein kodieren in den Expressionsvektor kloniert werden. So musste zuvor die für die Transitsequenz kodierende DNA entfernt werden. Die Spleißstelle der Transitsequenz wurde an der

Aminosäuresequenz VRV am N-terminalen Ende des SecA Proteins vorhergesagt. Für diesen Bereich wurde ein Primer mit den Schnittstellen SpeI und SapI konstruiert. Es wurde ein zweiter Primer für eine XhoI-Schnittstelle kurz vor einer natürlichen Sap-Schnittstelle erstellt. Die Klonierung der gesamten Sequenz erfolgte also in zwei Teilschritten.

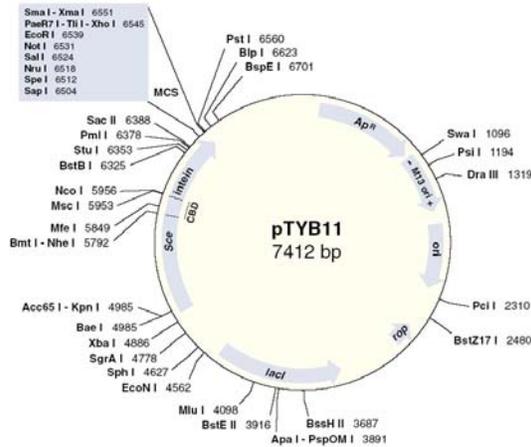


Abb. 5: Karte des Expressionsvektors pTYB11. CBD = Chitinbindedomäne aus *B. circulans* in Intein aus *Saccharomyces cerevisiae* eingebettet, ApR = Ampicillinresistenzmarker (β -Lactamase aus Tn3), Ori = Replikationsursprung pMB1 aus pBR322, M13 = Replikationsursprung aus M13, lacI = Lac-Repressor-Gen aus *E. coli*.

Auf der cDNA wurde entsprechend eine PCR durchgeführt, durch die ein Amplifikat mit einer Länge von 1358 bp erhalten wurde. Dieses wurde anschließend mit SapI und XhoI in die Fragmente der Größe 1333, 16 und 9 bp verdaut. Das Fragment des 5' Bereichs der SecA-Sequenz mit der Größe von 1333 bp wurde dann in den Expressionsvektor pTYB11 (New England Biolabs) ligiert, welcher zuvor mit SapI und XhoI verdaut wurde (Größe 7731 bp).

Das Plasmid wurde im Anschluss an die Ligation direkt in den *E. coli* Stamm DH5 α

transformiert. Durch das Anfertigen von Plasmid-Präparationen und einen anschließenden Testverdau konnten korrekte transformierte Kolonien gefunden werden.

In einem zweiten Schritt wurde mit AscI und XhoI verdaute cDNA, also das zweite Stück des SecA-Gens (Größe 3025 bp) in den ebenfalls verdauten Vektor TYB11 mit dem bereits klonierten Sequenzteil (Größe 7858 bp) ligiert.

So wurde ein reifes SecA-Fusionsprotein erhalten. Es enthält am N-Terminus ein Intein mit Chitinbindedomäne (CBD) zur Reinigung des exprimierten Proteins. Das entstandene Plasmid „11-SecA“ erhielt die Bezeichnung pMS463.

3.4.12. Klonierung von verschiedenen Deletionen des CDJ2 in pCB785

Um den beteiligten Sequenzabschnitt des CDJ2 in *Chlamydomonas* für eine mögliche Interaktion mit SecA zu bestimmen, wurden verschiedene Deletionen in CDJ2 vorgenommen.

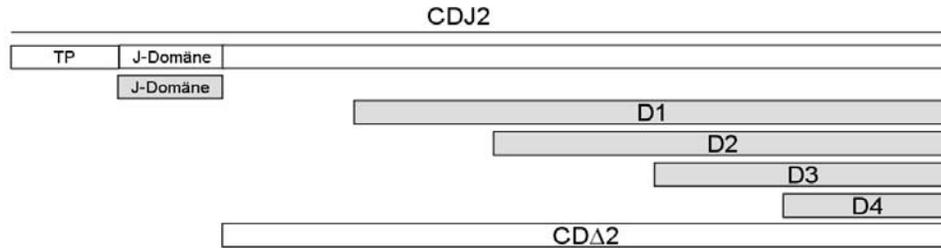


Abb. 6: Schematische Darstellung der N-terminalen Deletionen des *CDJ2*-Gens. Kloniert wurden jeweils die hier grau unterlegten Genabschnitte (D1-D4 sowie die J-Domäne). *CDJ2* und *CDΔ2* lagen bereits in pCB785 kloniert vor und sind hier weiß dargestellt.

Das vollständige *CDJ2* sowie *CDJ2* ohne J-Domäne (*CDΔ2*) lagen bereits im *E.coli*-Stamm M15 zur Überexpression vor. Daher boten sich weitere N-terminale Deletionen sowie die heterologe Expression der J-Domäne allein an.

Mit dem Plasmid pMS254, das die vollständige Sequenz des *CDJ2* enthält, wurden PCR-Reaktionen mit jeweils verschiedenen Primern durchgeführt. Es entstanden PCR-Produkte mit folgenden Größen:

D1: 599 bp; D2: 496 bp; D3: 337 bp; D4: 148 bp; „Nur J“: 274 bp

Diese Abschnitte wurden mit BamHI und BstEII verdaut und anschließend in den mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten Vektor pCB785 einligiert. Im Anschluss an die Ligation wurde in den *E.coli* Stamm DH5α eintransformiert und in den Kolonien über Plasmid-Präparationen nach korrekten Transformanten gesucht und diese nach einem Testverdau sequenziert. In einem zweiten Transformationsschritt wurden diese in den *E.coli* Stamm M15 transformiert. Die Proteinabschnitte tragen N- und C-terminale Hexahistidin-Tags zur Aufreinigung mit Ni-NTA Superflow.

3.4.13. Klonierung von *CDJ2* aus *Arabidopsis thaliana* in pCB785

Um die *CDJ2*-cDNA aus *Arabidopsis* zu erhalten, musste zunächst eine reverse Transkription auf der mRNA einer Wildtyp-Pflanze durchgeführt werden. Direkt im Anschluss konnte diese cDNA für eine PCR-Reaktion genutzt werden. Das entstehende PCR-Produkt besaß eine Größe von 603 bp.

Alle weiteren Schritte erfolgten analog zur Klonierung der N-terminalen *CDJ2*-Deletionen.

3.5. Biochemische Methoden

3.5.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970)

Elektrodenpuffer

24,8 mM Tris
134,2 mM Glycin
0,1% SDS (v/v)
1 mM EDTA pH 7,5

5x SDS Probenpuffer

225 mM Tris-HCl pH 6,8
50% Glycerol (v/v)
5% SDS (v/v)
0,25 M DTT
0,05%-Bromphenolblau (v/v)

2x SDS Probenpuffer

125 mM Tris-HCl pH 6,8
20% Glycerol (v/v)
4% SDS (v/v)
10% β -Mercaptoethanol (v/v) bei Immunopräzipitation für Silberfärbung weggelassen
0,005% Bromphenolblau (v/v)

Tabelle 4 Zusammensetzung von verschiedenen Trenn- und Sammelgelen

Lösungen Trenngel	Mini Gel 12%	Großes Gel 10%	Großes Gel 12%	Großes Gel 7,5-15%	
30% Acrylamid (ml)	2	26,6	32	9	18
1,5 M Tris-HCL pH 8,8 (ml)	1,25	20	20	9,54	9,2
Sucrose (g)	-	-	-	1,92	6,4
100 mg/ml APS (μ l)	25	200	200	70	65,4
TEMED (μ l)	1,5	20	10	10,2	7
Endvolumen (ml)	5	80	80	36	36
Lösungen Sammelgel	Mini Gel	Großes Gel			
30% Acrylamid (ml)	0,325	1,8			
0,5 M Tris-HCL pH 6,8 (ml)	0,62	4,5			
10% SDS (μ l)	25	-			
100 mg/ml APS (μ l)	12,5	120			
TEMED (μ l)	2,5	12			
Endvolumen (ml)	2,5	18			

Für massenspektrometrische Untersuchungen wurden SDS-Gele mit 30% Acrylamid und 0,8% des Crosslinkers PDA (Piparazindiacrylamid) verwendet.

3.5.2. Gelfärbungen

3.5.2.1. Silberfärbung

Das Gel wurde mindestens 1 h in 30 % Ethanol und 10 % Essigsäure fixiert, anschließend 3x für je 20 min in 25 % Ethanol entfärbt und für 20 min in Wasser gewaschen. Dann wurden die Proteine für 2 min in 2,5 mM Na₂S₂O₃ reduziert und das Gel erneut 2x je 5 min in Wasser gewaschen. Für die Färbung wurde dieses dann 30 min in 0,2 % AgNO₃ und 0,0296 % Formaldehyd in Dunkelheit inkubiert und anschließend 1 min mit Wasser gewaschen. Dann wurde das Gel in zwei Schritten in 3 % Na₂CO₃, 20 µM Na₂S₂O₃ und 0,0185 % Formaldehyd entwickelt. Die Entwicklung wurde nach Erlangen ausreichender Färbeintensität mit 2,5 % Essigsäure gestoppt, das Gel 30 min in Wasser inkubiert, gescannt und fotografiert.

3.5.2.2. Coomassiefärbung

Färbelösung

50% Methanol
7% Essigsäure
0,25% Servablauf (R-250)

Entfärbelösung

40% Ethanol
7% Essigsäure

Das Gel wurde für 30-60 min in der Färbelösung gefärbt, mit Wasser gespült, und je nach Bedarf in der Entfärbelösung inkubiert. Nach dem Scannen wurde das Gel bei Bedarf in Entfärbelösung mit Glycerol inkubiert und getrocknet.

3.5.3. Westerntransfer und immunologischer Proteinnachweis

3.5.3.1. Westerntransfer, semidry

T2 Puffer

25 mM Tris-HCl pH 10,4
20% Isopropanol

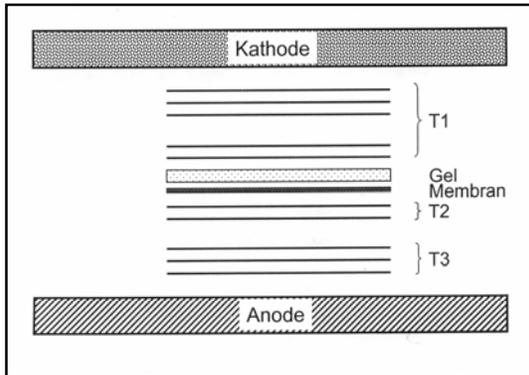
T1 Puffer

525 mg ε-Aminocaproinsäure
in 100 ml T2 Puffer

T3 Puffer

300 mM Tris-HCl pH 10,4
20% Isopropanol

10 Whatman-Papiere, sowie eine Nitrozellulosemembran (Hybond ECL; Amersham) wurden auf Gelgröße zugeschnitten. Der Transfer wurde gemäß Abbildung 7 aufgebaut und für 1 h durchgeführt. Die Intensität des Stroms ergab sich aus 0,8 mA/cm² Gelfläche. Wichtig ist, dass sowohl die Schichten des Whatman-Papiers als auch die Membran und das Gel luftblasenfrei aufeinander liegen. Nach dem Transfer wurde die Membran bei



Bedarf mit Ponceau-Färbelösung gefärbt, um zu überprüfen, ob der Transfer flächendeckend funktioniert hat.

Abb. 7: Schematischer Aufbau eines Western-Transfers aus 10 Whatmanpapieren, der Membran und dem Gel (aus dem Skript für das biochemische Großpraktikum, Teil Michael Schroda).

3.5.3.2. Immunologisches Nachweisverfahren

10x PBS

80 g NaCl
2 g KCl
14,6 g Na₂HPO₄
2 g KH₂PO₄
H₂O auf einen Liter

PBS-T

1 x PBS
0,1% Tween 20

PBS-TM

1x PBS mit 3% Milchpulver (w/v)

ECL Lösung I

100 mM Tris-HCl pH 8,5
2,4 mM Luminol
0,4 mM p-Cumarsäure

ECL Lösung II

100 mM Tris-HCl pH 8,5
0,000183 % H₂O₂ (v/v)

Um die unspezifischen Bindestellen der Nitrozellulosemembran abzusättigen, wurde diese im Anschluss an den Transfer für 1 h in PBS-TM unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde der primäre Antikörper in PBS-TM für 1 h zugegeben. Die Verdünnung des Antikörpers wurde entsprechend seiner Qualität gewählt (siehe Tabelle 1). Vor Zugabe des sekundären Antikörpers (α rabbit-IgG, Verdünnung 1:10.000 bzw. 1:12.000) wurde die Membran einmal für 15 min und zweimal für 5 min mit PBS-T gewaschen. Der sekundäre Antikörper wurde ebenfalls für 1 h inkubiert und die Waschschrte wie oben wiederholt. Alternativ wurde bei Immunopräzipitationen statt des sekundären Antikörpers ProteinA mit einer gekoppelten HRP in der Konzentration 1:10.000 verwendet.

Die Detektion erfolgte in der Dunkelkammer: Ein Whatman-Papier wurde in einer Belichtungskassette mit den beiden ECL-Lösungen (Verhältnis 1:1) getränkt. Darauf wurde die Membran gelegt und mit einer Kopierfolie abgedeckt. Überschüssige Lösung

wird entfernt. Der Film (Hyperfilm™ ECL™, AmershamBioscience) wurde entsprechend der Signalsstärke aufgelegt und anschließend entwickelt.

3.5.4. Bestimmung von Proteinkonzentrationen

3.5.4.1. Chlorophyllbestimmung

Um jeweils gleiche Konzentration an Gesamtprotein auf die Gele laden zu können, wurde die Chlorophyllkonzentration der einzelnen Proben bestimmt und das Probenvolumen entsprechend eingestellt. Von den Proben wurde je 10 µl zu 190 µl Wasser pipettiert, 800 µl Aceton zugegeben und die Ansätze 5 min auf Eis inkubiert. Um einen Trübungseffekt durch Partikel zu vermeiden, wurde der Ansatz für 5 min bei voller Leistung (Tischzentrifuge) abzentrifugiert. Danach wurde die Absorption photometrisch bei 645 und 663 nm bestimmt und mit folgender Formel der Chlorophyllgehalt in µg/µl berechnet:

$$[(A_{645} \times 17,76) + (A_{663} \times 7,34)]/10$$

Zur Bestimmung des Verhältnisses von Chlorophyll a zu Chlorophyll b wurde zusätzlich bei einer Wellenlänge von 750 nm gemessen und es wurden folgende Formeln zur Berechnung verwendet:

$$\text{Chl a: } [((A_{663} - A_{750}) \times 12,25) - ((A_{645} - A_{750}) \times 2,55)]/10$$

$$\text{Chl b: } [((A_{645} - A_{750}) \times 20,31) - ((A_{663} - A_{750}) \times 4,91)]/10$$

3.5.4.2. Proteinbestimmung mit Amidoschwarz (Popov et al., 1975)

Amidoschwarzlösung

0,5% Amidoschwarz (w/v)
in Waschlösung

Waschlösung

90% Methanol
10% Essigsäure

2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 µl BSA Standard (1 µg/µl) sowie 2-30 µg Protein wurden jeweils mit Wasser auf 200 µl Messvolumen gebracht, gemischt und kurz abzentrifugiert (12500 rpm; RT; Tischzentrifuge). Dazu wurden 800 µl Färbelösung gegeben, gründlich vermischt und 10 min bei 12500 rpm und 10°C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig entfernt und 800 µl Waschlösung zugegeben. Der Ansatz wurde gemischt, 10 min zentrifugiert und der Waschschrift wiederholt.

Nach dem Entfernen der zweiten Waschlösung wurden 800 µl 0,2 N NaOH zugegeben, gevortext und die Proben 5 min stehen gelassen. Nach erneutem Mischen wurden die

Proben in Einmalküvetten überführt und die Absorption bei 615 nm gegen reines 0,2 N NaOH gemessen.

3.5.5. Überexpression

3.5.5.1. Überexpression von CDJ2, CDA2 und anderen Deletionen

Der *E.coli* Stamm (M15), der mit dem Plasmid pMS254 (CDJ2), pMS269 (CDA2) bzw. den Plasmiden mit weiteren Deletionen von CDJ2 transformiert wurde, wurde auf eine LB Platte mit Ampicillin zu Einzelkolonien ausgestrichen. Eine Kolonie wurde in 10 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin ü.N. bei 37°C zu einer Vorkultur angezogen. Diese Vorkultur wurde in einen Liter des gleichen Mediums überführt und bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 angezogen. Die Expression des Proteins wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert und die Kultur bei 37°C für weitere Stunden unter Schütteln gehalten. Anschließend wurden die Zellen durch 10 min Zentrifugation bei 5000 rpm und 4°C geerntet. Das Pellet wurde bei -20°C eingefroren.

3.5.5.2. Wachstumskurve während der Überexpression

Die Aufnahme von Wachstumskurven erfolgte während der Proteinüberexpression vor und nach dem Induktionszeitpunkt. Es wurden wie bei der oben beschriebenen Vorkulturen ü.N. bei 37°C angezogen, das Volumen lag bei etwa 1-5 % vom benötigten Volumen der Kulturen der Wachstumskurve. Die Vorkulturen wurden in LB mit 100 µg/ml Ampicillin verdünnt (Ausnahme: Stamm M15 ohne Plasmid in LB ohne Ampicillin) und alle 30 min eine Messung der OD aller Kulturen bei 600 nm vorgenommen. Die Induktion erfolgte bei einer OD von etwa 0,4. Zuvor wurden die Kulturen in zu induzierende (+) und Kulturen ohne IPTG-Induktion (-) aufgeteilt, um für jede Kultur eine Kontrollmessung machen zu können. Im Folgenden wurden die OD-Messungen an allen Kulturen (+ und -) weiterhin alle 30 min durchgeführt und zudem jede Stunde 500 µl als Aliquot abgenommen. Diese Proben wurden abzentrifugiert (3000 rpm, 3 min) und das Pellet in 100 µl TE-Puffer resuspendiert sowie 100 µl 2x SDS-Probenpuffer zugegeben.

3.5.6. Ni-NTA-Pulldown-Assay

Lysepuffer

10 mM HEPES-KOH pH 7,2
40 mM KCl
8 mM Imidazol
50 μ M PMSF
Verschiedene Konzentrationen Triton X-100(v/v)

Harnstoff-Lösung

20 mM Tris-HCl pH 8,0
10 M Harnstoff

Zur Anreicherung von Proteinen mit His-Tags wurde das nach der Überexpression geerntete Pellet aufgetaut und in 5 ml Lysepuffer resuspendiert. Es wurde mit 1:100 verdünnten Protease-Inhibitoren (25x, Roche) und 1 mg/ml Lysozym versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis erfolgte das Sonizieren der Pellets für etwa 1 min. Anschließend wurde das Zellysate bei 13000 rpm und 4°C 15 min zentrifugiert (SS-34); in einigen Versuchen erfolgte eine zweite Zentrifugation bei 40.000 rpm für 30 min in der Ultrazentrifuge (Ti50). Der Überstand wurde auf Ni-NTA-Kügelchen (Qiagen) überführt, die zuvor zweimal mit Lysepuffer gewaschen wurden. Nach 30 min schütteln bei 4°C und abzentrifugieren der Kügelchen (3000 rpm, 1 min) wurden diese in ein neues Reaktionsgefäß überführt und dreimal mit Lysepuffer gewaschen. Es folgten zwei Waschschrte mit Lysepuffer mit 25 mM Imidazol. Anschließend wurde die Probe mit einem Volumen 10 M Harnstoff-Lösung versetzt, 10 min bei 65°C erwärmt und 10 min bei RT abgekühlt. Nach dem Abzentrifugieren wurde der Überstand abgenommen und mit SDS-Probenpuffer versetzt.

In einem zweiten Elutionsschritt wurden die Ni-NTA-Kügelchen zweimal mit 200 mM Imidazol enthaltenden Lysepuffer gewaschen, die Überstände in einem neuen Gefäß gesammelt und ebenfalls mit SDS-Probenpuffer versehen.

Vor Auftragung auf ein SDS-Gel wurden die Proben 45 s gekocht und 1 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert. Geladen wurde ein bestimmtes Volumen des Überstandes.

3.5.7. Immunopräzipitation

Lysepuffer für *Chlamydomonas*

20 mM HEPES-KOH pH 7,2
1 mM MgCl₂
10 mM KCl
154 mM NaCl

Lysepuffer für *E.coli*

20 mM HEPES-KOH pH 7,2
40 mM KCl
8 mM Imidazol
154 mM NaCl
2% Triton X-100(v/v)
50 μ M PMSF

Sucrosekissen
0,6 M Sucrose
20mM Hepes-KOH pH 7,2

KH-Puffer
20mM Hepes-KOH pH7,2
80mM KCl

3.5.7.1. Kopplung der Sepharose-Kügelchen mit dem Antikörper

50 mg der ProteinA-Sepharosekügelchen (Sigma) wurden mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,5 für 30 min bei 4°C inkubiert und anschließend 3x mit 0,1 M Phosphatpuffer gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die pelletierten Kügelchen mit 0,1 M Phosphatpuffer auf 750 µl aufgefüllt und mit 0,02% Na-Azid versetzt. So können sie über längere Zeit bei 4°C gelagert werden. Die ProteinA-Sepharosekügelchen wurden dann zu den Antikörpern pipettiert, 132 µl 1 M Phosphatpuffer pH 7,5 zugegeben und mit destilliertem Wasser auf 1320 µl aufgefüllt. Der Ansatz wurde für 1 h bei RT unter ständigem Überkopfschütteln inkubiert. Anschließend wurde der Probenansatz kurz bei voller Leistung (Tischzentrifuge) zentrifugiert und dreimal mit Na-Borat Puffer (pH 9,0) gewaschen. Nach jedem Schritt wurde zentrifugieren und der Überstand verworfen. Die schweren Ketten der Antikörper wurden durch Zugabe von 5,2 mg DMP (Sigma) während einer 30 minütigen Inkubationszeit kovalent an das ProteinA gekoppelt. Die freien Bindungsstellen des DMP wurden durch Zugabe von 1 M Tris-HCl pH 7,5 abgesättigt und anschließend die Kügelchen in 0,1 M Phosphatpuffer und 0,02 % Na-Azid aufgenommen und bei 4°C gelagert.

3.5.7.2. Immunopräzipitation mit *Chlamydomonas*-Kulturen

Für die Versuche wurden verschiedene Volumina der *Chlamydomonas*-Kulturen vom Stamm CW15(2) verwendet. Die Kultur wurde 5 min bei 5000 rpm (Rotor GS3) und RT zentrifugiert und zweimal mit 50 ml KH-Puffer gewaschen.

Das Pellet wurde in 9 ml Lysepuffer pro Liter geernteter Kultur resuspendiert und 1:100 verdünnte Protease-Inhibitoren (25x, Roche) sowie 20 mM DSP-Crosslinker zugegeben. Die Zellen wurden durch 1 min Sonizieren auf Eis aufgeschlossen. Anschließend erfolgte das Crosslinking unter ständigem Überkopfschütteln für mindestens 1 h bei 4°C. Durch Inkubation für 15 min mit 100 mM Glycin wurde die Reaktion beendet. Dann wurde das Zelllysate auf ein Sucrosekissen von jeweils 5 ml in Ti50-Zentrifugengefäße überführt und 30 min bei 40000 rpm (Rotor Ti50) und 4°C zentrifugiert. Die Oberphase wurde entnommen, zu den vorbereiteten ProteinA-Sepharosekügelchen gegeben und für 1 h

unter konstantem Schütteln bei 4°C inkubiert. Vor Zugabe zu den Kügelchen wurden 20 µl Aliquot entnommen. Zu dem Ansatz wurde 0,5% Triton X-100 zugegeben. Nach der Inkubation wurden die Kügelchen dreimal mit Lysepuffer plus 0,1% Triton X-100 gewaschen und in ein neues Gefäß überführt. Anschließend wurde der Ansatz zweimal mit 10 mM Tris-HCl pH 7,5 gewaschen.

Nach Entfernen des letzten Überstandes wurden 50 µl 2x SDS Ladepuffer (mit β-Mercaptoethanol für Western Blots, ohne für Silberfärbung) zugegeben, für 2 min gekocht und auf das SDS-Gel geladen.

3.5.7.3. Immunopräzipitation mit *E.coli*-Kulturen

Für den Versuch wurden je 100 ml *E.coli*-Kultur vom Stamm M15 verwendet. 1½ h nach der Induktion mit IPTG wurden die Kulturen geerntet (s. 3.5.5.3) und das Pellet in je 5 ml Lysepuffer aufgenommen. Nach Zugabe von 1:100 verdünnten Protease-Inhibitoren (25x, Roche) und 1 mg/ml Lysozym inkubierten die Proben 30 min auf Eis. Die Pellets wurden soniziert und anschließend 30 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert. Auf die vorbereiteten Sepharose-Kügelchen wurde der Überstand pipettiert und diese für 1 h bei 4°C invertiert. Nach der Inkubationszeit wurde analog zur Vorgehensweise bei *Chlamydomonas* verfahren.

3.5.8. **Protein-Identifikation mittels Massenspektrometrie**

3.5.8.1. Tryptischer Verdau

<u>Waschlösung A</u>	<u>Waschlösung B</u>	<u>Trypsin-Lösung</u>
10 mM NH ₄ HCO ₃	5 mM NH ₄ HCO ₃ 50% Acetonitril (v/v)	293 µl von 50 mM NH ₄ HCO ₃ 20 µg Trypsin (Promega) 40 µl Trypsin-Puffer

Nach erfolgter Färbung mit Colloidal Coomassie (Invitrogen) wurden die zu analysierenden Banden in einer Größe von 10-15 x 5 mm aus dem Gel ausgeschnitten, in Eppendorfgefäße gegeben und mit den Waschlösungen A und B abwechselnd entfärbt (3-4 mal) und nach Entfernen der Lösung für 2-4 h in der SpeedVac getrocknet. Die die Gelstückchen wurden mit 30 µl Trypsin-Lösung bedeckt und 20 min auf Eis inkubiert.

Überschüssige Lösung wurde entfernt, die Probe mit 50 µl 50 mM NH₄HCO₃ bedeckt und die Proteine ü.N. bei 37°C verdaut.

Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die Peptide zweimal mit 60 % Acetonitril für eine Stunde aus den Gelstückchen extrahiert. Die Lösungen wurden wieder in das neue Gefäß überführt und die gesammelten Überstände in der SpeedVac getrocknet, bis die Flüssigkeit vollständig verdampft war.

3.5.8.2. Massenspektrometrische Analyse

Durch den tryptischen Verdau waren die Proteine zu Peptiden mit den endständigen Aminosäuren Lysin, bzw. Arginin verdaut worden. Für die Analyse wurden die Proben nach Jena geschickt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. M. Mittag).

Die Proben wurde im Massenspektrometer durch Elektronenspray Ionisation (ESI) ionisiert und durch Kollision mit Edelgas (ESI-MS/MS) fragmentiert. Das erhaltene Muster wurde mit theoretisch verdauten Peptiden aus den Datenbanken für *Chlamydomonas reinhardtii* verglichen.

Es wurden Listen mit potentiellen Peptid-Sequenzen und daraus hergeleiteten möglichen Proteinen aus E.coli zugeschickt.

3.6. Zellbiologische Methoden

3.6.1. Kinetiken

3.6.1.1. Dunkel-Licht Kinetik

Für die Dunkel-Licht-Kinetik wurden 250 ml *Chlamydomonas* Zellen vom Wildtyp A1 bzw. Stamm 325 *arg7* aus Liège und den RNAi-Stämmen in einem Erlenmeyer-Kolben zu einer Dichte von $\sim 5-8 \times 10^6$ Zellen/ml angezogen. Am Tag vor Versuchsbeginn wurde die Kultur in je 50 ml Fraktionen unterteilt, in sterile Bechergläser überführt und für ~ 16 h abgedunkelt. Für den Versuch wurden die Kulturen wieder belichtet. Wichtig dabei war, dass die Kulturen keinen weiteren Stressbedingungen (Temperaturänderung, zusätzliche Bewegung) ausgesetzt wurden. Für den Nullwert wurde sofort nach der Belichtung eine Probe (50 ml) in eiskalte Corex-Zentrifugenbecher überführt. Weitere Proben wurden 30, 60, 120, 240 und 360 min nach Belichtungs-Beginn entnommen und

in eiskalte Corex-Zentrifugenbecher überführt. Die Zellernte erfolgte wie in 3.3.5. beschrieben.

3.6.1.2. Hitzeschock-Überlebenskurve

Es wurden Kontrollstamm und RNAi-Stämme jeweils auf 2 TAP-Agar-Platten möglichst gleichmäßig ausgestrichen. Eine Platte wurde mehrfach mit Parafilm umwickelt, um einen wasserdichten Abschluss zu gewährleisten und anschließend an vier aufeinander folgenden Tagen vormittags 1 h und nachmittags 2 h im 40°C-Wasserbad unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Kontrollplatte wurde bei möglichst ähnlichen Lichtverhältnissen neben dem Wasserbad aufgestellt. Am fünften Tag wurden die Platten fotografiert.

3.6.2. Grobe Fraktionierung

3.6.2.1. Sonizieren und Frieren / Tauen (Freeze / thaw)

Für eine grobe Fraktionierung der Proteine in lösliche und membrangebundene Anteile wurden 25 ml *Chlamydomonas* Kultur des Stammes CW15(2) geerntet und das Pellet in 2 ml TE-Puffer und 1:100 verdünnten Protease-Inhibitoren (25x) aufgenommen. Ein Aliquot von 400 µl für das Gesamtzellprotein wurde mit 2x SDS Probenpuffer versetzt. Nach Aufteilen der restlichen Zellen wurde die eine Hälfte durch Sonizieren, die andere durch 4 Zyklen des Einfrierens in flüssigem Stickstoff und anschließendem Tauen aufgeschlossen. Dann wurden die Zellysate auf ein Sucrosekissen überführt und 30 min bei 44.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Ti50). Die Pellets wurden in einem Volumen TE-Puffer rückgelöst und ebenso wie die Überstände mit 2x SDS-Probenpuffer versehen. Vor der Auftragung auf ein SDS-Gel wurden die Proben 2 min gekocht.

3.6.2.2. Protein-Display

KMH-Puffer
20mM Hepes-KOH pH7,2
80mM KCl
2,5 mM MgCl₂

Für die Erstellung des Protein-Displays verschiedener RNAi-Stämme wurden je 250 ml *Chlamydomonas* Zellen bzw. 500 ml bei einer deutlich dünneren Kultur geerntet und das Pellet in 2 ml KMH-Puffer aufgenommen und Protease-Inhibitoren zugesetzt. Im

Anschluss erfolgte der Zellaufschluss durch dreimaliges Frieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Tauen. Ein Aliquot von 300 µl für das Gesamtzellprotein wurde abgenommen. Der Rest wurde auf ein Sucrosekissen aufgetragen und 30 min bei 33.000 rpm und 4°C zentrifugiert (Ti50). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt; das Pellet wurde in KMH-Puffer mit 2 % Triton rückgelöst, soniziert und erneut auf ein Sucrosekissen aufgetragen. Das Aliquot und alle Überstände wurden mit 2x SDS Probenpuffer versetzt und bei -80°C eingefroren.

3.6.3. Chloroplasten-Isolation

5x NEB Puffer

1,5 M Sorbitol
50 mM Tris-HCl pH 7,8
25 mM MgCl₂

45% Perkoll Lösung

45% Perkoll
1x NEB Puffer

70% Perkoll Lösung

70% Perkoll
1x NEB Puffer

Lysepuffer

10 mM Tris pH 7,8
10 mM EDTA
4,5 % Protease-Inhibitor (v/v)

Sucrosekissen

X M Sucrose
10mM Tris-HCl pH7,8
10 mM EDTA

Eine *Chlamydomonas* Kultur des Stammes CW15(2) wurde in TAP plus 0,5% Pepton (aus Casein; Roth) zu einer Zelldichte von 5×10^6 Zellen/ml angezogen. Die Zellen wurden für ~16 h abgedunkelt, um weitere Zellteilungen zu verhindern und Chloroplasten gleicher Größe zu gewinnen. 45 min vor der Ernte wurden die Zellen wieder belichtet und anschließend bei 4000 rpm (SLA 1500) und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 45 ml eiskaltem 1x NEB-Puffer aufgenommen und im Kühlraum mit einem Nebulizer aufgeschlossen. Die zertrümmerten Zellen wurden in einem Corex-Zentrifugen Gefäß gesammelt und 20 s bei 4°C und 4500 rpm (Rotor HB4) zentrifugiert. Der Überstand sollte nur noch leicht grün sein, sonst wurde erneut zentrifugiert. Zu jedem Pellet wurden 4,5 ml 1x NEB Puffer mit Protease-Inhibitoren (25x) gegeben und das Pellet durch Auf- und Abpipettieren mit einer abgebrochenen Pasteurpipette resuspendiert. Die homogene Probe wurde auf einen Perkollgradienten (unten 70 % Lösung, oben 45 % Lösung) in Corexgefäße gegeben und 20 min bei 5000 rpm (Rotor HB4) und 4°C zentrifugiert. Die Bremse der Zentrifuge war ausgeschaltet. Intakte Chloroplasten waren in der Interphase zu finden. Der Bodensatz bestand aus den nicht aufgeschlossenen Zellen und die Phase oberhalb des Gradienten aus zerstörtem

Zellmaterial. Die Chloroplasten wurden in ein neues Corexgefäß überführt und mit dem vierfachen Volumen an 1x NEB Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert (40 s bei 4°C und 4500rpm; HB4-Rotor). Das Pellet wurde dann in je 2 ml Lysepuffer aufgenommen und die Chloroplasten durch Auf- und Abpipettieren lysiert. Das Lysat wurde auf einen Sucrosegradienten (0,6 M und 1 M Sucrose) überführt und 2½ h bei 28.200 rpm (Rotor SW40) und 4°C zentrifugiert. In der Phase zwischen dem Gradienten fanden sich die so genannten „Low density membranes“(LDM), im Überstand das Stroma und im Pellet die Thylakoidmembranen und andere Partikel. Das Pellet wurde in 5 ml 1,8 M Sucrose resuspendiert und nach Überschichten mit 1,3 M Sucrose erneut 2 h zentrifugiert. Die gereinigten Thylakoide befanden sich nun in der Interphase. Alle Fraktionen von Gesamtzellextrakt, Chloroplasten, LDM, Stroma und Thylakoiden wurden in Lysepuffer aufgenommen und eingefroren.

Von allen Proben wurde die Proteinkonzentration durch Amidoschwarzfärbung bestimmt und für die Analyse durch SDS-PAGE zu gleicher Gesamtproteinkonzentration eingestellt.

3.6.4. Mitochondrien-Isolation nach Eriksson et al. (1995)

<u>Lysepuffer</u>	<u>20% Perkoll-Lösung</u>	<u>SEM-Puffer</u>
50mM HEPES-KOH pH 7,2	20% Perkoll	250 mM Sucrose
5 mM EDTA	0,25 M Sorbitol	1 mM EDTA
0,25 M Sorbitol	10 mM MOPS-KOH pH 7,2	1 mM MOPS-KOH pH7,2
4 mM Cystein	1 mM EDTA	
0,5% PVP 40 (w/v)	0,5% PVP 40 (w/v)	
0,1% BSA (w/v)	0,1% BSA (w/v)	

Aus 2 Liter Kultur des *Chlamydomonas*-Stammes CW15(2) wurden die Zellen (Dichte ~6x 10⁶ Zellen/ml) für 5 min bei 4500 rpm und 4°C abzentrifugiert und das Pellet zweimal mit 20 mM HEPES-KOH pH 7,2 gewaschen (resuspendiert und wieder zentrifugiert). Dann wurden die Zellen in 30 ml Lysepuffer aufgenommen und durch einen Nebulizer aufgeschlossen. Nach Abnahme eines 100 ml Aliquots wurde 5 min bei 5000 rpm (SS-34) zentrifugiert. Der Überstand wurde bei 8000 rpm für weitere 10 min zentrifugiert. Das Pellet wurde anschließend in 30 ml Perkoll-Lösung aufgenommen und für 40 min bei 20.000 g aufgetrennt. Die untersten 3 ml wurden mit 20 ml SEM-Puffer aufgefüllt und erneut zentrifugiert (10 min, 10000 g). In 300 µl SEM-Puffer wurde das Mitochondrien enthaltende Pellet resuspendiert. Nach Zugabe von 1:100 verdünnten

Protease-Inhibitoren (25x) und 5x SDS-Probenpuffer wurde die Lösung aliquotiert und eingefroren.

4. Ergebnisse

4.1. Biochemische Charakterisierung von VAP, 70-kDa-Protein und Thioesterase als mögliche Interaktionspartner des HSP70/HSP90-Chaperonsystems

Über Immunopräzipitationen (IP) der HSP90C-, HSP70B- und VIPP1-Proteine wurden verschiedene Proteine als potentielle Interaktionspartner ermittelt. Die Analyse der angereicherten Proteine erfolgte mittels Massenspektrometrie. Es handelte sich hierbei um eine Thioesterase, die als mögliches Substrat des HSP90C in Frage kam. Mit der HSP70B-IP wurde ein 70 kDa großes Protein unbekannter Funktion angereichert. Mit VIPP1 schien ein Protein zu interagieren, das den Arbeitsnamen VAP (VIPP1 associated protein) trug.

Bei dem auf Lichtinduzierbarkeit zusätzlich untersuchten CDJ3 handelt es sich möglicherweise um ein plastidäres J-Domänen-Protein, das ein Cochaperon von HSP70B sein könnte.

4.1.1. Lichtinduzierbarkeit der Gene von VAP, VIPP und 70-kDa-Protein

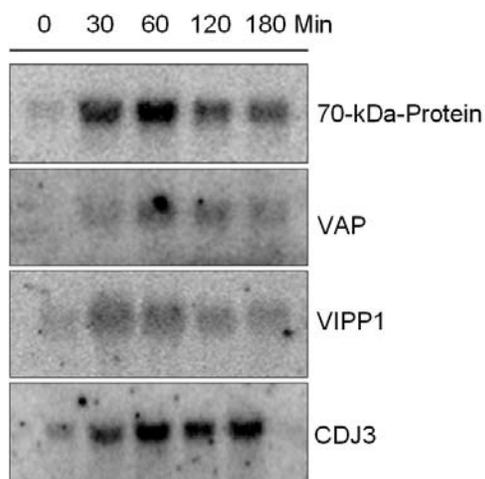


Abb. 8: Northern Blots der Dunkel-Licht-Shift-Kinetiken des *Chlamydomonas*-Wildtyp-Stamms A1⁻, hybridisiert mit Sonden aus cDNAs, die für *VIPP1*, *VAP*, das 70-kDa-Protein und *CDJ3* kodieren.

In einem Dunkel-Licht-Shift-Experiment wurden die Induzierbarkeit der für *VAP*, *VIPP* und das 70-kDa-Protein kodierenden Gene durch Licht auf mRNA-Ebene untersucht.

Die Gene aller vier oben erwähnten Proteine zeigen im Wildtyp-Stamm A1⁻ eine lichtinduzierte Zunahme der mRNA (Abb. 8). Die maximale Induktion ist nach 30 min (*VIPP1*) bzw. 60 min (*VAP*) nach dem Übergang aus der Dunkelheit ins Licht ($30 \mu\text{E m}^{-2}\cdot\text{sek}^{-1}$) zu beobachten. Bei *CDJ3* und der RNA des 70-kDa-Proteins liegt das Maximum der

Expression bei 60 min, nimmt bei letzterem aber danach wieder deutlich ab. Bei CDJ3 scheint die vorliegende RNA-Menge auch in den zwei darauf folgenden Stunden verhältnismäßig konstant zu bleiben.

4.1.2. Lokalisierung von VAP, 70-kDa-Protein und Thioesterase

Bevor die Frage der Interaktion mit dem HSP70/HSP90-Chaperonsystem angegangen werden konnte, musste die Lokalisierung der potentiellen Partner geklärt werden. Es wurde deshalb zunächst eine grobe Fraktionierung durchgeführt, um festzustellen, ob es sich um lösliche oder membrangebundene Proteine handelt. Im zweiten Schritt wurde eine genaue Lokalisierung der potentiellen Partner in Subfraktionen des Chloroplasten vorgenommen. Gegen alle drei Proteine waren durch heterologe Expression und Aufreinigung aus *E.coli* Antikörper aus Kaninchen gewonnen worden, die für den immunologischen Nachweis zur Verfügung standen.

4.1.2.1. Grobe Fraktionierung

Die Fraktionierung wurde mit zwei verschiedenen Methoden gleichzeitig durchgeführt. Beim Sonizieren erfolgte der Zellaufschluss durch Ultraschall-Anwendung. Alternativ wurden die Zellen durch dreimaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Auftauen aufgeschlossen (Abb. 9).

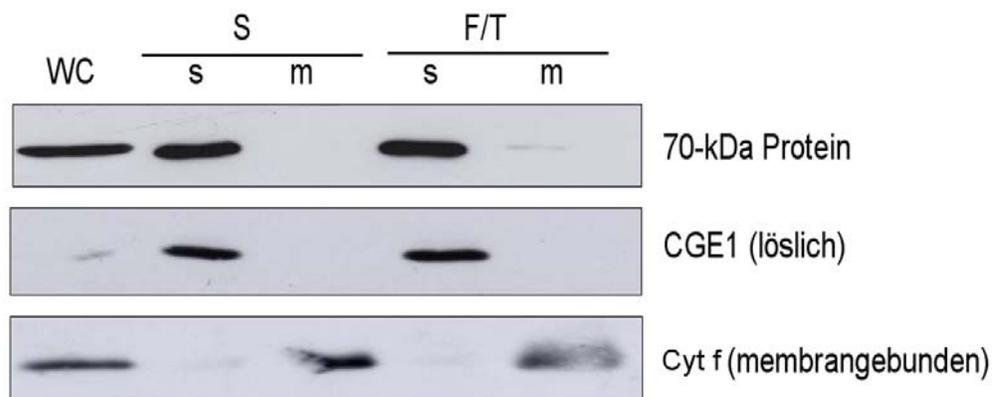


Abb. 9: Western Blots der groben Fraktionierung nach Auftrennung in einem linearen 12% SDS-Polyacrylamid Gel. Mittels Sonizieren (S) und der freeze-thaw Methode (F/T) zum Zellaufschluss wurden die folgenden Fraktionen erhalten: Lösliche Fraktion (s) und Membranfraktion (m). Als Kontrolle diente eine Probe der gesamten zellulären Proteine (WC, whole cells).

Die immunologische Detektion zeigt, dass das 70-kDa-Protein verglichen mit dem löslichen CGE1 wohl ebenfalls als lösliches Protein betrachtet werden kann.

Die Lokalisierung der Thioesterase blieb sowohl in der groben wie auch in der anschließenden genauen Fraktionierung erfolglos, da mit Western Blots und anschließendem immunologischen Nachweis kein eindeutiges Signal detektiert werden konnte. Anschließend Tests des Thioesterase-Antikörpers ergaben, dass dieser generell zu viele unspezifische Banden erkennt.

Auch die eindeutige Lokalisierung von VAP war nicht möglich, da es scheinbar sehr schwach exprimiert wird. Im Gesamtzellextrakt der VIPP1-IP (Abb. 12) ist es ebenfalls nur als sehr schwache Bande zu erkennen. Mit einem affinitätsgereinigten Antikörper könnten hier möglicherweise eindeutigere Ergebnisse erreicht werden.

4.1.2.2. Genauere Fraktionierung

Bei der genauen Fraktionierung erfolgt eine Isolierung der Chloroplasten, die aufgetrennt wurden in Thylakoide, Stroma und Low density membranes (LDM) überwiegend bestehend aus innerer Hüllmembran und Transportvesikeln (Zerges and Rochaix, 1998). Mitochondrien wurden nach (Eriksson et al., 1995) isoliert (Abb.10).

Die mitochondriale Carboanhydrase (CA) wurde wie erwartet hauptsächlich dort detektiert, gewisse Mengen jedoch auch in den Thylakoiden und in der LDM-Fraktion. Das in den Thylakoiden vorkommende Cytochrom f (Cyt f) konnte auch nur dort nachgewiesen werden. Die Detektion geringer Mengen von CGE1 ausschließlich im Stroma zeigt eine erfolgreiche Reinigung an. HSP70B liegt im Stroma, in der LDM-Fraktion und in geringem Maße auch in der Fraktion der Thylakoide vor.

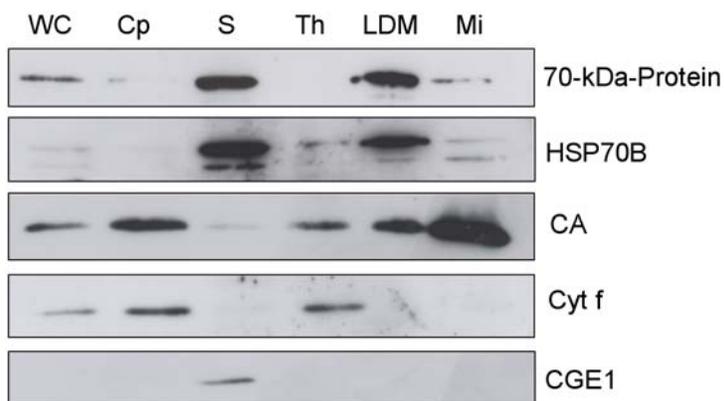


Abb. 10: Lokalisierung plastidärer und mitochondrialer Proteine. Gezeigt sind Western Blots der genauen Fraktionierung nach Auftrennung in einem 7,5-15% SDS-Polyacrylamid Gradientengel. Mittels Chloroplasten-Fraktionierung wurde Gesamtzellextrakt (WC) sowie die Chloroplasten (Cp) und deren einzelne Fraktionen Low density membranes (LDM), Stroma (S) und Thylakoide (Th) gewonnen. Zudem wurde eine Mitochondrien-Isolierung (Mi) durchgeführt.

Bei einer Betrachtung der Lokalisierung des 70-kDa-Proteins zeigte sich eine starke Anreicherung im Stroma sowie in der LDM-Fraktion. Durch die Auftragung gleicher Proteinmengen lässt sich eine Anreicherung im Vergleich zum Gesamtzellextrakt deutlich erkennen. Der Vergleich mit HSP70B zeigt, dass es als potentieller Partner in den gleichen Fraktionen vorliegt.

4.1.3. Co-Immunopräzipitationen aus *Chlamydomonas*-Zellextrakten zum Nachweis von Interaktionspaaren

Das Ziel von Co-Immunopräzipitationen aus Zellextrakten liegt in der Anreicherung von Interaktionspartnern mit Hilfe von polyklonalen Antikörpern. Dabei soll über die Wechselwirkung zwischen zwei Proteinen A und B, auch Protein B mit einem gegen A gerichteten Antikörper ankonzentriert werden können.

Vorraussetzung ist jedoch, dass weder das Zielprotein noch die potentiellen Interaktionspartner unspezifisch mit den Antikörpern oder den verwendeten Sepharose-beads interagieren. Daher wird eine Kontrolle mit Präimmenserum durchgeführt.

Es wäre also zu erwarten, dass durch eine Immunopräzipitation mit dem HSP70B Antikörper das 70-kDa-Protein als dessen potentieller Interaktionspartner ankonzentriert werden kann. In der 70-kDa-Protein-IP müsste dagegen neben diesem Protein auch eine größere Menge HSP70B zu detektieren sein als im Gesamtzellextrakt. Analoge Vermutungen gelten für VIPP1 und VAP.

Auf die Untersuchung der Interaktion von Thioesterase und HSP90C wurde verzichtet, da durch die unspezifische Erkennung zu vieler Banden durch den Antikörper kein eindeutiger Interaktionsnachweis möglich war.

Um den Einfluss von ATP auf die Interaktion zu untersuchen wurde je eine IP mit einem ATP-regenerierenden System durchgeführt, die andere mit Apyrase und FCCP versehen, um ATP abzubauen.

Eine grundsätzliche Voraussetzung für eine erfolgreich durchgeführte Immunopräzipitation ist, dass das Protein, gegen welches die Antikörper bei der jeweiligen IP verwendet werden, auch tatsächlich durch die Immunopräzipitationen angereichert wurde. Das bedeutet, dass sowohl der Antikörper funktionsfähig ist, als auch

das zu detektierende Protein tatsächlich in dem zu untersuchenden Ansatz vorhanden ist. Dass dies hier der Fall ist, zeigt Abb. 11.

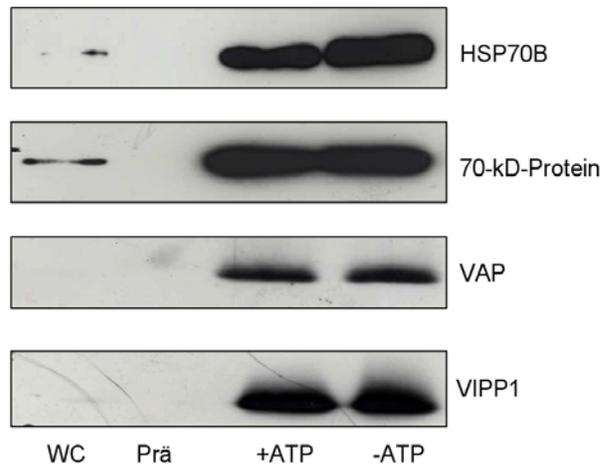


Abb. 11: Kontrollen der Co-Immunpräzipitationen aus *Chlamydomonas*-Zellextrakten. Gezeigt ist ein Western Blot der Immunopräzipitationen, nach Auftrennung in einem 7,5 -15% SDS-Gradientengel. Die Spalten geben die einzelnen Ansätze an, mit denen die jeweiligen IPs durchgeführt wurden: Gesamtzellextrakt (WC), Präimmunsereum (Prä) und die Ansätze mit ATP (+ATP) und ohne ATP (-ATP). Rechts sind die primären Antikörper der Detektion angegeben, die gleichzeitig auch den für die IPs verwendeten Antikörpern entsprechen.

Die Kontrolle aller IPs war erfolgreich, da alle Proteine durch ihre eigenen Antikörper angereichert wurden und auch erfolgreich detektiert werden konnten. Auch der Antikörper gegen VAP zeigt sich funktionsfähig, da VAP angereichert vorliegt.

Da bei VAP im ATP-enthaltenden Ansatz mit löslichen Proteinen und im ATP-freien Experiment mit dem Gesamtzellprotein gearbeitet wurde, lässt sich aus den gleichstarken Detektionssignalen schließen, dass es sich bei VAP aller Wahrscheinlichkeit nach auch um ein lösliches Protein handelt.

4.1.3.1. 70-kDa-Protein und HSP70B

Abschließend wurden die IPs auf Anreicherung der potentiellen Interaktionspartner hin untersucht. Dabei erfolgte die Detektion mit dem Antikörper des jeweiligen Partners. Die 70-kDa-Protein-IP wurde daher gegen HSP70B detektiert und die HSP70B-IP gegen den potentiellen Partner, das 70-kDa-Protein (Abb.12).

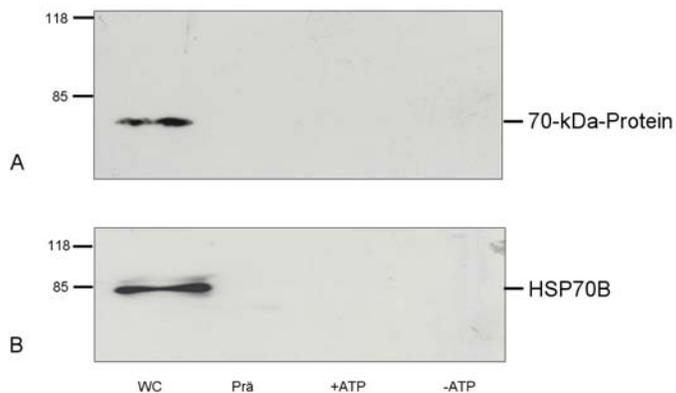


Abb. 12: A: Die mit Antikörper gegen HSP70B durchgeführte IP wurde detektiert gegen das 70-kDa-Protein. B: Die 70-kDa-Protein-IP wurde detektiert gegen HSP70B.

Das 70-kDa-Protein war nur im Gesamtzellextrakt nachweisbar, nicht jedoch im HSP70B-Immunpräzipitat. Ebenso eindeutig zeigt die 70-kDa-Protein-IP keine nachweisbare Interaktion mit HSP70B. Auch hier ist HSP70B nur im Gesamtzellextrakt nachweisbar und wurde in der IP unabhängig von der Anwesenheit von ATP nicht zusammen mit dem 70-kDa-Protein co-präzipitiert.

4.1.3.2. VAP und VIPP1

Um die Interaktion zwischen VAP und VIPP1 zu untersuchen, wurde die mit Antikörpern gegen VAP durchgeführte IP gegen VIPP1 detektiert sowie die VIPP1-IP gegen VAP (Abb.13).

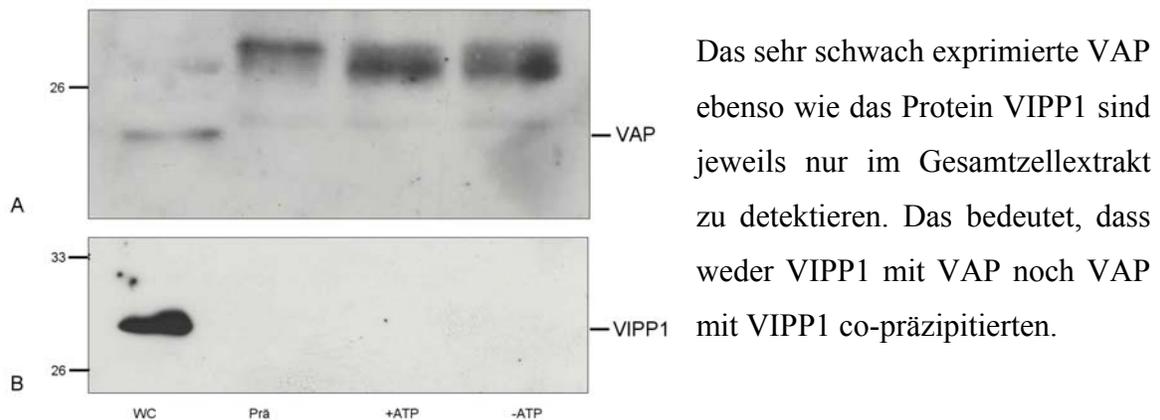


Abb. 13: A: Die VIPP1-IP wurde detektiert gegen VAP. B: Die VAP-IP wurde detektiert gegen VIPP1.

Eine vermutete Interaktion konnte daher bei allen durchgeführten Immunpräzipitationen sowohl zwischen VAP und VIPP1, als auch zwischen HSP70B und 70-kDa-Protein nicht bestätigt werden.

4.2. *HSP90C*-RNAi zur Auffindung charakteristischer Phänotypen

HSP90C stellt zusammen mit HSP70B den Kern des HSP70/HSP90-Chaperonsystems in Chloroplasten dar. Über HSP90C und seine Substrate, Cochaperone und Funktionen ist allerdings wesentlich weniger bekannt als beim deutlich besser untersuchten HSP70B. Aufgrund reduzierter Lichtinduktion einiger kernkodierter Gene in HSP90 Mutanten in

Arabidopsis, kommt für chloroplastidäres HSP90 eine Funktion in der Signalweiterleitung vom Chloroplasten zum Kern in Betracht. HSP90C in *Chlamydomonas* könnte daher an der Reaktion auf Licht und/oder andere Faktoren, die eine Induktion bestimmter Proteine im Zellkern erfordern beteiligt sein (Willmund and Schroda, 2005).

Um einen Hinweis auf Funktionen oder Substrate des HSP90C zu erhalten, wurde dieses Protein durch RNAi unterexprimiert. Diese Reduktion des Expressionslevels (Silencing) ist jedoch nicht von Dauer. Im Verlauf einiger Wochen oder Monate kehrt die Fähigkeit, das entsprechende Protein zu synthetisieren, zurück. Es ist daher wichtig, zu kontrollieren, ob zum Zeitpunkt des Experiments das Expressionslevel noch erniedrigt ist. Über die Unterexpression von HSP90C sollte in dieser Arbeit nach dadurch entstehenden charakteristischen Phänotypen gesucht werden.

4.2.1. Transformation und Screening

Um mit RNAi ein Protein unter zu exprimieren, muss zunächst das RNAi-Konstrukt in den Organismus transformiert werden und die Transformanten in einem Screening-Ansatz auf ein reduziertes Proteinlevel untersucht werden.

Durch Transformation des HSP90C-RNAi-Konstrukts (Abb.14) in den zellwandlosen *Chlamydomonas*-Stamm 325 Liège wird dort durch Transkription eine doppelsträngige RNA des *HSP90C* erzeugt. Sie wird durch Dicer in kleine siRNA-Moleküle geschnitten.

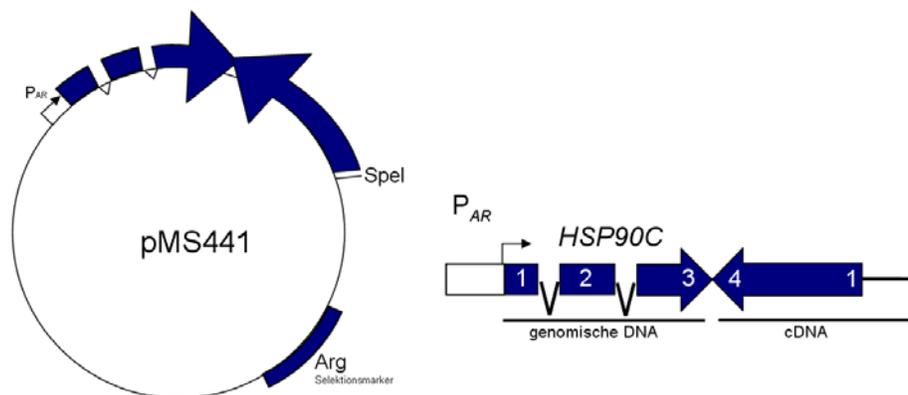


Abb. 14: *HSP90C*-RNAi-Konstrukt mit einem *HSP70A-RBCS2* Tandempromotor (P_{AR}). An die genomische Sense-Sequenz von *HSP90C* schließt sich die cDNA-Antisense-Sequenz an. Diese Kombination ergibt ein stabileres RNA-Produkt als zwei cDNA-Abschnitte. Auf dem Plasmid pMS441 liegt zudem ein Arginin-Selektionsmarker (Arg). Eine SpeI-Restriktionsschnittstelle wird für die Linearisierung des Plasmids vor der Transformation verwendet.

Diese siRNA sollte in den Transformanten durch RNA Interferenz zur Reduktion des Expressionslevels von HSP90C-Protein führen. In einem Screening wurde das Zellprotein durch Detektion gegen HSP90C auf reduzierte Proteinmengen des Chaperons untersucht. Als Ladekontrolle wurde gegen das plastidäre Protein VIPP1 detektiert (Abb.15).

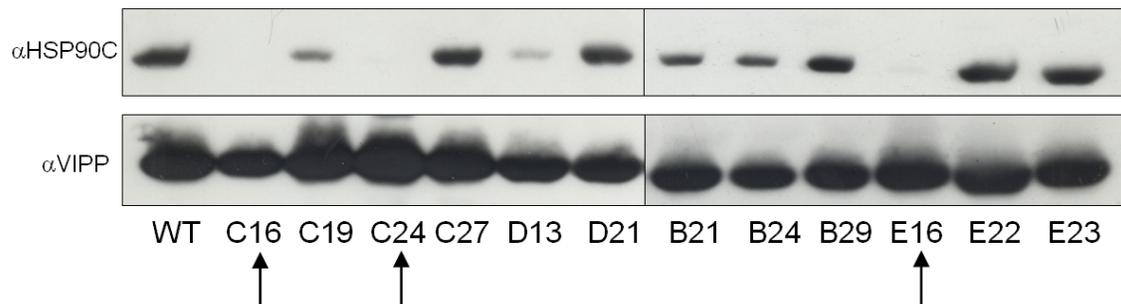


Abb. 15: Western Blot und immunologischer Nachweis von HSP90C in HSP90C-RNAi-Stämmen. Der Nachweis von VIPP1 diente als Ladekontrolle. Der Nachweis erfolgte mit Antikörpern gegen HSP90C bzw. VIPP1. Die Probenaufreinigung erfolgte in einer 10% SDS-PAGE. Die Pfeile zeigen erfolgreiche Unterexpression in den Transformanten an. Diese zwei Western Blots sind beispielhaft für alle untersuchten Transformanten abgebildet.

6 der 60 untersuchten Transformanten zeigten deutlich erniedrigte HSP90C-Levels. Das entspricht einem Anteil von 10%, wobei vor allem schwächer wachsende Kulturen getestet wurden. In einigen Transformanten waren noch geringe Mengen HSP90C detektierbar (z.B. C12), in anderen war keines mehr nachweisbar (z.B. C16). Die detektierten Mengen an VIPP1 waren in allen Kulturen in etwa vergleichbar. Für die sich anschließenden Versuche wurde mit den folgenden 6 Transformanten gearbeitet: C12, C13, C15, C24, C25, E16. Als Wildtyp-Stamm wurde in den Experimenten 325 Liège verwendet.

4.2.2. Suche nach Phänotypen auf Protein-Ebene

Zunächst wurde eine Auswirkung der HSP90C-Unterexpression auf der Ebene der Proteinexpression untersucht. Durch Vergleich der Expressionsmuster der Transformanten mit dem untransformierten 325 Liège-Stamm und einer vergleichenden Bestimmung von Chlorophyllmenge und Protein können vielleicht beteiligte Proteine und eine Auswirkung der Unterexpression auf die Photosynthese ausgemacht werden.

4.2.2.1. Protein-Display der *HSP90C*-RNAi-Transformanten

Mit den Transformanten C13, C16, C25 und E16 sowie dem entsprechenden Wildtypstamm wurde eine Fraktionierung der Zellproteine durchgeführt. Eine Trennung in lösliche und membrangebundene Proteine wurde erreicht. Zum Vergleich wurde auch der Gesamtzellextrakt der fünf Kulturen aufgetragen. Interessante Ergebnisse könnten das Auftreten von hoch- oder runterregulierten Proteinen sein, die in den Transformanten zu beobachten sind, nicht jedoch im Wildtyp.

Die Proteine wurden jeweils zweimal mit SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und einmal mit Silber und einmal mit Coomassie angefärbt (Abb. 16 + 17).

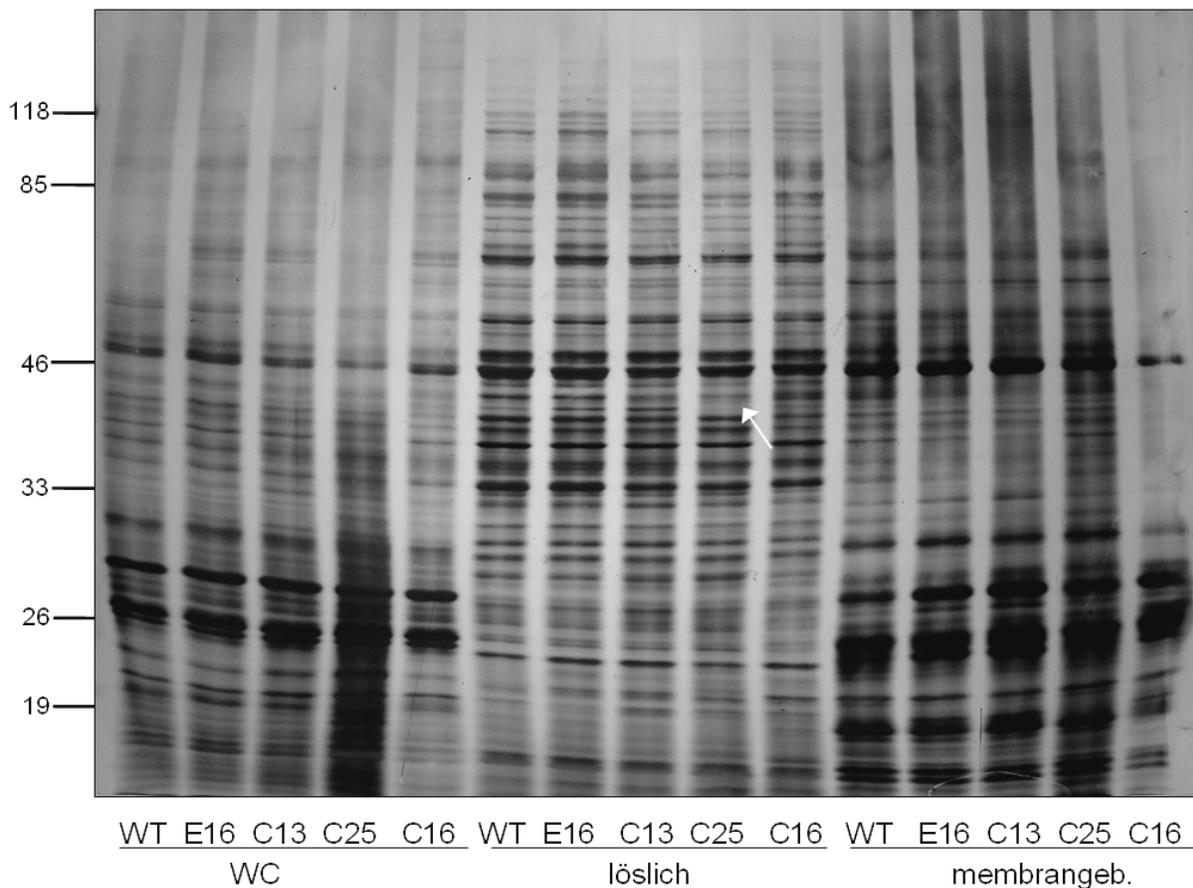


Abb. 16: Analyse der Proteinmuster der *HSP90C*-RNAi-Stämme verglichen mit dem Wildtyp-Stamm. Gezeigt ist eine Silberfärbung nach Auftrennung der Proben mit einer 7,5-15% SDS-PAGE. Das Gel wurde nach der Färbung auf einem Lichttisch fotografiert. Der Probenauftrag beinhaltet den Gesamtzellextrakt (WC), den löslichen Proteinanteil (löslich) sowie membrangebundene Proteine (membrangeb.). Der Zellaufschluss erfolgte durch mehrmaliges Einfrieren in flüssigem Stickstoff und anschließendem Tauen.

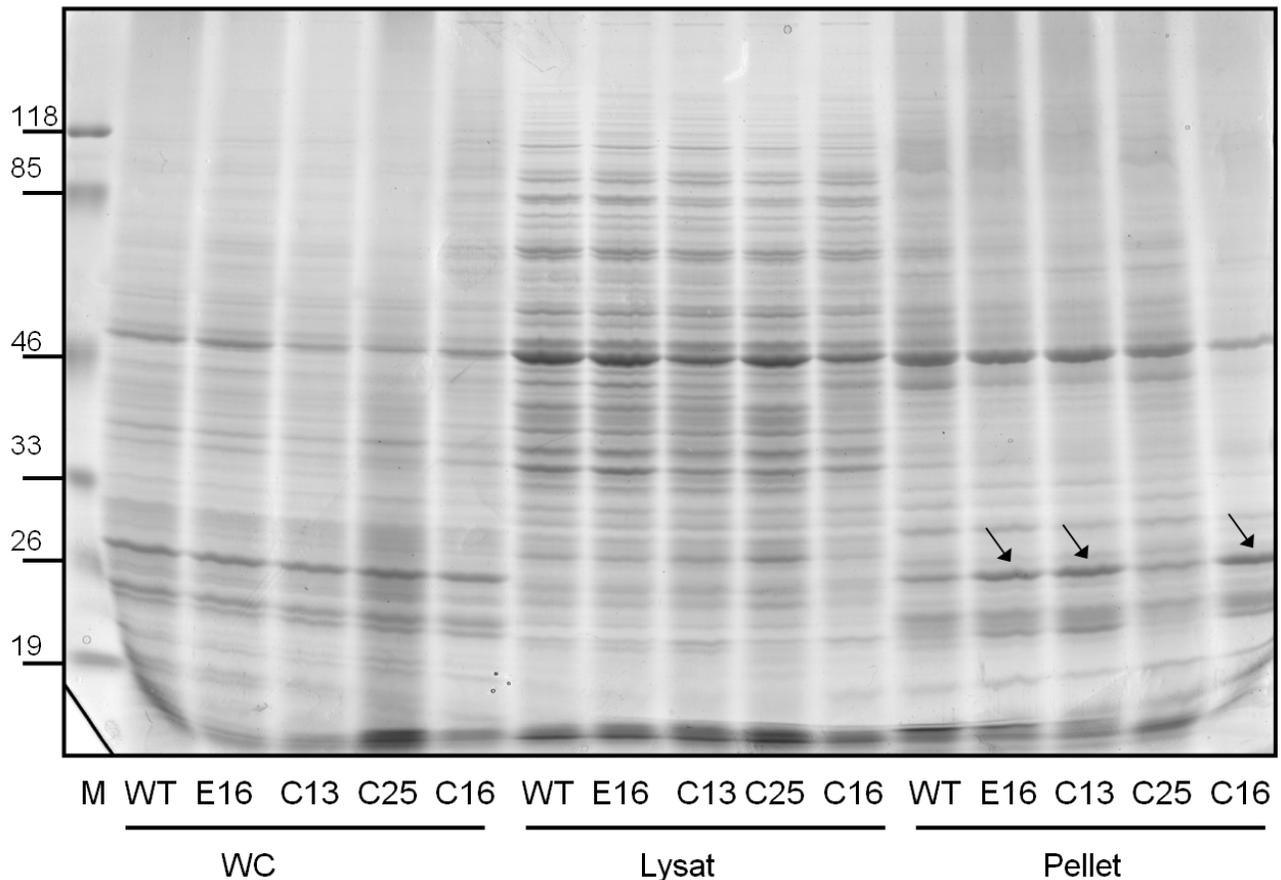


Abb. 17: Analyse der Proteinmuster der *HSP90C*-RNAi-Stämme verglichen mit dem Wildtyp-Stamm. Gezeigt ist ein mit Coomassie gefärbtes Gel. Die Probenaufbereitung ebenso wie die Auftrennung erfolgte analog zur Silberfärbung in Abb. 16.

Sowohl in dem mit Silber gefärbten Gel wie auch in der Coomassie-Färbung lassen sich in einzelnen Spuren vom Expressionsmuster des Wildtyps abweichende Banden finden. Diese sind entweder verstärkt wie in der Coomassie-Färbung der membrangebundenen Proteine in den Kulturen E16, C13 und C16 bei einer Größe von knapp 30 kDa. Sie können aber auch reduziert sein, wie es in der Silberfärbung bei C25 im löslichen Protein bei einer Proteingröße von etwa 43 kDa zu beobachten ist (s.o).

Entscheidend ist jedoch, dass keine der Banden in allen Transformanten auf die gleiche Weise hoch- oder runter reguliert werden. Eine einheitliche, charakteristische Veränderung ist daher durch die Unterexpression von *HSP90C* nicht auszumachen.

Um zu bestätigen, dass zum Zeitpunkt der Probennahme das HSP90C-Level noch signifikant erniedrigt ist und die Expression von HSP90C noch nicht wieder stattfindet, wurden die verwendeten Transformanten durch immunologischen Nachweis auf die Abwesenheit des Chaperons getestet.

Alle Proben der Kulturen, die für das Protein-Display sowie für die Chlorophyll- und Proteinbestimmung verwendet wurden, zeigten kein nachweisbares HSP90C (Abb.18).

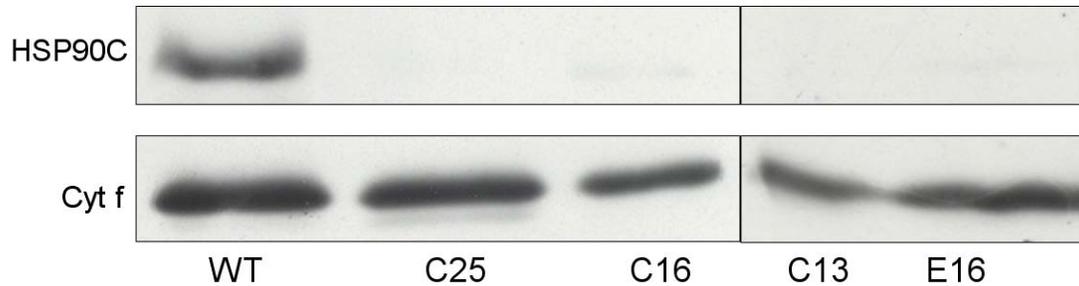


Abb. 18: Kontrolle des HSP90C-Expressionslevels für die Analyse des Protein-Displays und der Chlorophyll-/Proteinbestimmung. Gezeigt ist ein Western Blot; die Proben wurden analog zum Screening in Abb. 15 aufbereitet. Als Ladekontrolle wurde gegen Cytochrom f (Cyt f) detektiert.

4.2.2.2. Bestimmung des Chlorophyll-Gesamtprotein-Verhältnisses

Die von Cao et al. (2003) veröffentlichten Befunde über retardierte Chloroplasten-Entwicklung in HSP90C-Mutanten in *Arabidopsis* zeigen in jungen Blättern eine geringere Chlorophyll-Konzentration und erscheinen daher gelblich. Eine Bestimmung der Gesamtchlorophyllmenge wie auch der einzelnen Konzentrationen von Chlorophyll a und b und die Messung der Bezugsgröße Gesamtprotein sollten einen ersten Blick auf mögliche Unterschiede erlauben.

Daraus ergibt sich ein Verhältnis von Chlorophyll (Chl) zu Protein in den Transformanten. Auch das Verhältnis von Chlorophyll a (Chl a) zu Chlorophyll b (Chl b) wurde bestimmt. Für die Ermittlung der Proteinkonzentration wurde eine Doppelbestimmung mit Amidoschwarz durchgeführt, für die Chlorophyllmessung eine dreifache Wertermittlung.

Tabelle 5 Chlorophyll- und Gesamtproteinkonzentration

Chlorophyll/Gesamtprotein					
	Chl µg/µl	Protein µg/µl	Chl/Pro		Chla/Chlb
WT	0,23	1,01	0,23		2,11
E16	0,16	0,70	0,23		1,95
C25	0,26	1,37	0,19		2,15
C13	0,13	0,72	0,18		1,93
C16	0,04	0,51	0,08		1,39

Nur die transformierte Kultur C16 zeigt signifikant vom Wildtyp-Stamm abweichende Messwerte. Es scheint Chlorophyll a reduziert zu sein, da sowohl die Messung der verschiedenen Chlorophylle wie auch das Verhältnis der Chlorophylle zur Proteinmenge deutlich niedrigere Werte aufweisen. C16 zeigte zudem ein stark verlangsamtes Wachstum im Vergleich zu den anderen Transformanten und dem Wildtyp.

Da aber sowohl im Protein-Display als auch in den Werten der anderen erfolgreich herunter regulierten Stämme keine charakteristischen Effekte zu beobachten sind, kann in diesen Experimenten nicht von einem gemeinsamen durch RNAi bedingten Phänotyp gesprochen werden. Die Differenzen in C16 könnten sich durch eine Insertions-Mutagenese erklären. Dabei hätte die Transformation möglicherweise die Schädigung eines wichtigen, anderen Gens zu Folge, die sich aber unabhängig vom HSP90C-Level auswirkt.

4.2.3. Hitzestress-Überlebensexperiment

Um zu prüfen, ob die Unterexpression des HSP90-Chaperons einen negativen Einfluss auf die Überlebensfähigkeit der Transformanten unter Hitzestress hat, wurden auf TAP-Agar-Platten ausgestrichene Kulturen an vier aufeinander folgenden Tagen im 40°C Wasserbad mehrere Stunden dem Stressreiz ausgesetzt.

Es wurde bei allen Kulturen ein leicht eingeschränktes Wachstum im Vergleich zu den Kontrollplatten beobachtet (ohne Abbildung). Dies trifft jedoch nicht nur auf die Transformanten sondern auch im gleichen Maße auf den Wildtyp zu, so dass keine

Beeinträchtigung der Fähigkeit mit wiederholtem Hitzestress umzugehen in *Chlamydomonas*-Zellen mit reduziertem HSP90C-Proteinlevel zu erkennen ist.

4.2.4. Suche nach Phänotypen auf RNA-Ebene

Da auf Protein-Ebene keine charakteristische Beeinträchtigung durch *HSP90C*-RNAi feststellbar war, wurden zwei Kinetiken durchgeführt, bei denen regelmäßig genommene RNA-Proben einen Hinweis auf durch Licht oder Hitze induzierte Komponenten möglicher Signalwege liefern könnten.

4.2.4.1. Dunkel-Licht-Shift-Kinetik

Nach dem Übergang der Zellen ins Licht nach mehrstündiger Dunkelheit wurde die isolierte mRNA mit cDNA-Sonden hybridisiert. Untersucht wurden dabei das vom Chloroplastengenom kodierte *PsbA* sowie kernkodierte *HSP70A*. *cβlp* diente als Ladekontrolle. Eine Änderung in der Konzentration des *PsbA*-Transkripts könnte auf einen Einfluss auf chloroplastenkodierte Gene hinweisen. Bei *HSP70A* handelt es sich um ein durch Licht und Mg-Protoporphyrin induziertes Gen, das für ein cytosolisches Protein kodiert. Eine verringerte Lichtinduktion des *HSP70A*-Gens könnte auf eine Störung des Signalweges von den Chloroplasten zum Zellkern hindeuten.

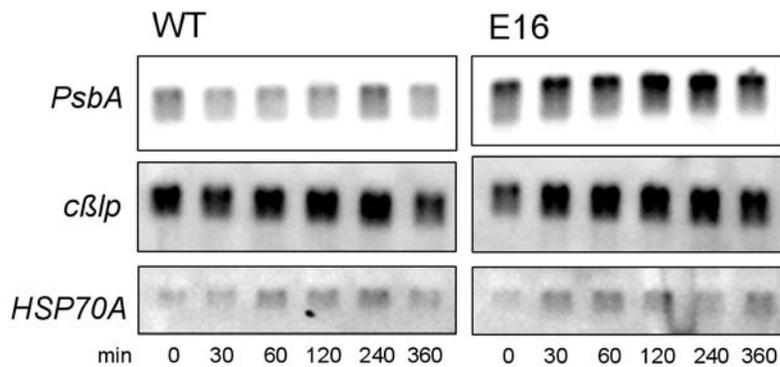


Abb. 19: Analyse der mRNA des Wildtyps im Vergleich zum *HSP90C*-RNAi-Stamm E16. Die Northern Blots sind stellvertretend für alle Transformanten dargestellt. Hybridisiert wurde mit Sonden aus cDNA, die für *PsbA*, *cβlp* und *HSP70A* kodieren. Die Zeiten nach dem Übergang vom Dunklen ins Licht sind unter der Abbildung in Minuten angegeben.

Im *HSP90C*-RNAi-Stamm E16 scheint eine Induktion des in den Chloroplasten kodierten *PsbA* zu sehen zu sein (Abb.19). Dieser Eindruck bestätigt sich jedoch nicht, da auch die Ladekontrolle *cβlp* korrelierende Konzentrationen aufweist. *HSP70A* wird im *HSP90C*-

RNAi-Stamm und im Wildtyp durch Licht induziert. Durch das Fehlen von *HSP90C* ist keine Veränderung des normalen Verhaltens festzustellen. Die anderen *HSP90C*-RNAi-

Stämme weisen ebenfalls keine auffälligen vom Wildtyp abweichenden Muster auf (ohne Abbildung). Das Transkript von *HSP90C* konnte nicht detektiert werden. Zumindest im Wildtyp hätte eine nachweisbare Menge an RNA erwartet werden können.

Die Untersuchungen auf RNA-Ebene ergeben zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Aussage, die eine Richtung bei der Suche nach der Funktion von HSP90C und seinen Substraten vermuten lassen könnten.

4.3. SecA als möglicher Interaktionspartner von CDJ2

Ziel dieser Arbeit war, durch verschiedene Techniken mögliche weitere mit CDJ2 interagierende Proteine aufzufinden. Verwendet wurde dabei der *E.coli*-Stamm M15 mit den eintransformierten Plasmiden pMS254 (kodiert für CDJ2 ohne Chloroplasten-Transitsequenz) sowie pMS296 (kodiert für CDJ2 ohne Transitsequenz und J-Domäne; auch als CDA2 bezeichnet) (Abb.20). Bei CDA2 sollte daher die Interaktion mit HSP70B unterbunden sein und Substrate sollten nicht an das Chaperon weitergereicht werden können. Als Ansatzpunkt bot sich die Beobachtung, dass bereits bei der Gewinnung von Protein für die Herstellung von Antikörpern ein drastischer Wachstumsstopp von *E.coli* durch Überexpression von CDJ2 aufgefallen war. Wir gingen davon aus, dass CDJ2 mit einem *E.coli*-Protein interagiert, das für das Zellwachstum essentiell ist und diese Interaktion das bakterielle Protein inaktiviert. Ziel war es, dieses mit CDJ2 interagierende, essentielle *E.coli*-Protein zu identifizieren.

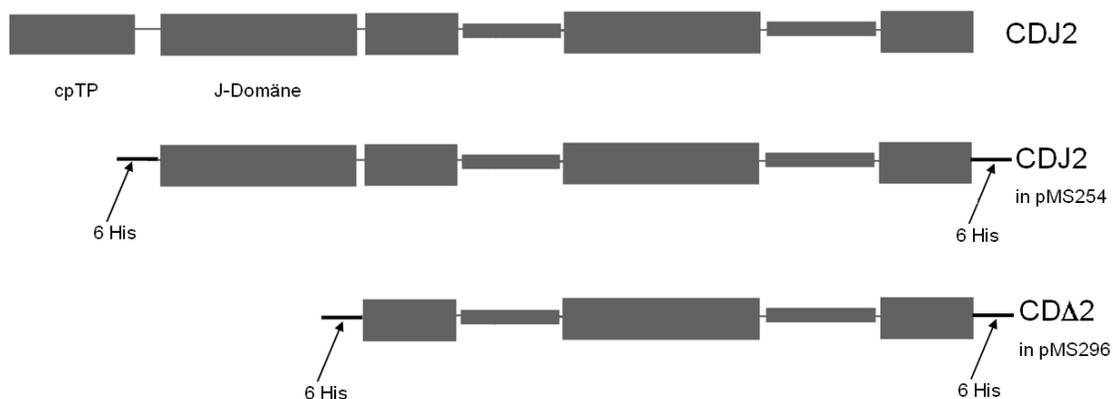


Abb. 20: Schematische Darstellung des Proteins CDJ2. Für die heterologe Expression lagen CDJ2 und CDA2 ohne Chloroplasten-Transitsequenz (cpTP) und mit N- und C-terminalen Hexahistidin-Tags (6 His) vor. CDA2 fehlt zudem die J-Domäne. Die schmaleren Abschnitte bezeichnen nur in *Chlamydomonas* vorliegende Bereiche, wogegen die breiteren Blöcke für auch in höheren Pflanzen vorkommende Proteindomänen stehen.

4.3.1. Überexpression von CDJ2 und CDA2

4.3.1.1. Wachstumskurven

Um den Wachstumsstopp von *E.coli* nach Expression von CDJ2 bzw. CDA2 zu illustrieren, wurden Wachstumskurven aufgenommen. Als Kontrolle wurde parallel zur Überexpression der beiden CDJ2-Variationen das GrpE-Homolog CGE1 – ein Nukleotidaustauschfaktor – ebenfalls in *E.coli* überexprimiert.

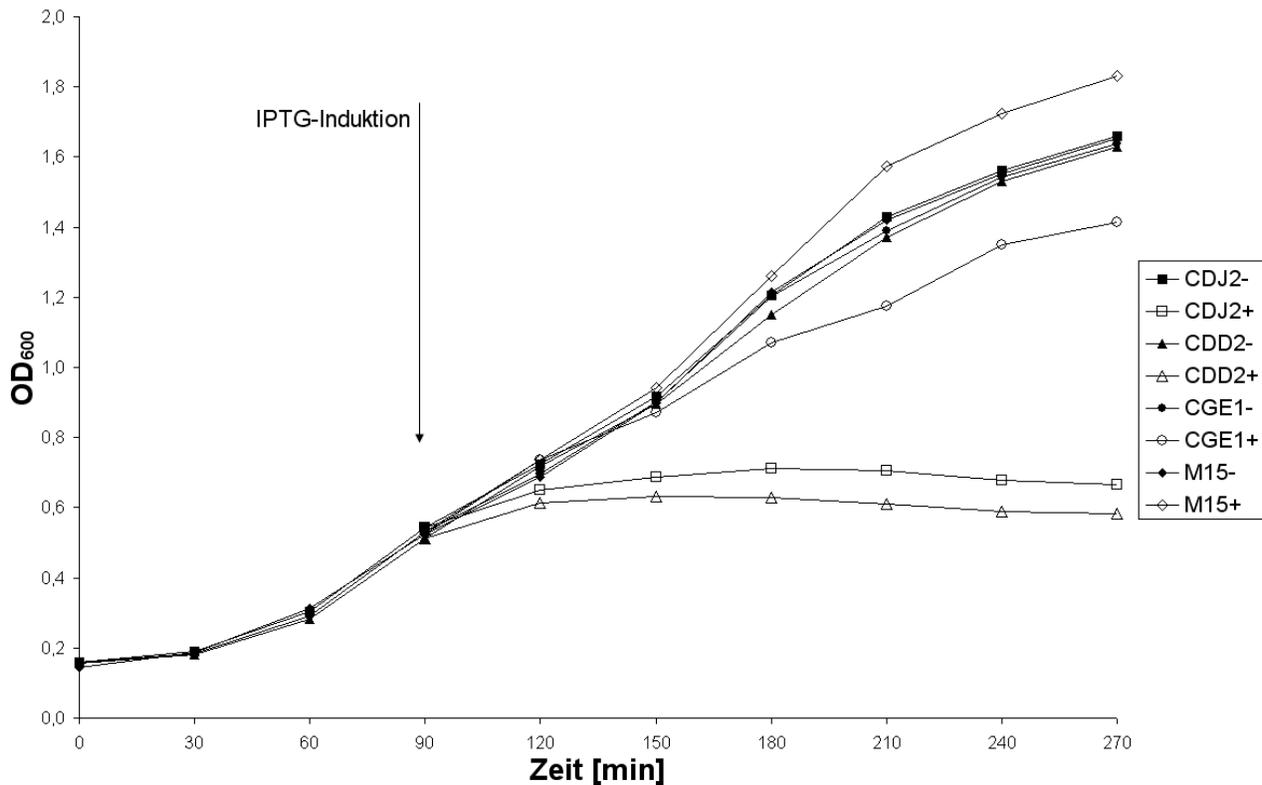


Abb. 21: Wachstumskurve bei Überexpression der Proteine CDJ2, CDA2 und CGE1 nach Induktion durch 1 mM IPTG (+). Festgestellt wurde die Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm. M15 ist der Kontrollstamm ohne Plasmid und wurde daher nicht mit Ampicillin behandelt. Von allen Kulturen wurden zudem nicht-induzierte Kontrollen gemessen (-). Es wurde mit 1 l-LB-amp-Kulturen gearbeitet. CDD2 = CDA2

Die Wachstumskurve der gemessenen *E.coli*-Kulturen zeigt einen normalen Wachstumsverlauf für alle Kulturen bis zum Zeitpunkt der IPTG-Zugabe (Abb.21). Die Trennung in induzierte und nicht induzierte Kulturen gibt an, dass bereits nach 30 min ein

signifikanter Unterschied zwischen den CDJ2 und CDA2 überexprimierenden und allen anderen Kulturen vorliegt. Diese beiden Kulturen zeigen im weiteren Verlauf einen völligen Wachstumsstopp, obwohl die Menge an synthetisiertem CDJ2 bzw. CDA2 eher gering sind (Abb.22 A + B). Bei der CGE1 überexprimierenden Kultur ist eine leicht verringerte Wachstumsrate zu beobachten, die aber wahrscheinlich durch die sehr hohen Mengen des produzierten Proteins in der Zelle erklärt werden kann, die durch Coomassie-Färbung gut erkennbar sind (Abb.22 C).

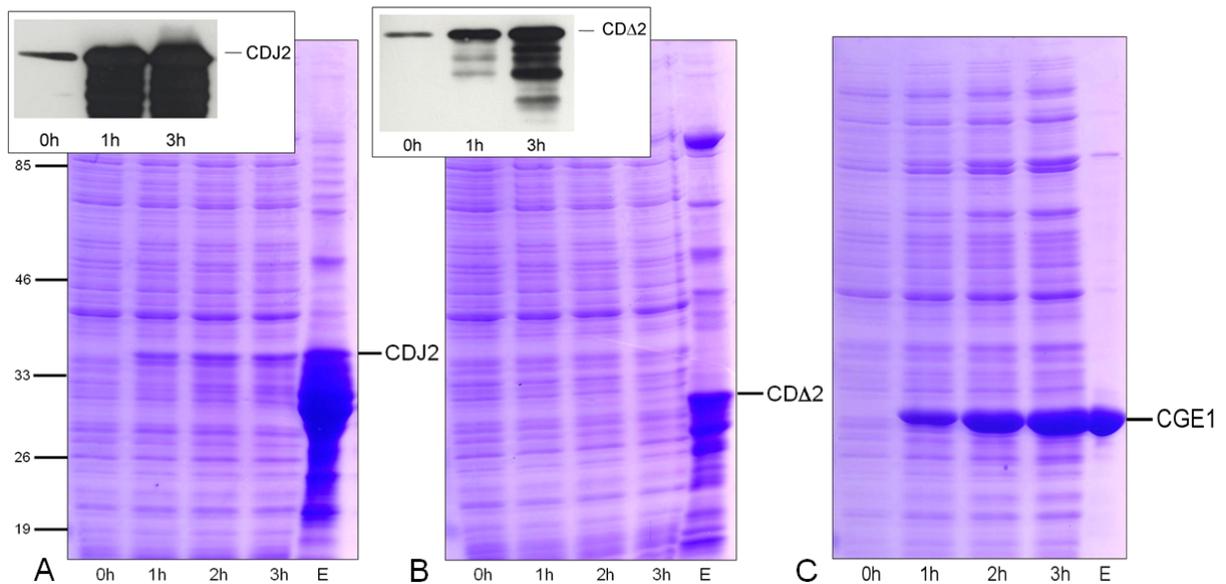


Abb. 22: Analyse der Proteinproben aus den Wachstumskurven sowie der Eluate (E) aus der Imidazol-Elution des Ni-NTA „Pull-down-Assays“. Gezeigt sind mit Coomassie Blue gefärbte Proteingele nach Auftrennung mit 7,5-15% SDS-PAGE. Am Zeitpunkt der Induktion (0h) sowie nach einer Stunde (1h), nach zwei Stunden (2h) und nach drei Stunden (3h) wurden dafür Proteinproben genommen. A + B: Es erfolgte mit CDJ2-Antikörpern der Nachweis der erfolgreichen Überexpression von CDJ2 und CDA2 nach IPTG-Induktion (eingeklinkte Abbildungen). Abb. C weist die erfolgreiche Überexpression von CGE1 nach der IPTG-Induktion durch Coomassie-Färbung nach. Die Elution (E) des Ni-NTA-Pull-down Assays ist bei CGE1 in 1:10-Verdünnung im Vergleich zu den Elutionen von CDJ2 und CDA2 (A + B) aufgetragen, um eine Überladung des Acrylamidgels zu vermeiden.

Dass auch die gewünschten Proteine CDJ2 bzw. CDA2 tatsächlich exprimiert wurden, obwohl die Mengen in der Coomassie-Färbung nur schwach erkennbar waren, ließ sich mit einem immunologischen Nachweis für CDJ2 und CDA2 zeigen (Abb. 22 eingeklinkte Bilder).

Der Antikörper gegen CDJ2 erkennt bei der Detektion auch die verkürzte Proteinversion CDA2 spezifisch. Obwohl die produzierten Proteinmengen deutlich unter der des CGE1 liegen, sind die Auswirkungen auf die Wachstumsrate signifikant stärker. Ein Wachstumsstopp allein durch die Expression artfremden Proteins in großen Mengen kann daher ausgeschlossen werden.

Die Überexpression zeigt sehr reproduzierbar in mehreren unabhängigen Versuchen die gleichen Ergebnisse unabhängig vom Volumen der Ansätze (50 ml bis 1 l).

4.3.1.2. Bestimmung des Proteinkonzentration

Um zu überprüfen, ob mit dem Wachstumsstopp lediglich die Zellteilung, nicht aber die Proteinsynthese betroffen war, wurde der Proteingehalt, der während der Überexpression gewonnenen Proben bestimmt. Dazu wurden von drei aufgenommenen Wachstumskurven unabhängige Proteinbestimmungen mit Amidoschwarz durchgeführt (Abb.23).

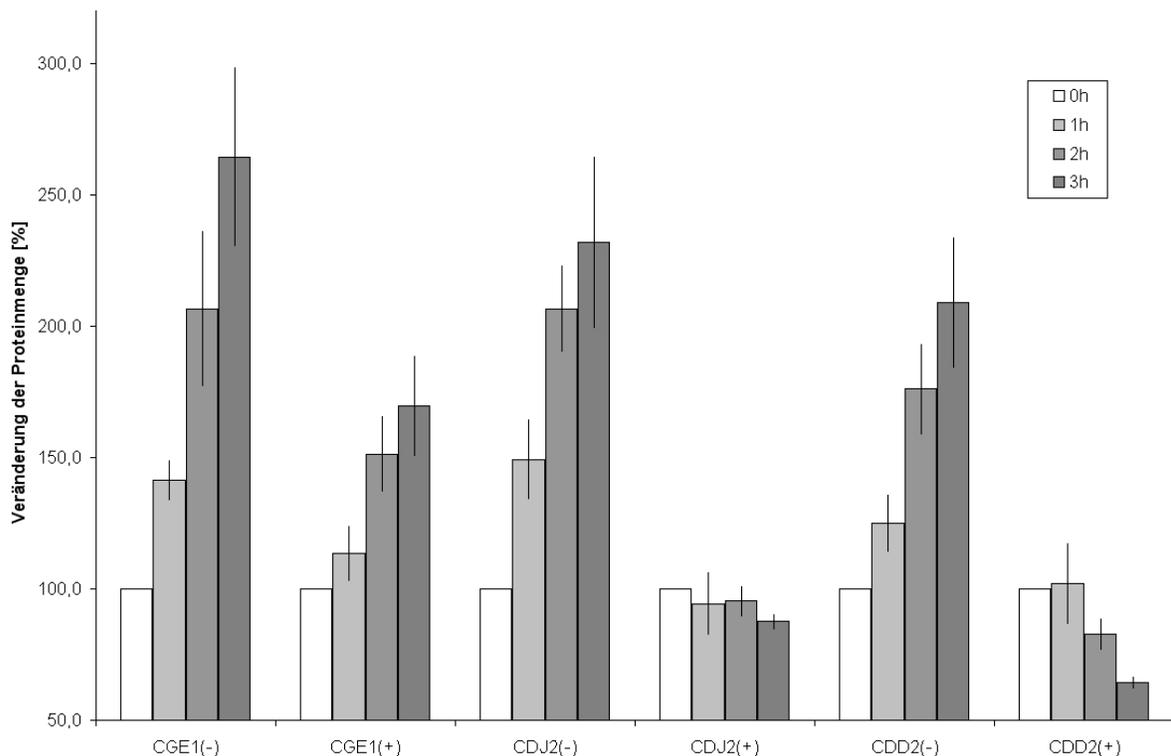


Abb. 23: Mit Amidoschwarz durchgeführte Gesamtproteinbestimmung der Proteinproben der Wachstumskurve. Aufgetragen ist die prozentuale Veränderung der Proteinmenge im Verlauf der Wachstumskurve während der Überexpression. Die Probenentnahme erfolgte zum Induktionszeitpunkt (0h), nach einer (1h), nach zwei (2h) und nach drei Stunden (3h). Nicht induzierte Kulturen (-) wurden induzierten gegenübergestellt (+). Die Fehlerbalken bezeichnen den Standardfehler des Mittelwertes (SEM) wobei n=3. CDD2 = CDA2

Der mit Fehlerbalken dargestellte Standardfehler des Mittelwerts (SEM) nimmt zu bei den Werten, die aus nicht induzierten, stark wachsenden Kulturen gewonnen wurden. Bei CDJ2 (+) und CDA2 (+) hingegen zeigt die Proteinbestimmung ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit.

Es kann ein leichter Rückgang der Proteinkonzentrationen in den CDJ2 bzw. CDA2 exprimierenden Kulturen nach der Induktion beobachtet werden (-13,6 % bzw. -32 % im Vergleich zum Induktionszeitpunkt). Die durchschnittliche prozentuale Zunahme der nicht-induzierten Kulturen lag dagegen bei 111 % innerhalb von 3 Stunden. *E.coli*-Zellen, die CGE1 überexprimierten, zeigten eine Proteinkonzentrationszunahme von nur 57 % im gleichen Zeitraum.

4.3.2. Ni-NTA „Pull-down-Assay“

Aus der im Anschluss an die Überexpression gewonnenen Zellmasse sollten anschließend die CDJ2- bzw. CDA2-Proteine isoliert werden, wobei potentielle Interaktionspartner aus *E.coli* ebenfalls mitisoliert werden sollten. Verwendung fanden hier die N- und C-terminalen Hexahistidin-Tags, die sowohl die Aminosäuresequenz von CDJ2 wie auch von CDA2 flankierten (Abb. 20).

Die Wirkungsweise der Proteinaufreinigung unter Zuhilfenahme von Ni-NTA Superflow von Qiagen ist im Detail in Abb. 24 dargestellt.

Die Elution der Proteine nach der Aufreinigung erfolgte zunächst nach Angabe des Herstellers mit 200 mM Imidazol um alle Proteine von den Ni-NTA-beads zu eluieren (Abb. 24 A). Durch die gleichzeitige Ablösung aller gebundenen Polypeptide von der Ni-NTA Matrix war das Eluat sehr proteinhaltig, wobei der größte Mengenanteil CDJ2 bzw. CDA2 zukam. Das hohe Bindungsvermögen der Ni-NTA-Matrix an die His-Tags ist bei der Aufreinigung dieser beiden eine wertvolle Eigenschaft. In dem verwendeten Ni-NTA „Pull-down-Assay“ konnten mit CDJ2 bzw. CDA2 zusammen angereicherte Proteine dadurch jedoch schlecht identifiziert werden.

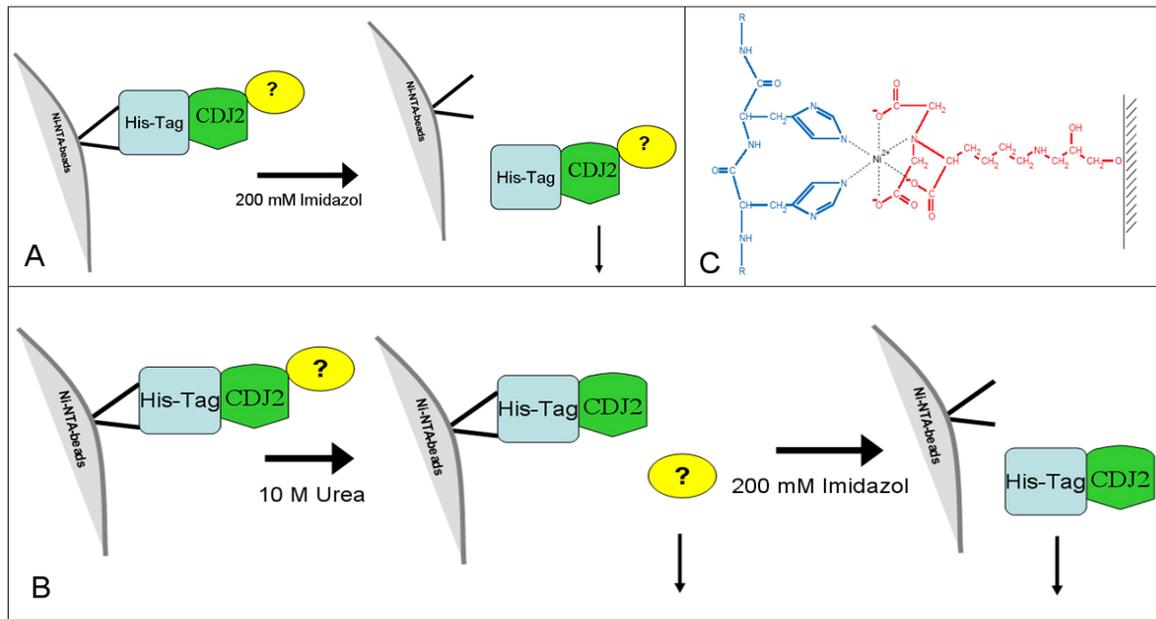


Abb. 24: Schematische Darstellung der Elution der Ni-NTA-Kügelchen im „Pulldown-Assay“. A: Die Elution erfolgte zunächst nur in einem Schritt mit 200 mM Imidazol, das das Protein mit Hexahistidin-Tag (His-Tag) zusammen mit den daran gebundenen unbekannten Proteinen von den Ni-NTA-Kügelchen trennte und in Lösung brachte. B: Um eine bessere Trennung des Proteins mit Hexahistidin-Tag (hier CDJ2) und den mit diesem interagierenden Proteinen zu erreichen, erfolgte zunächst eine Elution mit gesättigter Harnstoff-Lösung. Da der His-Tag auch unter denaturierenden Bedingungen mit Ni-NTA interagiert, sollte Harnstoff nur die Wechselwirkung zwischen CDJ2 und interagierenden Proteinen aufheben. In einem zweiten Schritt erfolgte die Elution wie in A. C: Genaue Darstellung der Interaktionsweise der Histidine und der Ni-NTA Matrix (Quelle: Qiagen) Zwei Histidine-Reste (blau) binden an ein Ni-Ion gebunden an NTA (rot), welches mit einer Kunstharz-Matrix (schwarz) verbunden ist. An einem Hexahistidin-Tag werden demnach drei der dargestellten Verbindungen wirksam.

Da auf Acrylamidgele nur begrenzte Proteinmengen pro Spur geladen werden können, war der Anteil weiterer Proteine außer CDJ2 und CDA2 stark reduziert. Trotzdem sind verschiedene angereicherte Proteine zu erkennen (Abb. 22 A + B). Es wird sich dabei jedoch nicht bei allen um potentielle mit CDJ2 bzw. CDA2 interagierende Proteine handeln, da direkte Wechselwirkungen mit Ni-NTA auftreten können. Hervorzuheben ist eine deutliche Bande bei ca. 100 kDa in der CDA2-Elution. Diese ist besonders auffällig, da sie in der Elution von CDJ2 kaum zu sehen ist. Bei einer unspezifischen Wechselwirkung mit Ni-NTA müsste sie auch dort aufzufinden sein.

4.3.3. Massenspektrometrische Untersuchung der potentiellen Interaktionspartner

Um eine bessere Trennung der Proteine mit His-Tag und potentiellen Interaktionspartnern erreichen zu können, wurde in einem zweiten Ansatz zunächst mit gesättigter Harnstoff-Lösung eluiert und erst in einem weiteren Schritt mit Imidazol. (Abb. 24. B) Ziel dabei war, dass die Elution mit Harnstoff an nur CDJ2 bzw. CD Δ 2 gebundene Proteine löst, ohne die Interaktion der His-Tags mit Ni-NTA zu beeinflussen. Das Ergebnis zeigt, dass wie erhofft der Anteil der möglicherweise mit CDJ2 bzw. CD Δ 2 interagierenden Proteine (vor allem das bei 100 kDa) im Verhältnis zu diesen selbst stark zugenommen hat (Abb. 25).

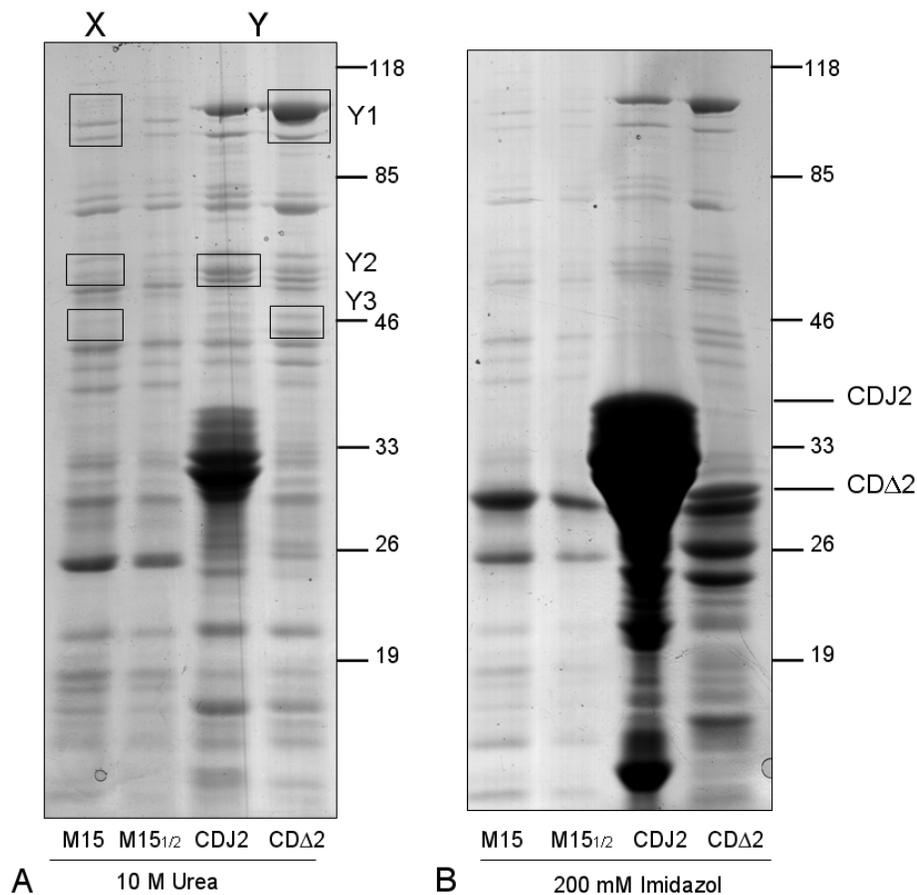


Abb. 25: Coomassie-Färbung des Ni-NTA „Pull-down-Assays“, aufgetrennt mit 7,5-15% SDS-PAGE. Der Lysepuffer enthielt 0,1% Triton. M15 _{1/2} bezeichnet die Auftragung des halben Volumens im Vergleich zu M15. A: Aus dem Gel der mit gesättigter Harnstoff-Lösung eluierten Proben wurden die Banden Y1, Y2 und Y3 sowie die entsprechenden Kontrollbanden (X1, X2, X3) für die massenspektrometrische Untersuchung ausgeschnitten. B: CDJ2 bzw. CD Δ 2 treten in den Elutionsproben mit 200 mM Imidazol in großen Mengen auf.

Um im Anschluss an die Anreicherung und Auftrennung möglicher Interaktionspartner diese massenspektrometrisch untersuchen zu können, ist der Ausschluss unspezifisch an Ni-NTA bindender Polypeptide notwendig. Zur Kontrolle kann daher der Stamm M15 ohne eintransformiertes Plasmid verwendet werden. Bei Banden, die auch hier verstärkt mit Coomassie angefärbt werden können, kann nicht von einer spezifischen Wechselwirkung ausgegangen werden.

Es wurden daher aus den Gelspuren, die die Harnstoff-Eluate der CDJ2- und CDΔ2- „Pulldown-Assays“ enthielten, die drei mit Y1-Y3 bezeichneten Abschnitte für die Massenspektrometrie ausgewählt. In den gleichen Größenbereichen mussten daher auch in der Gelspur mit dem Harnstoff-Eluat der Kontrolle zur Analyse aufbereitet werden. Ein tryptischer Verdau im Gel sowie die Extraktion der Peptide wurden vor der massenspektrometrischen Analyse der Proben am Institut für Allgemeine Botanik in Jena durchgeführt.

Da Trypsin spezifisch nach den Aminosäuren Lysin und Arginin schneidet, entstehen spezielle Peptide, die mit ESI-MS/MS analysiert werden können. Das Ergebnis ist schließlich ein für die Peptide einzigartiges Fragmentmuster, das nun mit einer Datenbank von *in silico* verdauten *E.coli*-Proteinen verglichen wird. Es werden Peptidsequenzen als Ergebnisse der Analyse angegeben, und diese können dann den entsprechenden *E.coli*-Proteinen zugeordnet werden. Damit ein Protein eindeutig identifiziert werden kann, müssen mindesten zwei verschiedene Peptide detektiert werden. Die Zahl der insgesamt identifizierten Peptide gibt eine Tendenz an, wie hoch das jeweilige Protein in einer Probe konzentriert ist.

Die Ergebnisse der Massenspektrometrie der Proben Y1-Y3 sind im Folgenden zusammengestellt. Ausgewählt wurden Proteine, die den ausgeschnittenen Banden entsprechende Größen besitzen (Y1 ca. 100 kDa; Y2 ca. 52 kDa; Y3 ca. 45 kDa). Sie kommen entweder nur in den Eluaten von CDJ2- bzw. CDΔ2- „Pulldown-Assays“ vor oder es sind dort signifikant mehr Peptide identifiziert worden. Bei angereicherten Proteinen ist die Anzahl der identifizierten Peptide in der Kontrolle in Klammern angegeben (Tabelle 6).

Tabelle 6 Ergebnisse der Massenspektrometrie

Protein	Funktion	Y1 _a (X1) _c		Y2 _b (X2) _c		Y3 _a (X3) _c	
		Peptide	Peptide ges.	Peptide	Peptide ges.	Peptide	Peptide ges.
Preprotein Translocase	Peptidsekretion, Transport großer Moleküle	44 (4)	394 (4)	3	3	2	2
Pyruvat-Dehydrogenase	Energieproduktion und -umwandlung	7 (1)	8 (1)				
Pyruvat-Kinase II	Transport, Metabolismus			15 (9)	59 (18)		
D-amino acid dehydrogenase subunit	AS-Abbau					11 (4)	47 (4)
Protein chain elongation factor EF-Tu	Protein-Translation und Modifikation					4	5

a: aus Gelspur des Harnstoff-Eluats des CDΔ2-, „Pulldown-Assays“

b: aus Gelspur des Harnstoff-Eluats des CDJ2-, „Pulldown-Assays“

c: aus Gelspur des Harnstoff-Eluats des M15-, „Pulldown-Assays“ (Kontrolle)

In dieser Darstellung der Ergebnisse fällt vor allem das als „Preprotein translocase“ bezeichnete Protein auf. Es wird zwar auch in der Kontrolle aufgefunden, aber die Gesamtzahl von 394 identifizierten und davon 44 unterschiedlichen Peptiden ist extrem viel höher als in der Kontrolle (nur insgesamt 4 Peptide). Auch in den Banden Y2 und Y3 lassen sich einzelne Peptide dieses Proteins nachweisen, wobei es sich wohl um Abbauprodukte handelt. Durch Vergleich der Peptidsequenzen ließ sich „Preprotein translocase“ als Bestandteil des Sec-Sekretionsweges festmachen (Abb. 26).

MLIKLLTKVFGSRNDRTLRRMRKVVNI INAMEPEMEKLSDEELK GKTAEFRARLEKGEVLENLIPEA
FAVVREASKRVFGMRHFDVQLLGGMVLNERCIAEMRTGEGKTLTATLPAYLNALTGKGVHVVTVNDY
LAQRDAENNRPLFEFLGLTVGINLPGMPAPAKREAYAADITYGTNNEYGFYDLRDNMAFSPEERVQR
KLHYALVDEVDSILIDEARTPLIISGPAEDSSEMYKRVNKIIPHLIRQEKEDSETFQEGGHFSVDEK
SRQVNLTERGLVLIIEELLVKEGIMDEGESLYSPANIMLMHHVTAALRAHALFTRDVDYIVKDGEVI I
VDEHTGRTMQGRRWSDGLHQAVEAKEGVQIQNENQTLASITFQNYFRLYEKLAGMTGTADTEAFEF
SIYKLDTVVVPNTNRP M IRKDL PDLVYMTAEAKIQAI IEDIKERTAKGQPVLVGTISIEKSELVSNEL
TKAGIKHNVLNAKFHANEAAI VAQAGYPAAVTIATNMAGRGTDIVLGGSWQAEVAALENPTAEQIEK
IKADWQVRHDAVLEAGGLHIIGTERHESRRIDNQLRGRSGRQGDAGSSRFYLSMEDALMRI FASDRV
SGMMRKLGMKPGEAIEHPVWTKA IANAQRKVESRNFDIRKQLLEYDDVANDQRRAIYSQRNELLDVS
DVSETINSIREDVFKATIDAYIPPOSLEEMWDIPGLQERLKNDFDLDLPIAEWLDKEPELHEETLRE
RILAQSIIEVYQRKEEVVGAEMMRHFKEGVMLQTLDSLWKEHLAAMDYLRQGIHLRGYAQKDPKQEYK
RESFSMFAAMLES LKYEVI STL SKVQVRMP EEEVEELEQQRRMEAEERLAQMQQLSHQDDDSAAAAALA
AQTGERKVGVRNDPCPCGSGKKYKQCHGRLQ

Abb. 26: Darstellung der Aminosäuresequenz von SecA aus *E.coli*. Unterstrichen sind die Sequenzabschnitte dargestellt, die als Peptide mit Massenspektrometrie identifiziert wurden.

Es handelt sich dabei um eine lösliche ATPase mit einer Größe von 102 kDa, die als SecA bezeichnet wird. Dieses Protein sollte im Folgenden näher betrachtet werden. Die anderen identifizierten Proteine lassen keinen unmittelbaren Zusammenhang zur betrachteten Fragestellung vermuten und wurden bis jetzt nicht weiter untersucht.

4.3.4. Arbeiten mit dem Antikörper gegen SecA aus *E.coli*

Aufgrund der Sequenzähnlichkeit des SecA in *E.coli* und *Chlamydomonas* (s. Alignment im Anhang) lag die Vermutung nahe, dass mit einem gegen das bakterielle Protein gerichteten Antikörper auch das Homolog in *Chlamydomonas* detektiert werden könnte. Möglicherweise könnte dieser Antikörper dann auch für eine Co-Immunopräzipitation in *Chlamydomonas* Verwendung finden. Damit wäre ein direkter Nachweis der Interaktion zwischen SecA und CDJ2 in *Chlamydomonas* möglich.

Ein bereits vorhandener Antikörper gegen SecA aus *E.coli* wurde von Prof. M. Müller vom Institut für Biochemie und Molekularbiologie in Freiburg für weiterführende Experimente bereitgestellt. Mit diesem sollte zunächst die Anreicherung von SecA im Ni-NTA „Pull-down-Assay“ bestätigt werden und parallel ein Gesamtzellextrakt von *Chlamydomonas* auf mit diesem Antikörper detektierte Protein-Banden untersucht

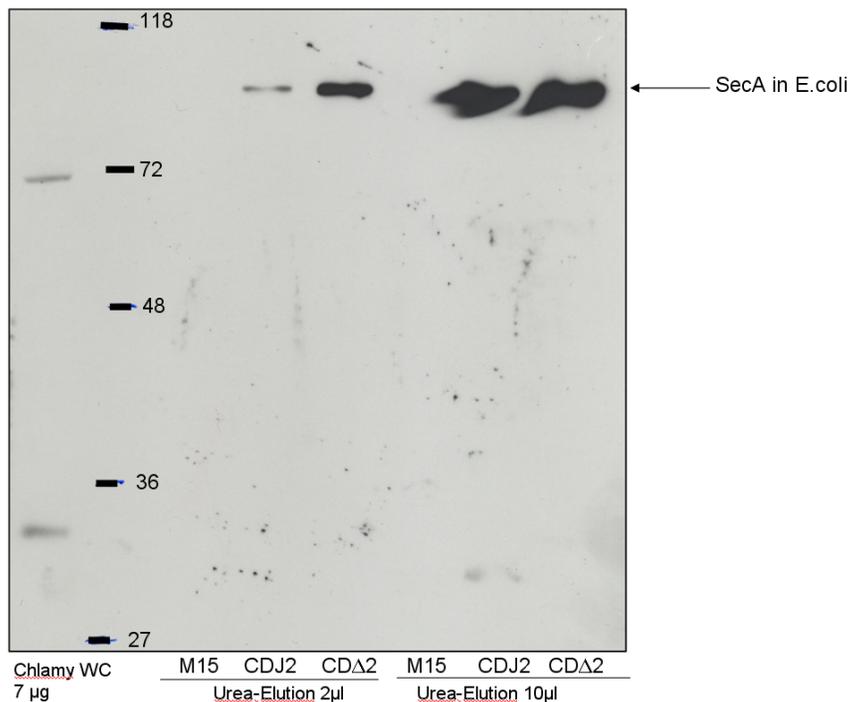


Abb. 27: Western Blot und immunologischer Nachweis von SecA aus *E.coli* in Ni-NTA-Eluaten. Neben den Harnstoff-Eluaten der CDJ2-, CDΔ2- und Kontroll (M15)- „Pull-down-Assays“ wurde zudem Gesamtzelllysate von *Chlamydomonas*-Zellen des Stamms CW15(2) (Chlamy WC) aufgetragen.

werden.

In der Harnstoff-Elution lässt sich die starke Anreicherung von SecA nach dem „Pull-down-Assay“ von CDJ2 bzw. CDA2 im Vergleich zur Kontrolle mit dem Stamm M15 klar nachweisen (Abb.27). Dies zeigt, dass SecA nur in den CDJ2 und besonders CDA2 überexprimierenden Kulturen mit einer Ni-NTA-Matrix angereichert wird und keine unspezifische Wechselwirkung von SecA mit der Ni-NTA-Matrix vorliegt. Besonders das Fehlen der J-Domäne scheint ein wichtiger Faktor für eine erhöhte Ankonzentrierung zu sein. Eine stabile Interaktion zwischen CDJ2 bzw. CDA2 aus *Chlamydomonas* und SecA aus *E.coli* kann daher als gesichert angenommen werden.

Problematischer dagegen stellt sich die Detektion des SecA-Homologs aus *Chlamydomonas* mit dem bakteriellen Antikörper dar. Die beiden bei etwa 70 bzw. 32 kDa detektierten Banden sind möglicherweise Abbauprodukte des 102 kDa großen SecA-Proteins. Obwohl der Antikörper demnach das denaturierte SecA-Protein aus *Chlamydomonas* nicht ausreichend erkannte, bestand die Möglichkeit, dass sich das native Protein damit detektieren ließe.

Daher wurden Co-Immunopräzipitationen in *Chlamydomonas* wie auch in *E.coli* mit dem Antikörper gegen das bakterielle Protein durchgeführt.

4.3.5. Co-Immunopräzipitation von SecA und CDJ2 aus *Chlamydomonas*-Zellextrakten

In der Hoffnung, die Interaktion der ATPase SecA mit dem Cochaperon CDJ2 auch im homologen System in *Chlamydomonas* nachzuweisen, wurde unter Zuhilfenahme des Antikörpers gegen *E.coli*-SecA eine Immunopräzipitation durchgeführt. Zusätzlich wurde als Kontrolle die IP aus den gleichen Zellextrakten mit Präimmun-Serum vorgenommen (Abb. 28).

CDJ2 wird in der Immunopräzipitation mit dem entsprechenden Antikörper wie erwartet stark angereichert, ist jedoch in der SecA-Immunopräzipitation kaum zu erkennen. Die CDJ2-Konzentration erscheint dort sogar noch geringer als in der Präimmun-Kontrolle.

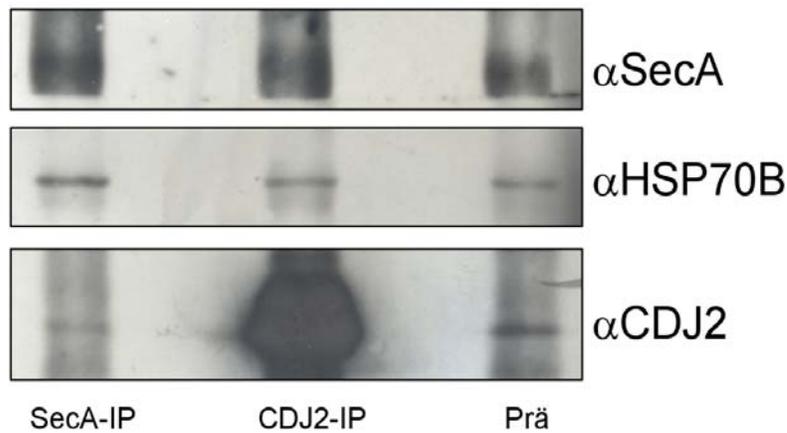


Abb. 28: Co-Immunopräzipitation von CDJ2 und SecA aus *Chlamydomonas*-Zellextrakten. Gezeigt ist ein Western Blot nach Auftrennung der Immunopräzipitationen auf 7,5-15% SDS-PAGE. In der Bildunterschrift ist der Antikörper angegeben, mit dem die Immunopräzipitation durchgeführt wurde. Prä steht für die Kontroll-Immunopräzipitation mit Präimmunserum. Die bei der Detektion verwendeten Antikörper sind rechts neben der Abbildung aufgeführt. Sowohl die SecA-Immunopräzipitation wie auch die Detektion wurden mit dem Antikörper gegen *E.coli*-SecA durchgeführt. Die Antikörper gegen HSP70B und CDJ2 sind gegen die Proteine aus *Chlamydomonas* gerichtet.

Plastidäres HSP70B kann in allen Proben in geringem Maß detektiert werden. Es scheint in der SecA-Immunopräzipitation ein wenig angereichert vorzuliegen. Eine eindeutige Detektion von SecA ist dagegen in allen drei Proben praktisch unmöglich.

Auch ein mit Silber gefärbtes Gel der gleichen

Immunopräzipitations-

Proben (ohne Abbildung) konnte nur die Anreicherung von CDJ2 belegen. Eine Bande im Größenbereich von SecA ließ sich in der SecA-Immunopräzipitation unter idealer Beleuchtung auf einem Lichttisch schwach erahnen, war jedoch zu gering konzentriert, um in einem Scan oder Foto des Gels dargestellt werden zu können. Ein Nachweis, dass SecA als Substrat von CDJ2 mit diesem auch in *Chlamydomonas* interagiert ist daher nicht erfolgt.

In diesem Experiment wurde eine 0,5 % Triton-Konzentration verwendet, da zu dem entsprechenden Zeitpunkt der Einfluss des Detergenz noch nicht eindeutig festgestellt war. Daher lässt sich nicht ausschließen, dass mit einer geringeren Menge Triton X-100 im Lysepuffer aussagekräftigere Ergebnisse hätten erzielt werden können.

Da der Antikörper gegen *E.coli*-SecA das homologe SecA aus *Chlamydomonas* weder im Western Blot von Gesamtzell-Protein noch in der Immunopräzipitation erkannt zu haben schien, war die Herstellung eines spezifisch gegen plastidäres SecA aus *Chlamydomonas* gerichteter Antikörper unabdingbar.

4.3.6. Verhalten der SecA-Konzentration während der CDJ2 Überexpression

Um eine mögliche Induktion von SecA durch die Überexpression von CDJ2 während der Wachstumskurve zu verfolgen, wurden die dort genommenen Proteinproben in einer SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und mit dem SecA-Antikörper gegen das *E.coli*-Protein detektiert. Als Kontrolle diente das im gleichen Versuch überexprimierte plastidäre GrpE Homolog CGE1 (Abb. 29).

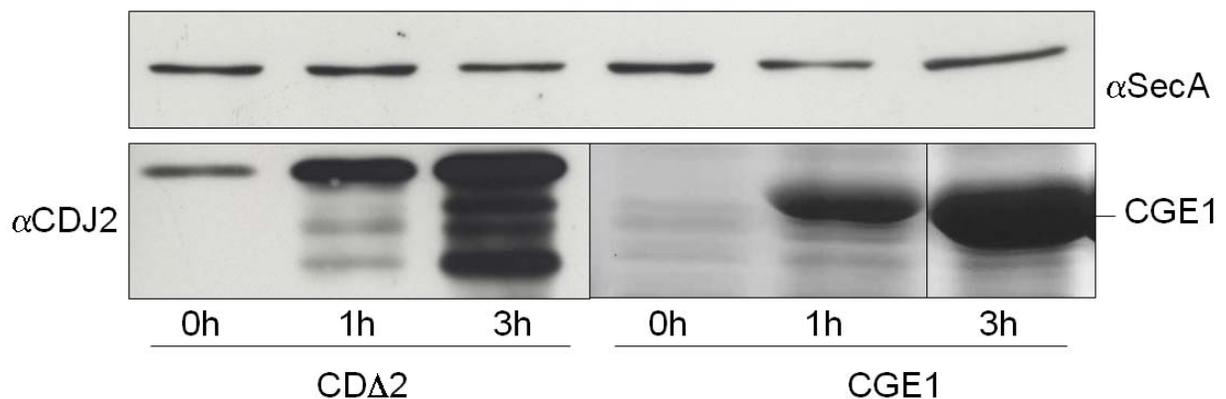


Abb. 29: Western Blot und immunologischer Nachweis von SecA in Proben nach Induktion der Überexpression von CDA2 bzw. CGE1. Probenentnahme fand zum Induktionszeitpunkt (0h), nach einer Stunde (1h) und nach drei Stunden (3h) statt. Die Auftragung der Proben fand auf Basis gleicher Proteinmengen statt, die durch Proteinbestimmung mit Amidoschwarz festgestellt wurden. Zur Kontrolle, ob CDA2 und CGE1 auch exprimiert wurden, ist ein Western Blot der Wachstumskurve detektiert mit dem Antikörper gegen CDJ2 dargestellt sowie eine Coomassie-Färbung der Auftragung von Proteinproben der CGE1-Expression.

Es konnte sowohl nach Induktion von CDA2 wie auch von CGE1 keine Zunahme von SecA im Verhältnis zur Proteinmenge vor der Induktion festgestellt werden. Durch die heterologe Überexpression dieser *Chlamydomonas*-Proteine findet keine Induktion der Expression von SecA in *E.coli* statt.

4.3.7. Einfluss von Triton X-100 auf die Interaktion von SecA und CDJ2

Die Aufreinigung der CDJ2- bzw. CD Δ 2-Proteine mit His-Tag unter Verwendung von Ni-NTA wurde mit Lysepuffer mit einer Konzentration von 0,1 % Triton X-100 durchgeführt. Um die bakterielle Plasmamembran stärker zu solubilisieren wurde eine weitere Reinigung mit Lysepuffer durchgeführt, der 2% Triton enthielt. Erwartet wurde ein besseres Solubilisieren von Membranproteinen, an die CDJ2 außerdem binden könnte. Zusätzlich sollte störender Hintergrund durch unspezifisch an Ni-NTA bindende Proteine dadurch reduziert werden. Dies sollte SecA deutlicher hervortreten lassen.

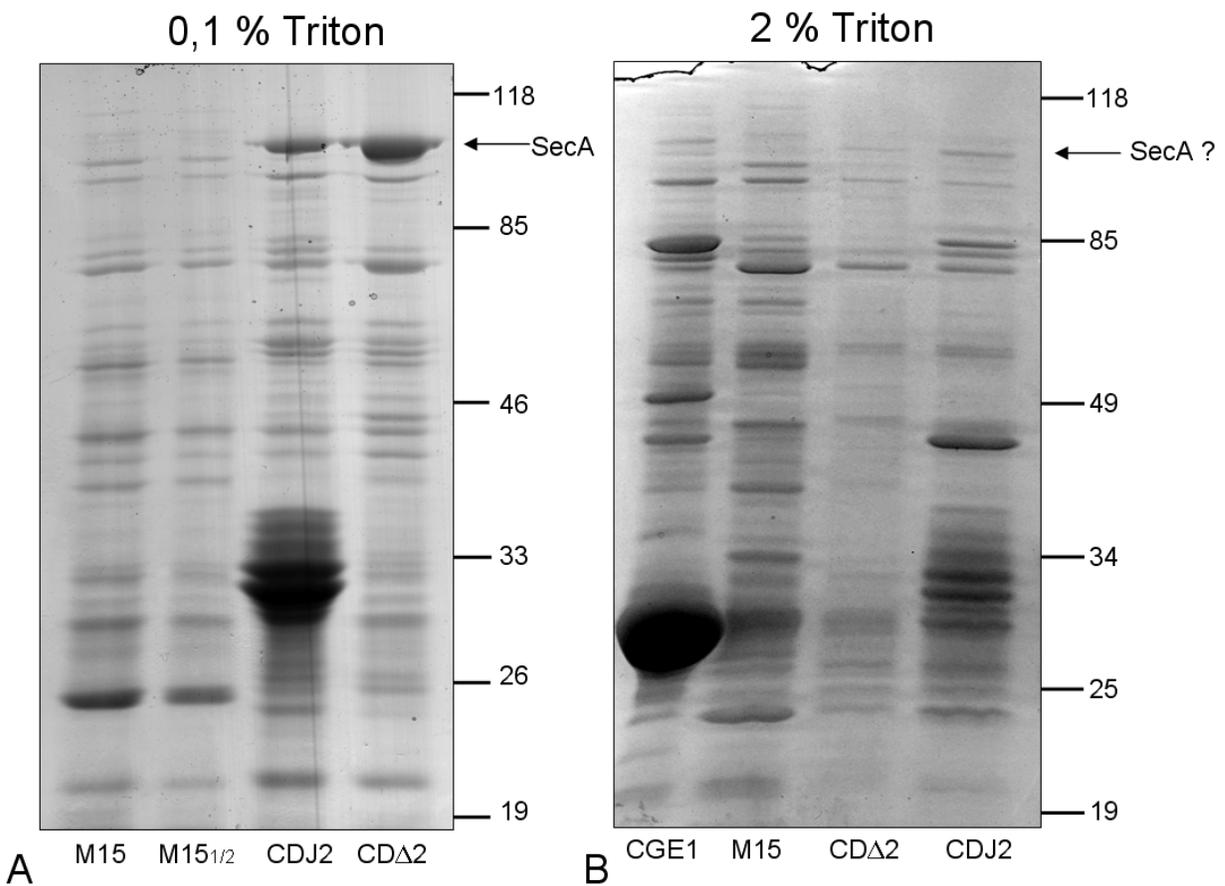


Abb. 30: Analyse der mit gesättigtem Harnstoff und unterschiedlichen Triton X-100 generierten Ni-NTA-Eluate. Unter der Abbildung ist das überexprimierte Protein bzw. M15 als Kontrolle angegeben. Bei M15 $_{1/2}$ wurde nur das halbe Volumen aufgetragen. Abb. A stellt die Elution mit 0,1% Triton im Lysepuffer dar und wurde mit kolloidalem Coomassie gefärbt. In Abb. B sind mit 2 % Triton im Lysepuffer eluierte Proben aufgetragen; es wurde mit Coomassie Brilliant Blue gefärbt.

Trotz einer intensiveren Bandenanfärbung durch kolloidales Coomassie im Vergleich zu Coomassie Brilliant Blue und dadurch erscheinenden Konzentrationsunterschieden fällt jedoch die deutliche Reduktion der SecA-Bande (102 kDa) bei Verwendung von 2 % Triton X-100 im Lysepuffer auf. Da der einzige Unterschied der beiden Experimente in der verwendeten Triton-Konzentration lag, erschien dies als wahrscheinliche Ursache. Es war daher zu vermuten, dass eine zu hohe Konzentration an Triton X-100 die Interaktion zwischen SecA und CDJ2 stört und die ATPase damit im Ni-NTA-Pulldown Assay nicht mehr mit angereichert wird. Um dies zu überprüfen, wurden mit Zellextrakt von CDA2 überexprimierenden Zellen 6 parallele Aufreinigungen mit verschiedenen Triton-Konzentrationen durchgeführt. Alle Bedingungen einschließlich des Zellmaterials waren identisch, ausgenommen der dem Lysepuffer zugesetzten Menge Triton X-100 (Abb. 31).

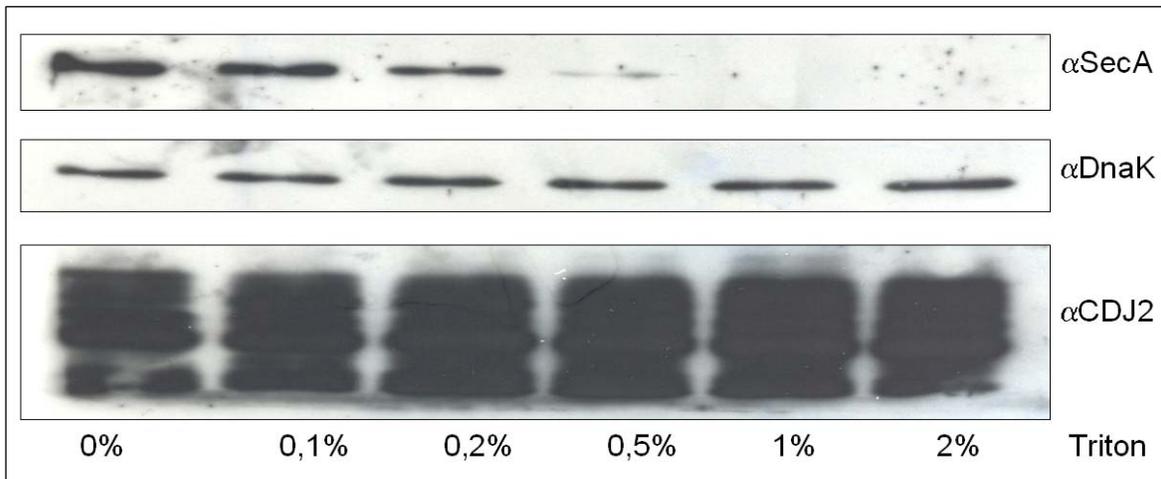


Abb. 31: Analyse der Abhängigkeit der CDA2-SecA-Interaktion von der Triton X-100-Konzentration. Gezeigt ist ein Western Blot nach Auftrennung der Harnstoff-Eluate der CDA2- „Pull-down-Assays“ auf 7,5-15% SDS-PAGE. SecA (α SecA), DnaK (α DnaK) und CDA2 wurde mit dem Antikörper gegen CDJ2 nachgewiesen (α CDJ2). Nach der induzierten Überexpression von CDA2 wurden die Zellen aus 1 l Kultur geerntet. 6 verschiedene Ni-NTA-Pulldown-Experimente wurden mit den verschiedenen angegebenen Triton-Konzentrationen im Lysepuffer durchgeführt. Die Elution erfolgte mit gesättigter Harnstoff-Lösung.

DnaK, das HSP70 Homolog aus *E.coli* zeigt keine Veränderung in der Affinität zu CDA2, mit dem zusammen es von den Ni-NTA-Kügelchen eluiert wird. Die Affinität von SecA für CDA2 nimmt dagegen mit steigender Triton-Konzentration stark ab. Bei einer Konzentration von 1 % Triton X-100 im Lysepuffer ist bereits kein eluiertes SecA mehr

detektierbar. Die nachweisbare Menge an CDA2 bleibt dabei jedoch immer vergleichbar groß. Dieses Ergebnis bestätigt eindeutig eine Störung der Interaktion von SecA und CDA2 durch Triton X-100. Experimente, bei denen diese Wechselwirkung untersucht werden soll, dürfen daher mit maximal 0,1 bis 0,2 % Triton X-100 durchgeführt werden.

4.3.8. Klonierung der SecA-cDNA in den Expressionsvektor pTYB11

4.3.8.1. Verschiedene Isoformen von SecA in *Chlamydomonas*?

Um *Chlamydomonas*-SecA heterolog in *E.coli* zu exprimieren und zu reinigen, war eine erfolgreiche Klonierung des für SecA kodierenden Gens aus *Chlamydomonas* Voraussetzung. Im Anschluss daran kann durch Kaninchen-Immunsierung ein Serum mit spezifischen Antikörpern gewonnen werden.

In der *Chlamydomonas*-Genomsequenz konnten 2 Gene identifiziert werden, die potentiell für SecA-Homologe kodieren. Bei SecA2 handelt sich aber vermutlich nur um einen zusätzlich eingetragenen, unvollständigen Genabschnitt. Alternativ wäre auch eine Genduplikation möglich, die aber noch nicht lange besteht, da sich die Sequenzen nur in sehr wenigen Nukleotiden unterscheiden.

4.3.8.2. Klonierung von SecA unter Verwendung von cDNA

Ein für das *Chlamydomonas*-SecA kodierender cDNA-Klon (AV642591) wurde vom Kazusa DNA Research Institute zur Verfügung gestellt.

Da in der Sequenz von SecA eine natürliche SapI-Restriktionsschnittstelle enthalten ist (s. Anhang 2), musste, wenn mit diesem Enzym gearbeitet werden sollte, die Klonierung in zwei Teilschritten erfolgen. Zunächst wurde der erste Genabschnitt von SecA durch PCR amplifiziert. Die Primer wurden dabei so hergestellt, dass am 3' Ende des ersten Teilabschnittes eine XhoI- vor der internen SapI-Schnittstelle generiert wurde. Durch PCR-Amplifikation entstand ein 1358 bp langes Produkt (Abb. 32).

Im Anschluss wurde dieses und der Expressionsvektor pTYB11 mit den Restriktionsenzymen SapI und XhoI verdaut. Durch eine nachfolgende Ligation entstand das Zwischenprodukt „11-PCR“.

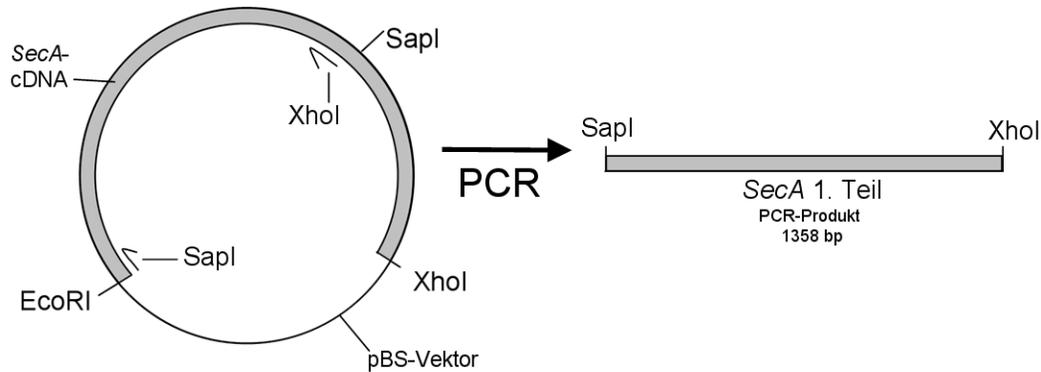


Abb. 32: Auf der *SecA*-cDNA wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt, um den ersten Genabschnitt des *SecA* zu amplifizieren. Eine Klonierung des gesamten *SecA* in einem Schritt war durch eine natürliche *SapI*-Schnittstelle in der Sequenz (eingezeichnet) nicht möglich.

Durch Verdau des Plasmids „11-PCR“ sowie der *SecA*-cDNA des Kazusa DNA Research Institute (mit den Restriktionsenzymen *AscI* und *XhoI*) und anschließende Ligation konnte der Expressionsvektor und der erste Teilabschnitt von *SecA* mit dem zweiten Genabschnitt zu pMS463 vereint werden (Abb. 33).

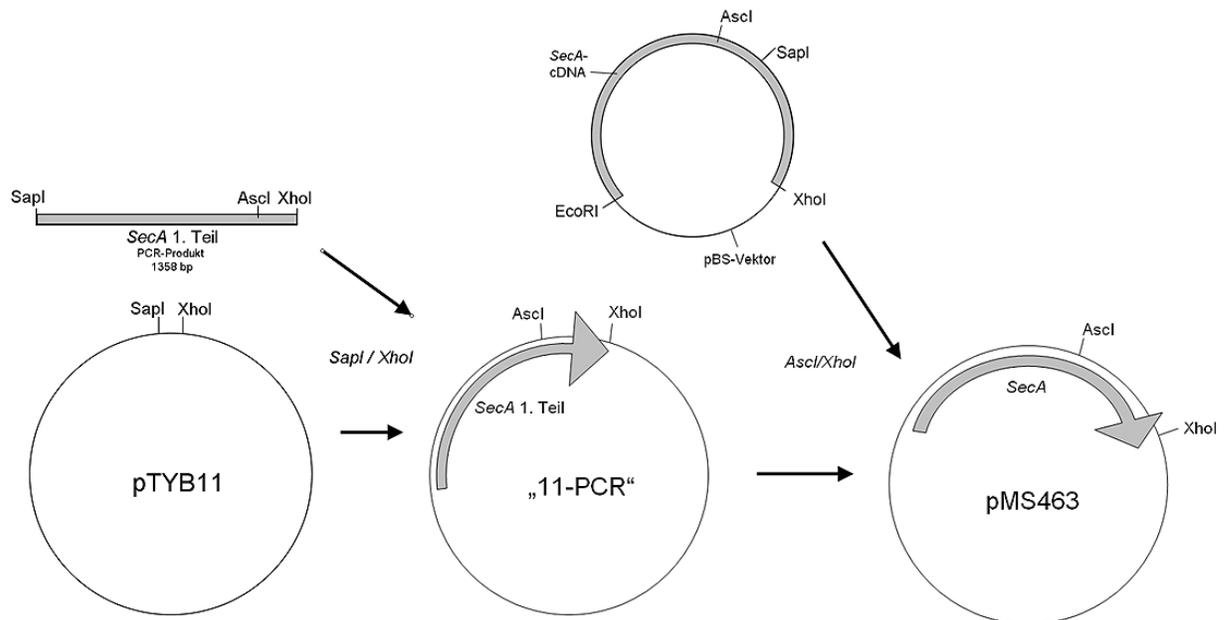


Abb. 33: Schema zur Klonierung der *SecA*-cDNA in den Expressionsvektor pTYB11. Das PCR-Produkt und der Vektor wurden mit den Restriktionsenzymen *SapI* und *XhoI* verdaut und anschließend ligiert („11-PCR“). In einem zweiten Schritt wurde die *SecA*-cDNA direkt verdaut und mit dem ebenfalls mit *AscI* und *XhoI* verdauten „11-PCR“ ligiert (pMS463).

Durch die Klonierung in den Vektor pTYB11 wird ein SecA-Fusionsprotein kodiert, an dessen N-Terminus sich eine Sequenz für einen bifunktionellen Tag aus Intein und einer Chitin-Bindedomäne (CBD) befindet. Über diese kann mithilfe einer Chitinsäule (New England Biolabs) das entstehende Fusionsprotein aufgereinigt werden. Das Intein bindet mit der CBD an das Chitin und kann anschließend mit einem DTT-haltigen Puffer nach Waschschritten von der Säule eluiert werden.

Nach Aufreinigung des heterolog in *E.coli* produzierten *Chlamydomonas*-SecA-Proteins ist die Gewinnung eines spezifischen Antikörpers möglich. Aber auch Glutaraldehyd-Crosslinking und Co-Immunopräzipitation von gereinigten SecA- und CDJ2-Proteinen können *in vitro* durchgeführt werden, um eine Interaktion beider Proteine nachzuweisen. Diese Untersuchungen ließen sich aber innerhalb des Zeitrahmens dieser Arbeit nicht mehr durchführen.

4.3.9. Klonierung der N-terminalen Deletionen von CDJ2 in pCB785

In einem bei Benson et al. (2003) beschriebenen Verfahren wurde in *E.coli* ein SecA hemmendes Peptid verwendet. Eine kurze Aminosäuresequenz führt dabei durch Bindung an SecA zu einem Wachstumsstopp. Wir vermuteten, dass ein Sequenzabschnitt in CDJ2 an die gleiche Bindestelle von SecA binden könnte, um so den beobachteten Wachstumsstopp auszulösen.

Um genauer zu definieren, welcher Sequenzabschnitt des CDJ2 aus *Chlamydomonas* tatsächlich mit dem SecA-Protein interagiert, wurden verschiedene N-terminal verkürzte Versionen von CDJ2 in *E.coli* exprimiert. Die Deletion vom N-Terminus wurde gewählt, da mit CDA Δ 2 bereits ein um die N-terminale J-Domäne verkürztes Protein zur heterologen Expression vorlag. Da dieses die gleiche, wenn nicht sogar stärkere Wachstumsinhibition verursachte als CDJ2, konnte die J-Domäne als Interaktionsstelle mit SecA ausgeschlossen werden und wurde im Folgenden als Positivkontrolle ebenfalls in den Vektor pCB785 inkloniert. Dieser Vektor enthält das *HSP70B*-Gen, das von Hexahistidin-Tag kodierenden Sequenzen flankiert wird. Durch den Verdau wird das *HSP70B*-Gen aus dem Vektor entfernt. Die His-Tags flankieren das entstehende Protein und ermöglichen somit die Aufreinigung mithilfe der Ni-NTA-Matrix.

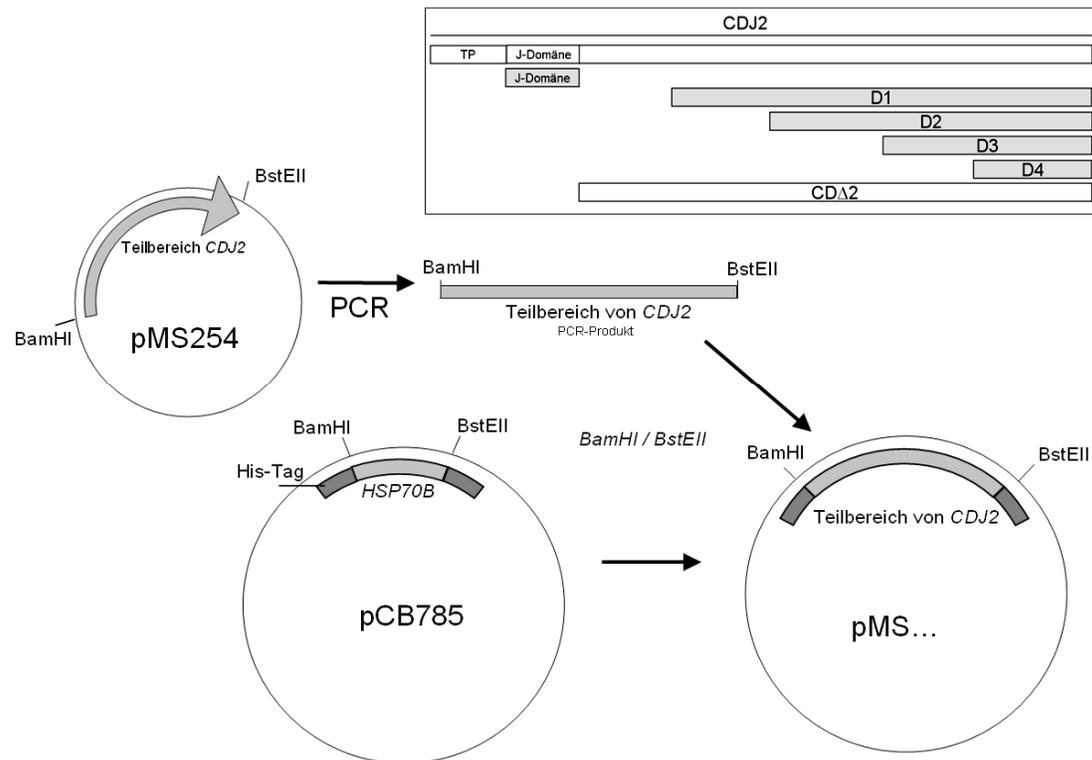


Abb. 34: Schematische Darstellung der Klonierung der N-terminalen Deletionen von *CDJ2*. Auf der *CDJ2*-cDNA wurden verschiedene PCR-Reaktionen durchgeführt, um verschiedene Teilbereiche des *CDJ2*-Gens zu amplifizieren. Es handelte sich hierbei um N-terminale Deletionen von *CDJ2* (D1 bis D4) sowie die J-Domäne. Die unterschiedlichen Genabschnitte sind schematisch im eingeklinkten Kasten grau unterlegt dargestellt. Die amplifizierten Teilbereiche von *CDJ2* wurden ebenso wie das Plasmid pCB785 mit BamHI und BstEII verdaut und ligiert (pMS Nr.465 bis 469). Das vollständige *CDJ2* sowie *CDΔ2* (weiß) lagen bereits in pCB785 inkloniert vor.

Es wurden 4 Konstrukte hergestellt, die für N-terminale Deletionen des CDJ2-Proteins kodieren. Diese wurden durch die Auswahl entsprechender Primer mittels PCR auf dem Plasmid pMS254, das die *CDJ2*-Sequenz enthält, amplifiziert. Die Sequenzen der Teilabschnitte sowie der gesamten *CDJ2*-cDNA aus *Chlamydomonas* sind im Anhang verzeichnet. Zudem sind die Anfänge in der Aminosäuresequenz in Abb. 2 durch Pfeile unter dem Alignment dargestellt.

Die Plasmide pMS465 bis pMS469 wurden sowohl in kompetente Zellen des *E.coli* Stamms M15 wie auch in den Stamm DH5α durch Hitzeschock eintransformiert. Lediglich die D1-Deletion konnte nicht kloniert werden. Die in den *E.coli*-Stamm M15

transformierten Plasmide wurden im Anschluss für die Erstellung einer Wachstumskurve verwendet.

4.3.10. Klonierung von *CDJ2* aus *Arabidopsis thaliana* in pCB785

Um die Frage zu beantworten, ob die Interaktion von CDJ2 mit SecA nur bei *Chlamydomonas* oder auch bei höheren Pflanzen besteht, wurde analog zu der Klonierung der für N-terminale CDJ2-Deletionen kodierenden Konstrukte in den Vektor pCB785 die für das *Arabidopsis* CDJ2-Protein kodierende cDNA kloniert.

Da einige Domänen von CDJ2 nur im *Chlamydomonas*-Homolog zu finden sind (Abb. 20), ist die Auswirkung des *Arabidopsis*-CDJ2 (*AtCDJ2*) in *E.coli* von höchstem Interesse. Bei einem gleichartigen Wachstumsstopp ist von einer generellen Interaktion von CDJ2-Proteinen mit SecA auch in höheren Pflanzen auszugehen.

Da keine cDNA, die für *CDJ2* kodiert aus *Arabidopsis* vorlag, wurde mithilfe einer RT-PCR zunächst aus mRNA eines *Arabidopsis* Wildtyps durch reverse Transkription eine solche hergestellt. Auf dieser wurde in einem unmittelbar darauf folgenden Schritt eine PCR durchgeführt und die *AtCDJ2*-cDNA amplifiziert. Nach einem Verdau des PCR-Produkts sowie des oben beschriebenen Vektors pCB785 mit BamHI und BstEII, konnte eine Ligation des Vektors mit dem PCR-Produkt durchgeführt werden.

Das entstandene Plasmid wurde mit pMS464 bezeichnet.

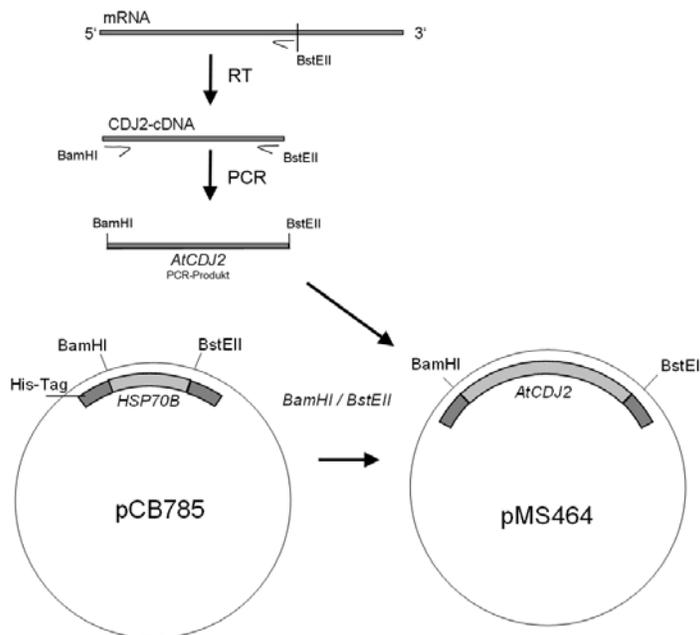


Abb. 35: Schematische Darstellung der Klonierung von *CDJ2* aus *Arabidopsis thaliana*. Die mRNA von *Arabidopsis* wurde zunächst revers transkribiert gemacht. Auf der dabei entstehenden *CDJ2*-cDNA wurde anschließend eine PCR-Reaktion durchgeführt. Das PCR-Produkt wurde ebenso wie das Plasmid pCB785 mit BamHI und BstEII verdaut und beide ligiert (pMS464). pCB785 enthält die *HSP70B*-cDNA, die von für Hexahistidin-Tags kodierenden Sequenzen flankiert wird. Durch den Verdau wird die *HSP70B*-cDNA aus dem Vektor entfernt.

pMS464 konnte aus Zeitgründen nicht mehr sequenziert werden. Die Plasmide in den M15 Zellen wurden jedoch in der Messung der Wachstumskurve während der Überexpression verwendet, da zwei positive Testverdauansätze die erfolgreiche Klonierung wahrscheinlich erscheinen ließen.

4.3.11. Wachstumskurve von *E.coli*-Stämmen, die CDJ2 aus *Arabidopsis* und deletierte Versionen von CDJ2 aus *Chlamydomonas* exprimieren

Zum Abschluss dieser Arbeit wurden die CDJ2-Varianten aus *Arabidopsis* und *Chlamydomonas* nach IPTG-Induktion überexprimiert und währenddessen durch halbstündige Messung der optischen Dichte Wachstumskurven aufgenommen (Abb. 36).

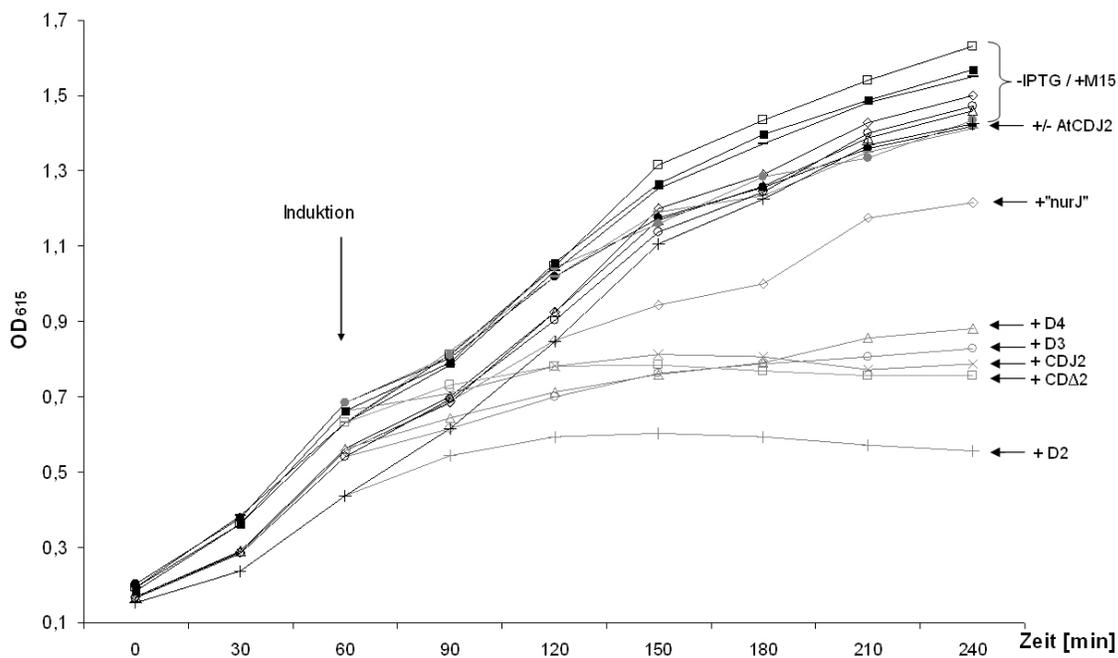


Abb. 36: *E.coli* Wachstumskurve während der Überexpression von CDJ2 und der N-terminalen Deletionen von CDJ2 sowie der J-Domäne alleine („nurJ“). Die Messungen der Kontrollkulturen ohne IPTG-Induktion sind schwarz dargestellt (-IPTG). Die Kulturen, die zum Induktionszeitpunkt mit 1 mM IPTG induziert und danach gemessen wurden, sind durch graue Färbung zu erkennen (+). AtCDJ2 nicht-induziert und induziert (+/- AtCDJ2) ist gemeinsam bezeichnet, da beide Kulturen nahezu identische Werte aufweisen.

4.3.11.1. Wachstumskurve von *E.coli*-Stämmen, die deletierte Versionen von CDJ2 aus *Chlamydomonas* exprimieren

Bereits nach 30 Minuten lassen sich deutliche Unterschiede der mit IPTG induzierten *E.coli*-Kulturen und der nicht-induzierten Kontrollkulturen erkennen. Die

Wachstumskurven der Deletionen D2, D3 und D4 liegen dicht beieinander und gleichen denen der ebenfalls gemessenen Kulturen mit überexprimiertem CDJ2 und CDA2 sehr. Der stärkere inhibitorische Effekt bei D2 relativiert sich, wenn man in die Betrachtung die geringere optische Dichte zum Induktionszeitpunkt mit einbezieht. Ohne IPTG-Zugabe verläuft das Wachstum der Kulturen vergleichbar dem der Kontrollkultur M15 ohne Plasmid. Bei M15 ist das Wachstum erwartungsgemäß unabhängig von der IPTG-Zugabe.

Dieses Ergebnis bedeutet, dass auch die kürzeste Version des CDJ2 – D4 – einen rapiden Wachstumsstopp auslösen kann. Eine Interaktion von SecA mit CDJ2 muss daher im Sequenzbereich von D4 zu finden sein.

D1 ist in der Kurve nicht aufgetragen, da bei der Herstellung im letzten Klonierungsschritt ein Fehler aufgetreten war. Bei der Messung der Wachstumskurve konnte daher wie erwartet kein Unterschied zwischen induzierter und nicht-induzierter Kultur gemessen werden (Daten nicht dargestellt). Da aber die kürzeren Versionen wie z.B. D2 und D4 einen Effekt hervorrufen, ist davon auszugehen, dass die korrekte Version von D1 diesen auch bewirken wird. Eine nachträgliche Überprüfung ist somit hinfällig.

4.3.11.2. Wachstumskurve von *E.coli*-Stämmen, die nur die J-Domäne von CDJ2 aus *Chlamydomonas* exprimieren

Die Überexpression der J-Domäne alleine führt zu gewissen Wachstumseinbußen im Vergleich zur Kontrollkultur. Der messbare Effekt ist keinesfalls so stark wie bei CDJ2 und seinen deletierten Versionen, scheint aber doch signifikant zu sein. Die Hemmung des Wachstums ist in der Stärke vergleichbar mit der Auswirkung der CGE1-Überexpression in *E.coli*. Um eine einmalige Unregelmäßigkeit auszuschließen, müsste diese Messung wiederholt werden. Es gibt aber Hinweise darauf, dass die Expression der J-Domäne in *E.coli* negative Effekte auf das Zellwachstum hat (Deloche et al., 1997).

4.3.11.3. Wachstumskurve von *E.coli*-Stämmen, die CDJ2 aus *Arabidopsis* exprimieren

Wenn CDJ2 aus *Arabidopsis* in *E.coli* überexprimiert wird, zeigt sich kein Unterschied zwischen induzierter Kultur und Kontrolle. Beide Messungen verlaufen völlig parallel. Da die Richtigkeit der Klonierung von *Arabidopsis*-CDJ2 noch nicht durch eine

Testsequenzierung bestätigt wurde, kann eine fehlerhafte Klonierung nicht völlig ausgeschlossen werden, erscheint aber unwahrscheinlich. Damit ergibt sich, dass scheinbar kein inhibitorischer Effekt auf SecA durch CDJ2 aus *Arabidopsis* ausgeübt wird. Eine Interaktion der beiden Proteine in höheren Pflanzen erscheint somit zurzeit eher unwahrscheinlich.

5. Diskussion

5.1. VAP und 70-kDa-Protein sind keine Interaktionspartner von VIPP1 und HSP70B

Das etwa 70 kDa große Protein, das als potentieller Interaktionspartner von HSP70B in Frage kam, hat sich nicht als dessen Substrat erwiesen. Es handelt sich jedoch um ein lichtinduzierbares, lösliches Protein, das im Stroma und in der LDM-Fraktion, die aus Chloroplasten-Hüllmembranen und Vesikeln besteht (Zerges and Rochaix, 1998), detektiert werden konnte (Abb. 8, 9, 10 + 12).

Das mit dem Arbeitsnamen VAP versehene Protein zeigte keine Interaktion mit VIPP1 (Abb. 13) und wird daher anders bezeichnet werden müssen. Es ist jedoch nachweislich durch Licht induzierbar (Abb. 8) und liegt in der Zelle wahrscheinlich in löslicher Form vor. Die als potentielles Substrat von HSP90C identifizierte Thioesterase konnte bis zum jetzigen Zeitpunkt als Interaktionspartner weder bestätigt noch ausgeschlossen werden.

Diese Resultate sind als Negativ-Ergebnisse zu werten. Eine weitere Untersuchung der Proteine fand daher nicht statt.

5.2. Keine charakteristischen Phänotypen durch Unterexpression von HSP90C

Die Unterexpression von HSP90C in *Chlamydomonas* durch RNAi, konnte erfolgreich durchgeführt werden. Ein Zehntel der untersuchten Transformanten zeigte ein deutlich reduziertes Proteinlevel (Abb. 15).

Die anschließenden Untersuchungen auf Protein- und RNA-Ebene zeigten jedoch keinen einheitlich veränderten Phänotyp. Bei einem im Wachstum auffälligen *HSP90C*-RNAi-Stamm (Stamm C16) muss von einer Insertions-Mutagenese als Ursache für den Phänotyp ausgegangen werden. In allen anderen Kulturen waren keine signifikanten Unterschiede festzustellen. Die Unterexpression von HSP90C hat demnach keinen Einfluss auf die Expression abundanter Proteine, auf Chlorophyll-Akkumulation sowie Lichtinduktion des *HSP70A*-Gens. HSP90C erfüllt demnach entweder Funktionen, die von anderen Chaperonpartnern übernommen werden können, möglicherweise durch

HSP70B, oder geringe Mengen von HSP90C sind ausreichend für die Aufrechterhaltung der Funktion. Möglich ist auch, dass ein charakteristischer Phänotyp nur in bestimmten Situationen zum Tragen kommt wie z.B. bei an „State-transitions“ beteiligten Kinasen (Depege et al., 2003). *HSP90C*-RNAi-Stämme wurden deshalb nicht weiter untersucht, sondern die Zeit für den im Folgenden beschriebenen Teil der Arbeit verwendet.

5.3. Mögliche Verbindung zwischen dem HSP70-Chaperon-system und dem Sec-Translokationssystem

5.3.1. Wachstumsstopp durch heterologe Expression von CDJ2 in *E.coli*

Wird plastidäres CDJ2 aus *Chlamydomonas* in *E.coli* zur Expression gebracht, kann zuverlässig ein dramatischer Wachstumsstopp und eine bis zu mehr als 30%ige Abnahme des Gesamtproteins im Verlauf von drei Stunden nach Beginn der Expression festgestellt werden (Abb 21 + 23).

Vergleichbare Beobachtungen wurden bei der heterologen Expression von Mdj1p, dem mitochondrialen DnaJ-Homolog aus *Saccharomyces cerevisiae* in *E.coli* gemacht. Es trat ein dem in dieser Arbeit erfassten, vergleichbarer Wachstumsstopp auf, wenn *E.coli* größere Mengen des J-Domänen-Proteins Mdj1p exprimierte. Eine toxische Wirkung für *E.coli* wurde beschrieben und eine Interaktion von Mdj1p mit einer noch unbekanntes Schlüsselkomponente in *E.coli* vorausgesagt. Diese Interaktion findet mithilfe einer Cystein-reichen Region statt und wird nicht durch die J-Domäne vermittelt (Deloche et al., 1997).

Sequenzähnlichkeiten zwischen den Proteinen CDJ2 und Mdj1p scheinen sich allerdings auf die konservierte J-Domäne zu beschränken, die nachweislich nicht den hemmenden Faktor darstellt (Abb. 21). Dies zeigt der genauso deutliche Wachstumsstopp induziert durch Überexpression des um die J-Domäne verkürzten CDJ2 (CDA2).

5.3.2. Bakterielles SecA interagiert mit plastidärem CDJ2

5.3.2.1. Mit CDJ2 angereichertes Protein als SecA identifiziert

Auf der Suche nach der Ursache nach den dramatischen Auswirkungen der Expression von CDJ2 in *E.coli*, konnte durch einen CDJ2-„Pull-down-Assay“ mit diesem zusammen

ein Protein deutlich angereichert werden, das mit Massenspektrometrie als SecA identifiziert werden konnte (Abb. 25 + 26).

SecA ist ein essentieller Bestandteil des Sec-Translokationssystems, das in Bakterien den Transport aus der Zelle über die innere Membran gewährleistet. In Plastiden besitzt das homologe Sec-System eine wichtige Funktion beim Transport von Proteinen über die Thylakoidmembran (Keegstra and Cline, 1999).

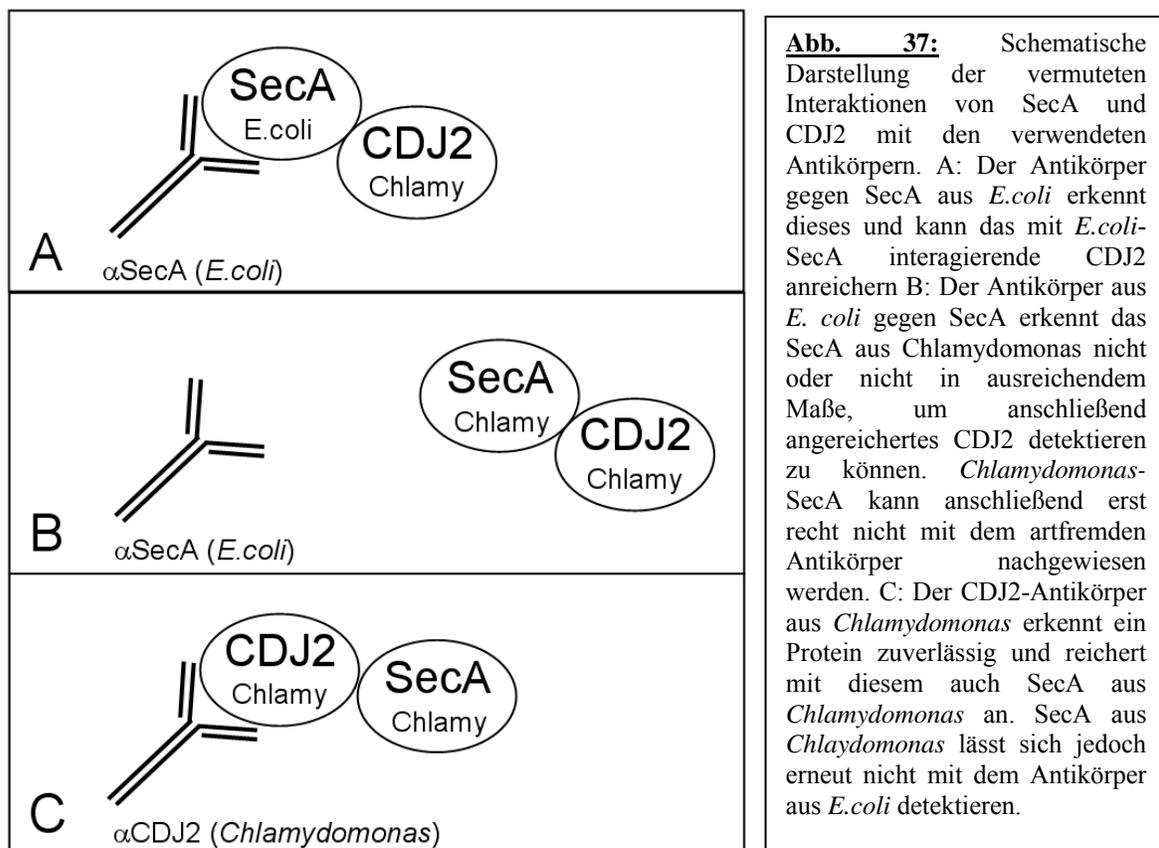
In *E.coli* handelt es sich bei SecA um ein 102 kDa großes Protein, das in seiner aktiven Form als Homodimer vorliegt (Akita et al., 1991). Die Rolle der ATPase besteht darin, zu transportierende Proteine an das heterotrimere Translokon aus SecYEG heranzuführen und in einem ATP-verbrauchenden Prozess die Translokation zu starten. Die Proteine werden beim Sec-System im Gegensatz zum Tat-Translokationssystem ungefaltet über die Membran transportiert (Collinson, 2005).

Mit Hilfe eines polyklonalen Antikörpers gegen das bakterielle SecA (in Kollaboration mit Prof. M. Müller, Universität Freiburg) ließ sich die Interaktion von plastidärem CDJ2 mit *E.coli*-SecA in *E.coli* definitiv bestätigen (Abb. 27).

Interessant ist, dass die Anreicherung durch CDA2, dem die J-Domäne fehlt, stärker erscheint als durch CDJ2. Dies lässt sich sowohl mit Coomassie-Färbung als auch im immunologischen Nachweis zeigen (Abb. 22 + 27). Es lässt sich vermuten, dass dies mit der Fähigkeit der J-Domäne zur Interaktion mit dem HSP70-Chaperon (in *E.coli* mit dem HSP70-Homolog DnaK) zu tun hat. Die J-Domäne bindet an HSP70 und führt dieses an über C-terminale Regionen gebundene Substratproteine heran. Das Substrat wird vom J-Domänen-Protein an HSP70 übergeben. Anschließend wird die Konformation des vom J-Domänen-Protein übergebenen Substrats unter ATP-Verbrauch verändert und dieses entlassen. Fehlt die J-Domäne kann das gebundene Substrat nicht oder nur mit geringerer Effizienz an das HSP70-Chaperon übergeben werden (Laufen et al., 1999; Han and Christen, 2003). Beim Fehlen der J-Domäne in CDA2 könnte es daher zur Akkumulation des Substrates am J-Domäne-Protein kommen.

5.3.2.2. Antikörper gegen *E.coli*-SecA erkennt Homolog aus *Chlamydomonas* offenbar nicht

Der verwendete Antikörper gegen SecA aus *E.coli*, der zur Detektion der Anreicherung des bakteriellen Proteins ausgezeichnet funktionierte, konnte das homologe SecA aus *Chlamydomonas* nicht ausreichend erkennen. Trotz einer hohen Sequenzübereinstimmung ist die Bindung an das plastidäre SecA nicht stark genug, um eine Co-Immunopräzipitation durchführen zu können, die den Nachweis einer Interaktion von SecA und CDJ2 in den Chloroplasten darstellen könnte. Die nachfolgende schematische Darstellung soll dies verdeutlichen (Abb. 37).



Der in A dargestellte Fall tritt bei einer IP in *E.coli* auf. Dieses Experiment wurde zwar durchgeführt, dabei aber 2 % Triton im Lysepuffer verwendet (ohne Abbildung). Wie Abb. 31 zeigt, ist jedoch bei mehr als 0,5 % keine Interaktion mehr nachweisbar. Das Experiment müsste daher ohne Triton wiederholt werden. Eventuell käme auch ein

anderes Detergenz wie Digitonin in Betracht. Die in B und C beschriebenen Fälle treten offenbar bei der IP in *Chlamydomonas* auf (Abb. 28). Mit den oben dargestellten Annahmen lässt sich zeigen, dass ein erfolgreicher Interaktionsnachweis mit dem verwendeten Antikörper nicht möglich ist.

Alternativ besteht die Möglichkeit, dass SecA in *Chlamydomonas* so instabil ist, dass es bei der Zellyse in 70 und 32 kDa große Teile zerfällt (Abb. 27).

Um eine Co-Immunopräzipitation der beiden Proteine in *Chlamydomonas* erfolgreich durchführen zu können, muss ein für das *Chlamydomonas*-Protein SecA aus Chloroplasten spezifischer Antikörper hergestellt werden. Daher erfolgte die Klonierung von SecA aus *Chlamydomonas* in *E.coli*. Durch Überexpression soll im Anschluss an diese Arbeit SecA für die Herstellung polyklonaler Antikörper gewonnen werden, sowie die Interaktion mit CDJ2 und den deletierten Versionen *in vitro* erfolgen.

5.3.3. Störung der Interaktion von CDJ2 und SecA durch Detergenzien

Durch Ni-NTA Pulldown-Assays mit verschiedenen Triton-Konzentrationen konnte eindeutig eine Störung der Interaktion zwischen SecA und CDA2 mit steigender Konzentration des Detergenz nachgewiesen werden (Abb. 31).

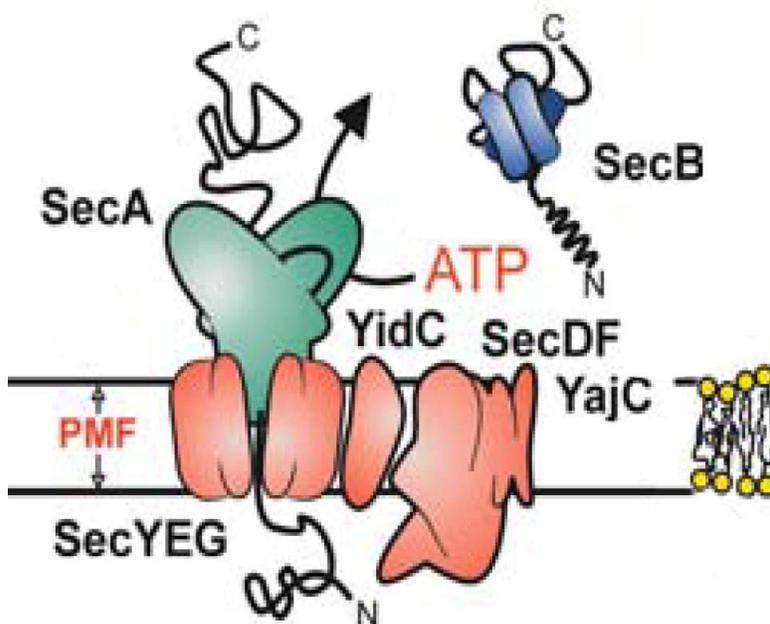


Abb. 38: Darstellung der Komponenten des bakteriellen Sec-Translokationssystems. Lösliches SecA liegt als Dimer vor. Sec YEG ist in die Membran eingebettet. SecB liefert das zu transportierende Protein vom Ribosom an SecA ab. In Chloroplasten kommt kein SecB vor. YidC ist eine Komponente des Sec-Translokationssystems, die mit SecYEG zusammen arbeiten kann, aber auch alleine befähigt ist Proteine über die Membran zu transportieren (Samuelson et al., 2001; Scotti et al., 2000). Auch YajC ist an der Proteintranslokation beteiligt, aber die genaue Funktion ist noch unklar.

Bildquelle: de Keyzer et al. (2003)

Eine mögliche Erklärung dieses zunächst überraschenden Ergebnisses ergibt sich aus den anderen Bestandteilen des Sec-Translokationssystems. Im bakteriellen Organismus interagiert das lösliche Protein SecA unter anderem mit den membrangebundenen Einheiten SecY, SecE und SecG (Abb. 38). Einige weitere Membranproteine wie z.B. SecD, SecF und YidC sind zudem an der Translokation der translatierten Proteine über die innere Membran beteiligt.

Die erhöhte Triton-Konzentration führt zu einem Auslösen der genannten Proteine aus der Membran, die damit als Interaktionspartner im Lysat zur Verfügung stehen. Bei einem kompetitiven Ringen um SecA als Substrat könnten sich hierbei die Membranproteine als stärker bindend erweisen und damit die Interaktion mit CDJ2 verhindern. Diese Proteine müssten sich in diesem Fall durch eine Immunopräzipitation mit Antikörper gegen SecA in *E.coli* unter Verwendung erhöhter Triton-Konzentrationen anreichern lassen. Ein immunologischer Nachweis von z.B. SecY mit dem entsprechenden Antikörper wäre möglich.

Nachgewiesen ist für das in einem Gleichgewicht zwischen Dimer und Monomer vorliegende SecA auch, dass unter anderem einige nichtionische Detergenzien wie Dodecylmaltosid (DDM) dieses Verhältnis stark zugunsten der Monomere verschieben. Gerade die Monomere scheinen aber an den Komplex SecYEG gebunden zu sein (Or et al., 2002). Das Detergenz Triton X-100 könnte daher wie DDM zur Dissoziation des Dimers führen und damit die Bindung der entstehenden Monomere an Membranproteine fördern. Die scheinbar schwächere Bindung an CDJ2 reicht dann für eine Anreicherung von SecA mit dem J-Domänen-Protein nicht mehr aus.

Über die Verwendung von verschiedenen Konzentrationen des Detergenz Digitonin als Ersatz für Triton X-100 könnte eine genauere Aussage erreicht werden. Digitonin bewirkt im Gegensatz zu DDM keine Monomerbildung bei SecA (Or et al., 2002). Sollte daher mit Digitonin keine Störung der Interaktion von SecA und CDJ2 nachzuweisen sein, ist davon auszugehen, dass CDJ2 nur an die aktive Form, nämlich das funktionale Dimer binden kann.

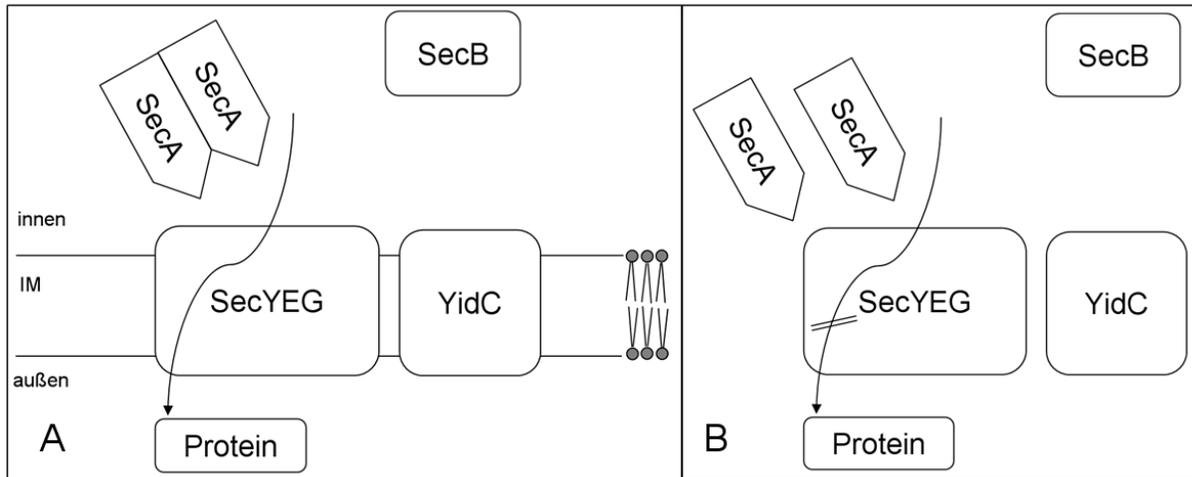


Abb. 39: Schematische Darstellung der Funktion von SecA im bakteriellen Organismus. A: Im natürlich vorkommenden Fall wird ein SecA-Dimer benötigt, das an in der Membran gebundenes SecYEG bindet und Protein über die Membran transportiert. B: Durch Detergenzien wie DDM entstehen SecA Monomere, die zwar noch in gleicher Stärke an SecYEG binden, jedoch keine Proteine transportieren können (Jilaveanu et al., 2005).

5.3.4. Interaktionsstelle liegt in 43 AS langem Sequenzabschnitt

5.3.4.1. Wachstumshemmung in *E.coli* durch Inaktivierung von SecA

Bei SecA handelt es sich um ein für Bakterien essentielles Protein. Auf der Suche nach einem Nachweis für lebensnotwendige Proteine in Bakterien, bei dem SecA als Beispiel verwendet wurde, stieß man auf eine spezifische Inhibition von SecA durch bestimmte Peptide (Benson et al., 2003). Das Peptid bindet dabei an das Zielprotein und hemmt seine Funktion. Dies führt zu starken Wachstumshemmungen. Für SecA reduziert sich das relative Wachstum auf etwa 20 % bei Verwendung der folgenden Peptidsequenz:

- SSFSFDGHVWYPVLPAQSR

Da dieses inhibitorisch wirkende Peptid experimentell aus verschiedenen wirksamen herausgesucht wurde, besteht durchaus die Möglichkeit, dass andere hemmende Sequenzen sich von dieser noch deutlich unterscheiden können. Die Bindung des durch Phagen Display selektierten Peptids scheint jedoch insgesamt spezifisch, da sich mit einer zufällig generierten Peptidsequenz kein Wachstumsstopp erreichen ließ. Auch mit einer gezielten Überexpression von SecA kann die Hemmung des Wachstums wieder

aufgehoben werden. Dies beschreibt trotz Verwendung einer anderen Methode den Phänotyp eines „Protein-Knockout“.

Aufgrund dieser Ergebnisse bestand die Möglichkeit, dass ein Sequenzabschnitt des CDJ2-Proteins dieser Peptidsequenz ähnelt und zu einer spezifischen Inhibition von SecA führt. Damit könnte der abrupte Wachstumsstopp bei Überexpression von CDJ2 in *E.coli* erklärt werden.

5.3.4.2. 43 Aminosäuren lange Sequenz verursacht Wachstumsstopp

Durch Überexpression der N-terminal verkürzten Varianten von CDJ2 konnte die mögliche Interaktionsstelle mit SecA auf eine 43 AS lange Sequenz eingegrenzt werden. Da auch die kürzeste Version CDJ2-D4 ein deutlich reduziertes Wachstum nach dem Start der Überexpression zeigt, ist davon auszugehen, dass auch dieses deletierte Protein noch mit SecA interagiert und die Inhibition auslösen kann (Abb. 36). Ein Blick auf die betreffende Sequenz zeigt einen Prolin-reichen Abschnitt und eine durch das COILS-Programm prognostizierte Coiled-coil-Domäne (Abb. 2). Beim Wachstumsstopp durch Überexpression von mitochondrialem Mdj1p in *E.coli* war dagegen ein Cystein-reicher Sequenzabschnitt als mögliche Interaktionsstelle mit dem unbekanntem Protein ausgemacht worden (Deloche et al., 1997). Die entsprechende Sequenz von CDJ2-D4 besitzt jedoch keine Ähnlichkeit mit der von Benson et al. (2003) verwendeten und lässt daher eine alternative Bindung an SecA vermuten.

5.3.5. Keine Interaktion zwischen AtCDJ2 und bakteriellem SecA nachweisbar

Die Überexpression von plastidärem CDJ2 aus *Arabidopsis* führt nicht zu einer Hemmung des Wachstums. Die Kultur wächst völlig vergleichbar zu nicht-induzierten Kontrolle. Dies lässt weitere Schlussfolgerungen zu.

Zunächst scheint damit angedeutet, dass keine Interaktion zwischen AtCDJ2 und bakteriellem SecA besteht. Dies würde die Interaktion von SecA und CDJ2 zunächst auf *Chlamydomonas* beschränken. Möglicherweise ist jedoch die Klonierung von AtCDJ2 nicht korrekt und es liegt ein Frameshift vor, da zwei Testverdauansätze Banden der korrekten Größen zeigten. Aufgrund anderer „Codon-usage“ der AT-reichen AtCDJ2-Sequenz könnte das Expressionsniveau wegen seltener Kodone noch geringer sein, als

von *Chlamydomonas*-CDJ2. Trotz schwacher Expression von CDJ2 auch ohne Induktion, zeigt die *E.coli*-Kultur keinen Wachstumsstopp (Abb. 21 + 22). Ein gewisser Schwellenwert bei der Proteinexpression muss demnach wohl überschritten werden, damit eine Wachstumshemmung ausgelöst werden kann.

Alternativ dazu kann aufgrund der teilweisen Sequenzübereinstimmung von CDJ2-D4 aus *Chlamydomonas* und AtCDJ2, die für die Interaktion mit SecA benötigte Aminosäurefolge möglicherweise weiter eingegrenzt werden.

```
D4-Cr          QRRRQQAPPPPPRPPPPPPKKSREEEIDAELLALKKKLNKL
AtCDJ2        -----IDEIEATLAQLKKDLGLQ
                :*: * *   **.*.
```

In einem Alignment der durch Sequenzierung gesicherten Sequenz von D4 mit den letzten Aminosäuren von AtCDJ2 wird deutlich, dass im Bereich der letzten 18 Reste eine Ähnlichkeit vorliegt. Dabei handelt es sich wahrscheinlich um eine Coiled-coil-Region.

Aufgrund der fehlenden Hemmung des Wachstums durch AtCDJ2 sollte diese Region als Interaktionsstelle ausgeschlossen werden können. Es bleibt dann der spezifische Rest der Sequenz von *Chlamydomonas*. Dabei handelt es sich um die bereits zuvor erwähnte Prolin-reiche Region.

Um zu überprüfen, ob es sich bei diesem Peptid um das mit SecA interagierende und hemmende Element handelt, bestünde die Möglichkeit dieses Peptid synthetisch herzustellen und den inhibitorischen Effekt auf SecA festzustellen. Auch eine weitere Aufspaltung der CDJ2-D4-Sequenz in den gemeinsamen Anteil der Coiled-coil-Region und den in *Chlamydomonas* allein vorkommende Abschnitt bieten sich für eine erneute Klonierung an.

5.3.6. Zusammenhang zwischen dem HSP70-Chaperonsystem und dem Proteintransport über die Thylakoidmembran

5.3.6.1. Nachgewiesene Interaktionen zwischen beteiligten Komponenten

Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit und anderen bereits vorliegenden Erkenntnissen zeichnet sich die Möglichkeit einer Verbindung zwischen dem HSP70-Chaperonsystem,

zu dem CDJ2 als Cochaperon gehört, und dem Sec-Translokationssystem im Chloroplasten, an dem SecA beteiligt ist, ab.

SecA ist in Chloroplasten ebenso wie bei Bakterien ein unverzichtbarer Bestandteil der Protein-Translokation durch das Sec-System. Es interagiert dabei mit dem gebundenen Translokon in der Thylakoidmembran, das in Chloroplasten zumindest aus SecY (cpSecY) besteht.

Homolog zum bakteriellen YidC, das in *E.coli* ein Bestandteil des Sec-Systems darstellt, ist in Chloroplasten das Protein Alb3 zu finden. YidC, Alb3 und das Homolog aus Mitochondrien, Oxa1, bilden eine Proteinfamilie (Luirink et al., 2001; Scotti et al., 2000). In *Arabidopsis* konnte bereits eine Interaktion von cpSecY mit Alb3 nachgewiesen werden (Klostermann et al., 2002).

In *Chlamydomonas* sind zwei Homologe von Alb3 identifiziert worden, die mit Alb3.1 und Alb3.2 bezeichnet werden. Alb3.2 weist dabei die größere Ähnlichkeit zu Alb3 aus *Arabidopsis* auf. Es ist notwendig für den Aufbau beider Photosysteme und darf nur in gewissem Grad reduziert sein, da die Zelle sonst nicht überlebensfähig ist. Wenn Alb3.2 unterexprimiert wird, führt dies zu einer Abnahme der funktionsfähigen Photosysteme. Es kommt möglicherweise zu Fehlfaltungen der Thylakoid-Komplexe, die zu verhindern die Funktion von Alb3.2 zu sein scheint (Göhre et al., 2006). Alb3, Oxa1 und YidC sind normalerweise wohl an der Faltung von neu synthetisierten Proteinen in die Membran beteiligt (Kuhn et al., 2003).

Interessant an der Unterexpression von Alb3.2 in *Chlamydomonas* ist aber vor allem, dass sie eine Induktion der Proteine VIPP1, HSP70B und CDJ2 auslöst. Mit VIPP1 konnte sogar eine Interaktion durch Immunopräzipitation nachgewiesen werden. HSP70B und CDJ2 waren dabei allerdings nicht zu detektieren (Göhre et al., 2006). Betrachtet man die Verbindung zwischen Alb3.2 und VIPP1 und die Tatsache, dass VIPP1 als Substrat für HSP70B durch CDJ2 an dieses heran geführt wird (Liu et al., 2005; 2007), ergibt sich ein möglicher Zusammenhang, der in der folgenden Graphik zusammengefasst ist (Abb. 40).

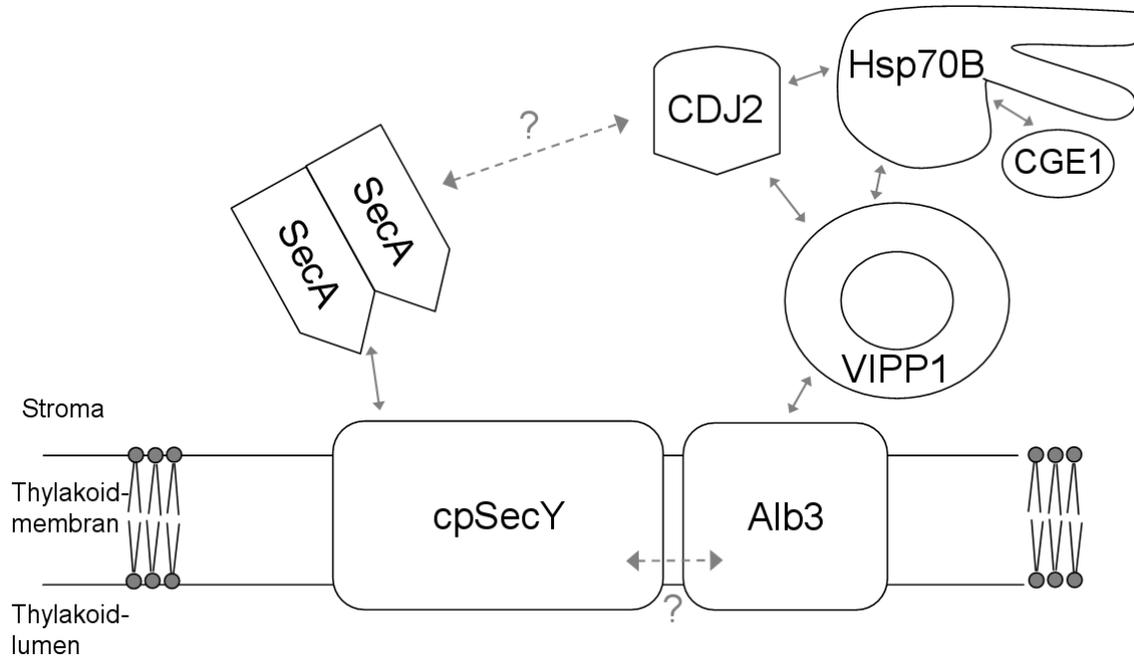


Abb. 40: Schematische Darstellung des theoretischen Zusammenhangs zwischen Bestandteilen des Sec-Translokationssystems und der HSP70-Chaperonmaschinerie. Stromales SecA interagiert mit cpSecY. In Arabidopsis sind cpSecY und Alb3 assoziiert. Alb3.2 tritt in Verbindung mit VIPP1 in Chlamydomonas. VIPP1 ist ein Substrat für HSP70B, das durch CDJ2 zur Interaktion gebracht wird. CGE1 ist Bestandteil des Chaperonkomplexes um HSP70B.

Wird nun von einer nachweisbaren Verbindung zwischen CDJ2 und SecA ausgegangen, könnte dies die einzelnen Teilergebnisse in einem Gesamtbild zusammenfügen.

5.3.6.2. Hinweise auf einen funktioneller Zusammenhang

Wie im vorhergehenden Abschnitt dargestellt, lässt sich über VIPP1 eine mögliche physische Verbindung zwischen dem HSP70-Chaperonsystem und der Proteintranslokation herstellen. Andere Untersuchungsergebnisse deuten, wie im Folgenden erklärt, einen funktionellen Zusammenhang an. Eine Schlüsselrolle in den Chloroplasten besitzt dabei möglicherweise das Substrat von HSP0B, VIPP1.

PspA, das VIPP1 Homolog aus *E.coli.*, kann durch Faktoren, die einen störenden Effekt auf die Exportmaschinerie haben, wie Überexpression mutierter Proteine der äußeren Membran (PhoE) oder Hitzeschock, induziert werden. Interessant ist eine nachgewiesene Induktion auch durch *secD*, *secF* und *secA* Mutanten. Auch die Abnahme von YidC erzeugt erhöhte Mengen an PspA (Van der Laan et al., 2003). Vermutlich handelt es sich

daher beim Induktionssignal um die Überlastung oder Blockierung des Proteintranslokationssystems. PspA kann daher als notwendig für die Sicherung des funktionsfähigen Sec-Exportweges erachtet werden (Kleerebezem and Tommassen, 1993).

Auch die Effizienz des Twin-arginine-Translokationssystem (Tat-pathway) ist auf das Protein PspA angewiesen. Mutationen in den Bestandteilen des Tat-Systems (Tat(A/E)BC) erzeugen wie die *sec* Mutanten eine Induktion des *psp*-Operons (DeLisa et al., 2004).

Die Funktion von PspA wird in der Aufrechterhaltung der Proton Motive Force (PMF) an der Membran vermutet (Kleerebezem et al., 1996). Da der Tat-Translokationsweg ausschließlich durch die PMF angetrieben wird, liegt darin möglicherweise die Ursache der Effizienzsteigerung. Die verbesserte Effizienz des Tat-Weges durch PspA wird auch durch VIPP1 aus *Synechocystis spec.* vermittelt. Ebenso kann PspA in der Erbse (*Pisum sativum*) die Effizienzsteigerung des Tat-Translokationsweges bewirken (DeLisa et al., 2004). Dies legt den Schluss nahe, dass es sich bei den homologen Proteinen auch um funktionell verwandte Komponenten handelt, die in Bakterien wie auch im Chloroplasten an der Proteintranslokation zumindest indirekt beteiligt sind.

Dies bestätigen auch Beobachtungen, dass Mutationen in Komponenten des Sec- oder Tat-Systems einen vergleichbaren Phänotyp aufweisen, wie er bei *vipp1* Mutanten zu finden ist. Es sind beschädigte Thylakoidmembranen auszumachen, die durch gestörten Proteinimport in das Lumen entstehen könnten (Liu et al., 2005). Eine Beteiligung am Vesikeltransport wie von Kroll et al. (2001) vermutet, scheint aufgrund der vorliegenden Indizien daher eher unwahrscheinlich.

Die Funktion von VIPP1 läge dann wahrscheinlich in der Aufrechterhaltung der Membranintegrität, eventuell auch durch Aufrechterhaltung der PMF. VIPP1 könnte mit HSP70B und den Cochaperonen CDJ2 und CGE1 eine Prüfung und Sortierung der für das Lumen bestimmten Proteine vornehmen. Der Transport korrekt gefalteter Proteine über den Tat-Translokationsweg könnte dabei ein Austreten von Protonen durch das Translokon verhindern und so die PMF stabilisieren. Die Induzierbarkeit von HSP70B und VIPP1 durch Hitzeschock und Licht könnte eine solche Vermutung erhärten, da durch Hitze und oxidativen Stress mit verhältnismäßig mehr beschädigten Proteinen für

den Import in das Lumen zu rechnen ist (Liu et al., 2005). Stäbchenförmige VIPP1-Oligomere könnten hier als Speicherform für funktionelles VIPP1 dienen.

Alternativ ermöglichen die VIPP1-Oligomere allerdings vielleicht einen gerichteten Transport von zu importierenden Proteinen über die Stäbchen. An der Thylakoidmembran fände dann möglicherweise die Übergabe der Proteine von VIPP1 an SecA nach Chaperon-vermittelter VIPP1-Oligomer-Disassemblierung statt.

5.4. Ausblick

5.4.1. Nachweis der Interaktion von CDJ2 und SecA in *Chlamydomonas*

Kann eine Interaktion zwischen dem J-Domänen-Protein CDJ2 und SecA im Chloroplasten von *Chlamydomonas* nachgewiesen werden, stellt dies eine direkte Verbindung zwischen dem HSP70-Chaperonsystem und dem Sec-Translokationssystem dar. Aufgrund der Ergebnisse dieser Arbeit wie auch der zuvor erläuterten bekannten Untersuchungsergebnisse erscheint eine Verbindung durchaus möglich.

Ein Nachweis der physischen Interaktion von CDJ2 und SecA könnte durch Glutaraldehyd-Crosslinking der beiden betreffenden Proteine *in vitro* durchgeführt werden. Dazu wird sowohl aufgereinigtes CDJ2 wie auch SecA aus *Chlamydomonas* benötigt. Letzteres kann durch heterologe Expression in *E.coli* und anschließende Aufreinigung erhalten werden. Ausreichende Mengen des gereinigten CDJ2 liegen bereits vor.

Nach der Erzeugung eines spezifischen polyklonalen Antikörpers gegen SecA kann dieser für immunologische Nachweise als auch für Immunopräzipitationen verwendet werden. Diese könnten den Zusammenhang zwischen SecA und CDJ2 sowohl *in vitro* wie auch *in vivo* nachweisen. Durch Co-Immunopräzipitationen sollte CDJ2 mit Antikörpern gegen SecA im Vergleich zum Gesamtzellextrakt angereichert werden und ebenso eine Anreicherung von SecA mit spezifischen CDJ2 Antikörpern erreicht werden können. Durch Zugabe spezifischer Peptide, die die für die Interaktion notwendige Region in CDJ2 abdecken, sollte die Interaktion inhibiert werden. Ebenfalls zu untersuchen ist, ob die Interaktion auch von andern Detergenzien wie Digitonin gestört wird.

5.4.2. Nachweis der Interaktion bei höheren Pflanzen

Ein wichtiger Ansatzpunkt ist außerdem die Überprüfung, ob eine Verbindung zwischen SecA und CDJ2 oder anderen Bestandteilen des HSP70-Chaperonsystems auch in höheren Pflanzen wie den Modellorganismen *Arabidopsis thaliana* oder *Pisum sativum* nachzuweisen ist. Durch die heterologe Expression von AtCDJ2 in *E.coli* ohne eine messbare Auswirkung (Abb. 36), erscheint dieser Zusammenhang möglicherweise schwieriger zu detektieren zu sein. Die Feststellung der genauen Bindestelle von CDJ2 an SecA könnte eine genauere Untersuchung des Interaktionsmechanismus ermöglichen. Ist in höheren Pflanzen keine vergleichbare Sequenz zu finden, existiert vielleicht ein anderer Weg, der Chaperonsystem und Translokationssystem verbindet. Möglich ist jedoch auch eine auf *Chlamydomonas* begrenzte Interaktion. Die durch *vipp1* Mutationen veränderten Thylakoidmembranen in *Arabidopsis* (Kroll et al., 2001) weisen aber darauf hin, dass auch in höheren Pflanzen ein solcher Zusammenhang besteht.

6. Literaturverzeichnis

1. **Akita, M., A. Shinkai, S. Matsuyama, and S. Mizushima.** 1991. SecA, an essential component of the secretory machinery of *Escherichia coli*, exists as homodimer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **174:211-216.**
2. **Asamizu, E., Y. Nakamura, S. Sato, H. Fukuzawa, and S. Tabata.** 1999. A large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii*. Generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags. *DNA Res.* **6:369-373.**
3. **Asamizu, E., K. Miura, K. Kucho, Y. Inoue, H. Fukuzawa, K. Ohyama, Y. Nakamura, and S. Tabata.** 2000. Generation of expressed sequence tags from low-CO₂ and high-CO₂ adapted cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *DNA Res.* **7:305-307.**
4. **Benson, R. E., E. B. Gottlin, D. J. Christensen, Hamilton, and P. T..** 2003. Intracellular expression of Peptide fusions for demonstration of protein essentiality in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47:2875-2881.**
5. **Bukau, B., and A. L. Horwich.** 1998. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* **92:351-366.**
6. **Cao, D., Y. Lin, and C.-L. Cheng.** 2000. Genetic interactions between the chlorate-resistant mutant cr88 and the photomorphogenic mutants cop1 and hy5. *Plant Cell* **12:199-210.**
7. **Cao, D., J. E. Froehlich, H. Zhang, and C.-L. Cheng.** 2003. The chlorate-resistant and photomorphogenesis-defective mutant cr88 encodes a chloroplast-targeted HSP90. *Plant J.* **33:107-118.**
8. **Collinson, I.** 2005. The structure of the bacterial protein translocation complex SecYEG. *Biochem. Soc. Trans.* **33:1225-1230.**
9. **de Keyzer, J., C. van der Does, and A. J. Driessen.** 2003. The bacterial translocase: a *dynamic protein* channel complex. *Cell. Mol. Life Sci.* **60:2034-2052.**
10. **DeLisa, M. P., P. Lee, T. Palmer, and G. Georgiou.** 2004. Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. *J. Bacteriol.* **186:366-373.**
11. **Deloche, O., W. L. Kelley, and C. Georgopoulos.** 1997. Structure-function analyses of the Ssc1p, Mdj1p, and Mge1p *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **179:6066-6075.**

12. **Depege, N., S. Bellafiore, and J. D. Rochaix.** 2003. Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* **299:1572-1575**.
13. **Drzymalla, C., M. Schroda, and C. F. Beck.** 1996. Light inducible gene *HSP70B* encodes a chloroplast-localized heat shock protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* **31:1185-1194**.
14. **Eriksson, M., P. Gardeström, and G. Samuelsson.** 1995. Isolation, purification, and characterization of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol.* **107:479-483**.
15. **Göhre, V., F. Ossenbühl, M. Crevecoeur, L. A. Eichacker, and J. D. Rochaix.** 2006. One of two Alb3 proteins is essential for the assembly of the photosystems and for cell survival in *Chlamydomonas*. *Plant Cell* **18:1454-1466**.
16. **Han, W., and P. Christen.** 2003. Mechanism of the targeting action of DnaJ in the DnaK molecular chaperone system. *J. Biol. Chem.* **278:19038-19043**.
17. **Harris, E. H.** 1989. *The Chlamydomonas sourcebook: A comprehensive guide to biology and laboratory use.* Academic Press Inc, San Diego, CA.
18. **Jilaveanu, L. B., C. R. Zito, and D. Oliver.** 2005. Dimeric SecA is essential for protein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102:7511-7516**.
19. **Keegstra, K., and K. Cline.** 1999. Protein import and *routing* systems of chloroplasts. *Plant Cell* **11:557-570**.
20. **Kleerebezem, M., and J. Tommassen.** 1993. Expression of the *pspA* gene stimulates efficient protein export in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **7:947-956**.
21. **Kleerebezem, M., W. Crielaard, and J. Tommassen.** 1996. Involvement of stress protein PspA (phage shock protein A) in *Escherichia coli* in maintenance of the protonmotive force under stress conditions. *EMBO J.* **15:162-171**.
22. **Klostermann, E., I. Droste Gen Helling, J. P. Carde, and D. Schunemann.** 2002. The thylakoid membrane protein ALB3 associates with the cpSecY-translocase in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. J.* **368:777-781**.
23. **Kroll, D., K. Meierhoff, N. Bechtold, M. Kinoshita, S. Westphal, U. C. Vothknecht, J. Soll, and P. Westhoff.** 2001. *VIPP1*, a nuclear gene of *Arabidopsis thaliana* essential for thylakoid membrane formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98:4238-4242**.
24. **Kuhn, A., R. Stuart, R. Henry, and R. E. Dalbey.** 2003. The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion?. *Trends Cell Biol.* **13:510-516**.

25. **Laemmli, U. K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227:680-685**.
26. **Laufen, T., M. P. Mayer, C. Beisel, D. Klostermeier, A. Mogk, J. Reinstein, and B. Bukau.** 1999. Mechanism of regulation of Hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96:5452-5457**.
27. **Li, H. M., Y. Kaneko, and K. Keegstra.** 1994. Molecular cloning of a chloroplastic protein associated with both the envelope and thylakoid membranes. *Plant Mol. Biol.* **25:619-632**.
28. **Lin, Y., and C. L. Cheng.** 1997. A chlorate-resistant mutant defective in the regulation of nitrate reductase gene expression in *Arabidopsis* defines a new *HY* locus. *Plant Cell* **9:21-35**.
29. **Liu, C., F. Willmund, J. P. Whitelegge, S. Hawat, B. Knapp, M. Lodha, and M. Schroda.** 2005. J-domain protein CDJ2 and HSP70B are a plastidic chaperone pair that interacts with vesicle inducing protein in plastids 1 (VIPP1). *Mol. Biol. Cell* **16:1165-1177**.
30. **Liu, C., F. Willmund, J. R. Golecki, S. Cacace, B. Heß, C. Markert, and M. Schroda.** 2007. The chloroplast HSP70B-CDJ2-CGE1 chaperones catalyze assembly and disassembly of VIPP1 oligomers in *Chlamydomonas*. *Plant J.*:in press.
31. **Luirink, J., T. Samuelsson, and J. W. de Gier.** 2001. YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* **501:1-5**.
32. **Mayer, M. P., and B. Bukau.** 2005. Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism. *Cell. Mol. Life Sci.* **62:670-684**.
33. **Miernyk, J. A.** 2001. The J-domain proteins of *Arabidopsis thaliana*: an unexpectedly large and diverse family of chaperones. *Cell Stress Chaperones* **6:209-218**.
34. **Nover, L., K. Bharti, P. Döring, S. K. Mishra, A. Ganguli, and K. D. Scharf.** 2001. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: how many heat stress transcription factors do we need?. *Cell. Stress Chap.* **6:177-189**.
35. **Ohad, I., P. Siekewitz, and G. E. Palade.** 1967. Biogenesis of chloroplast membranes. *J. Cell Biol.* **35:521-551**.
36. **Or, E., A. Navon, and T. Rapoport.** 2002. Dissociation of the dimeric SecA ATPase during protein translocation across the bacterial membrane. *EMBO J.* **21:4470-4479**.

37. **Popov, N., S. Schmitt, and H. Matthies.** 1975. Eine störungsfreie Mikromethode zur Bestimmung des Proteingehalts in Gewebshomogenaten. *Acta Biol. Germ.* **34:1441-1446.**
38. **Pratt, W. B., and D. O. Toft.** 2003. Regulation of signaling protein function and trafficking by the hsp90/hsp70-based chaperone machinery. *Exp. Biol. Med.* **228:111-133.**
39. **Rutherford, S. L., and S. Lindquist.** 1998. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution. *Nature* **396:336-342.**
40. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis** 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
41. **Samuelson, J. C., F. Jiang, L. Yi, M. Chen, J. W. de Gier, A. Kuhn, and R. E. Dalbey.** 2001. Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *J. Biol. Chem.* **276:34847-34852.**
42. **Schroda, M.** 2004. The *Chlamydomonas* genome reveals its secrets: chaperone genes and the potential roles of their gene products in the chloroplast. *Photosynth. Res.* **82:221-240.**
43. **Schroda, M., O. Vallon, F.-A. Wollman, and C. F. Beck.** 1999. A chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* **11:1165-1178.**
44. **Schroda, M., O. Vallon, J. P. Whitelegge, C. F. Beck, and F.-A. Wollman.** 2001. The chloroplastic GrpE homolog of *Chlamydomonas*: two isoforms generated by differential splicing. *Plant Cell* **13:2823-2839.**
45. **Scotti, P.A., M. L. Urbanus, J. Brunner, J. W. de Gier, G. von Heijne, C. van der Does, A. J. Driessen, B. Oudega, and J. Luirink.** 2000. YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* **19:542-549.**
46. **Settles, A. M., A. Yonetani, A. Baron, D. R. Bush, K. Cline, and R. Martienssen.** 1997. Sec-independent protein translocation by the maize Hcf106 protein. *Science* **278:1467-1469.**

47. **Shrager, J., C. Hauser, C. W. Chang, E. H. Harris, J. Davies, J. McDermott, R. Tamse, Z. Zhang, and A. R. Grossman.** 2003. The *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiol.* **131:401-408.**
48. **Sung, D. Y., E. Vierling, and C. L. Guy.** 2001. Comprehensive expression profile analysis of the *Arabidopsis* Hsp70 gene family. *Plant Physiol.* **126:789-800.**
49. **Van der Laan, M., M. L. Urbanus, C. M. Ten Hagen-Jongman, B. Nouwen, B. Oudega, N. Harms, A. J. Driessen, and J. Luirink.** 2003. A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100:5801-5806.**
50. **Watanabe, S., T. Kobayashi, M. Saito, M. Sato, K. Nimura-Matsune, T. Chibazakura, S. Taketani, H. Nakamoto, and H. Yoshikawa.** 2007. Studies on the role of HtpG in the tetrapyrrole biosynthesis pathway of the cyanobacterium *Synechococcus elongatus* PCC 7942. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **352:36-41.**
51. **Willmund, F., and M. Schroda.** 2005. HSP90C is a bona-fide Hsp90 that interacts with plastidic HSP70B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Phys.* **138:2310-2322.**
52. **Willmund, F., T. Mühlhaus, M. Wojciechowska, and M. Schroda.** 2007. The NH2-terminal domain of the chloroplast GrpE homolog CGE1 is required for dimerization and cochaperone function *in vivo*. *J. Biol. Chem.*:In press.
53. **Zerges, W., and J.-D. Rochaix.** 1998. Low density membranes are associated with RNA-binding proteins and thylakoids in the chloroplast of *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **140:101-110.**

GGAGTGGGTGGGCCAGGTGCACCGCTTCCTGGGCCTGTCCGTGGGCCTAATCCAGGCTGACCTGAAGCCCGA
 GGCGCGCCGCGCCGCCTACGCCTGCGACGTGACGTACGTGACCAACAGCGAGCTGGGCTTTGACTACCTGCG
 CGACAACCTGGCGGGCGCCCCCGCCGAGCTGGTGTGCGTGAGGCCACGCCCTTCAACTTCTGCGTCATTGA
 TGAGGTGGACTCCATCCTCATTGACGAGGCGCGCACGCCGCTCATCATCAGCGGCATGAGCGACAAGCCCTC
 CACCAAGTACGTCAAGGCGCACAAGATCGCGGACGCCTTGTCCCGCGACGTGCACTACACCGTGGACGAGAA
 GCAGAAGTCCGTGCTGCTGACGGAGGACGGATACGAGGCGGTGGAAGACGTGCTGCAGGTGACTGACCTGTA
 CGACCCGCGCACCCAGTGGGCCTCCTACATCATCAACGCGCTCAAGGCCAAGGAGCTGCAGATCAAGAACGT
 CAACTACATTGTCAAGGCCGGAGAGGTGATCATCGTGGACGAGTTCCTGGCCGCACCATGCCCCGGGCGCCG
 CTGGAGCGACGGCCTGCACCAGGCTGTGGAGGCCAAGGAGGGGCTGGAGATCCAGAACGAGAACATCACCT
 GGCCTCCGTGTCTACCAGGCCTTCTCCGCGGCTTCCCCAAGCTGGCGGGTATGACTGGTACCGCCGCCAC
 CGAGGTGTCTGAGTTCGACTCCATCTACAAGCTGCCTGTGGCCGTGGTGGCCACCAACCGCTCCATCAGCCG
 CAGGACAACCCGGATGTGGTGTTCGCGCTGGAGCAGTACAAGTGGAAGGCGGTGGTACGGAGGTGAAGCG
 CATGCACAAGACCGGCCGCGCCGTGCTGGTGGGAACCACAGTGTGGAGAGAGCGAGATCCTGTGCGCCAT
 GCTTCAGGAGGAGGGCATCCGCCATCAGGTGCTGAACGCCAAGCCCGAGAACGTGGAGCGTGAGTCCGAGAT
 TGTGGCGCAGAGCGGCCGCAAGGGCGCCGTACCATCTCCACGAACATGGCCGGTTCGCGGTACCGATATCCT
 GTTGGGCGGTAACGCCGACTACATGGCCCGCCTGAAGCTGCGTGAGATGCTAATGCCCGAGGTGGTGACCAT
 CGTGGAGGACGACAACAACCCCTTCCGCGTGGGCAAGGACGGCAAGGCGCGCTGCGCAACTGGGCCGCCAA
 CCCCTCGCTTTTCCCCTGCGAGCTCAGTGCTAACACCATGTCCATGGCCAAGTCCGCTGTGACTGCGGCTGT
 GCGGGCGTGGGGCACGCGGCAGCTGTGCGAGCTGGAGGCGGAGGACCGGCTGTCCGTGGCGTGTGAGAAGGG
 ACACACCGAGGACCCGAGCTGCTCAAGCTGCGTGAGGCGTTCGGCGCCATGCTGTCCGAGTACAAGGCGGT
 GACGGAGGTGGAGAAGGCCGAGGTGGTGGGGCTGGGCGGCCTGCACGTATCGGCACGGAGCGCCACGAGTC
 GCGCCGATCGACAACCAGCTGCGCGGCCGCTCCGGTTCGCCAGGGCGACCCCGGCTCCACCCGCTTCTTCT
 GTCTCTGGAGGACCCGCTGTTCCGCGTGTTCGGCGGCGACCCGCATCAAGGGCCTCATGGTGGCCTTCCAGGT
 GGAGGACCTGCCCATGGAGAGCTCCATGCTCAGCGACGCGCTGGACACGGCGCAGAAGCGCGTGGAGGCCTA
 CTTCTTCGACATCCGCAAGAACCTGTTTGACTACGACCAGGTGGTCAACACGCAGCGCGACAAGATCTACGC
 GGAGCGGCGCAAGGCGCTGCTGGCGCCCCGACCTGGCGCAGATGATGCGCGAGTACGCGGAGAAGACCGCAGA
 CGACATCCTGGAGGCCAAGTGGACAAGTCCACGGAGCCGGCCGAGTGGAAAGCTGGACAGCCTGGCCGCCAA
 GATGGTGCAGTACTGCTACCTGCTGGAGGGTCTGACTGGCGACGAGCTGCTCAAGGTGGCCAACGAGAGCGG
 CTTTCGAGGGCCTGCGCGTGCACCTGCACCCGCTGTGCGTGGAGCGCTACGAGAAGAAGGTGCAGATGGTGG
 CGCAGTGCAGCCGGGCTGATGGCGGAGGTGCAGAAGTTCCTCGTGTGCTCAGCCAGACCGACCCCTTTGGAA
 GGAGCACCTGCAGGCCATCAAGTTCCTGCAGCAGGCGGTGGGACTGCGCGGCTACGCCAGCAAGGATCCGCT
 GACCGAGTTCAGCTGGAGGGCTACAACCTGTTTGTGGACATGACGGCGCAGATCCGCCGCAACGTGATCTA
 CAACGTCTACATGTTCCAGCCGACGCGATTGTGCCGGTGGAGGAGGTGCAGCAGCAGGCGGCAGCGCCGC
 GGCAGCCAACGGCAGCGCCAATGGCAGCAGCAACGGGACAGCCAAGGAGGCGGAGACCGCCAAGAGTGGCGG
 CAAGCAGAAGGCCAAGGCCCGCGCATAAGCGCTGGGCTTGCAGCAATGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGT
 TGT
 CAACTTCGCTGCAACCGAAACAGCGGGTTCGCGTGCGGGATAGCATGAAGAAGGACTGAGGCAAGCTGAGTA
 CAAGTTAACGTAACGTTACCGTATGTTGAGGGGTGCAGGAGAGTTCACGGCTGTTTTGGTGGTGTGACGGA
 GAGACTACGCCGTACGGTGCAGCTGCATTCACTGTGATGCGATGCTCTTCTTGTGATAGTACGGGCCCGA
 TTTTGAGTGCGGCGCACGGCATTAGGTGGTGCACAGCAGCACAGGAAGTATGCACACAGAAGCGCAGGGAG
 AGGGCAGCCCCAAGAGAGTTCGAGAGAGGCTGTGAGGTTGGCACAGGTTTGACATGATGGCAAACGCAAAGGC
 CAATCAAGCAACTGTATAACGACGACGAACTCTGAGAACATGATTGCGACGTTACAAGAGCTCAAGAAGGG
 CCAGCCGCCGAGCCCAATGCGGGATGACATGGGGCTTACGAAGGCTGCGCTCGCCTGTAGGCAACCTCTCTG
 CT

3.) Aminosäuresequenz von CDJ2 aus *Chlamydomonas reinhardtii* sowie die Sequenzen der Deletionen (schwarz)

CDJ2 (374 AS)

MHAALQIGGCSAAGFAPVRCGGRKASALATPVRGCLGCGASAQSPMRAGAALGPRRSGR
 RTAVVCRAAAKNFYDILGVSASATDRDIKSAYRKLAMKLHPDVNKAPDAQKRFMEVKVAY
 ETLSDAKQRAEYDRRLRGGYAGGRTGYSGSSSSSYGGAYGNSAGNWSYGTGGGNYG
 NYTQEPLPGLDDLKELEKEYTAVWRERATKTPGGRPKTLAELELDLGGFLDFLEAL
 GIKEEAGSSSSSAGNGSSSSTGAAAGAAFRETSKSAEQFDAAWQQYGDGSPLGGAGG
 SSGAGASPAGSRSTSSGASASSSSSASSSSSQRRQQAPPPPPPPPPPPPKKSREEEI
 DAELLALKKKLNKL

CDΔ2 (236 AS)

MHAALQIGGCSAAGFAPVRCGGRKASALATPVRCQLGCGASAQSPMRAGAALGPRRSGR
RTAVVCRAAAKNFYDILGVSASATDRDIKSAYRKLAMKLHPDVNKAPDAQKRFMEVKVAY
ETLSDAKQRAEYDRRLRGGYAGGRTGYSGSSSSSSGYGGAYGNSAGNWGSSYGTGGGNYG
NYTQEPLPGLDDLKELEKEYTAWVRERATKTGPGGRPKTLAELELEDLGGEFLDFLEEAL
GIKEEAGSSSSSSAGNGSSSSSTGAAAGAAFRETSKSAEQFDAWWQQYGDGSPLGGAGG
SSGAGASPAGSRSTSSGASASSSSSSASSSSSQRRRQAPPPPPRPPPPPPPKKSREEEI
DAELLALKKKLNKL

D1 (193 AS)

MHAALQIGGCSAAGFAPVRCGGRKASALATPVRCQLGCGASAQSPMRAGAALGPRRSGR
RTAVVCRAAAKNFYDILGVSASATDRDIKSAYRKLAMKLHPDVNKAPDAQKRFMEVKVAY
ETLSDAKQRAEYDRRLRGGYAGGRTGYSGSSSSSSGYGGAYGNSAGNWGSSYGTGGGNYG
NYTQEPLPGLDDLKELEKEYTAWVRERATKTGPGGRPKTLAELELEDLGGEFLDFLEEAL
GIKEEAGSSSSSSAGNGSSSSSTGAAAGAAFRETSKSAEQFDAWWQQYGDGSPLGGAGG
SSGAGASPAGSRSTSSGASASSSSSSASSSSSQRRRQAPPPPPRPPPPPPPKKSREEEI
DAELLALKKKLNKL

D2 (159 AS)

MHAALQIGGCSAAGFAPVRCGGRKASALATPVRCQLGCGASAQSPMRAGAALGPRRSGR
RTAVVCRAAAKNFYDILGVSASATDRDIKSAYRKLAMKLHPDVNKAPDAQKRFMEVKVAY
ETLSDAKQRAEYDRRLRGGYAGGRTGYSGSSSSSSGYGGAYGNSAGNWGSSYGTGGGNYG
NYTQEPLPGLDDLKELEKEYTAWVRERATKTGPGGRPKTLAELELEDLGGEFLDFLEEAL
GIKEEAGSSSSSSAGNGSSSSSTGAAAGAAFRETSKSAEQFDAWWQQYGDGSPLGGAGG
SSGAGASPAGSRSTSSGASASSSSSSASSSSSQRRRQAPPPPPRPPPPPPPKKSREEEI
DAELLALKKKLNKL

D3 (106 AS)

MHAALQIGGCSAAGFAPVRCGGRKASALATPVRCQLGCGASAQSPMRAGAALGPRRSGR
RTAVVCRAAAKNFYDILGVSASATDRDIKSAYRKLAMKLHPDVNKAPDAQKRFMEVKVAY
ETLSDAKQRAEYDRRLRGGYAGGRTGYSGSSSSSSGYGGAYGNSAGNWGSSYGTGGGNYG
NYTQEPLPGLDDLKELEKEYTAWVRERATKTGPGGRPKTLAELELEDLGGEFLDFLEEAL
GIKEEAGSSSSSSAGNGSSSSSTGAAAGAAFRETSKSAEQFDAWWQQYGDGSPLGGAGG
SSGAGASPAGSRSTSSGASASSSSSSASSSSSQRRRQAPPPPPRPPPPPPPKKSREEEI
DAELLALKKKLNKL

D4 (43 AS)

MHAALQIGGCSAAGFAPVRCGGRKASALATPVRCQLGCGASAQSPMRAGAALGPRRSGR
RTAVVCRAAAKNFYDILGVSASATDRDIKSAYRKLAMKLHPDVNKAPDAQKRFMEVKVAY
ETLSDAKQRAEYDRRLRGGYAGGRTGYSGSSSSSSGYGGAYGNSAGNWGSSYGTGGGNYG
NYTQEPLPGLDDLKELEKEYTAWVRERATKTGPGGRPKTLAELELEDLGGEFLDFLEEAL
GIKEEAGSSSSSSAGNGSSSSSTGAAAGAAFRETSKSAEQFDAWWQQYGDGSPLGGAGG
SSGAGASPAGSRSTSSGASASSSSSSASSSSSQRRRQAPPPPPRPPPPPPPKKSREEEI
DAELLALKKKLNKL

Nur J (71 AS)

MHAALQIGGCSAAGFAPVRCGGRKASALATPVRCQLGCGASAQSPMRAGAALGPRRSGR
RTAVVCRAAAKNFYDILGVSASATDRDIKSAYRKLAMKLHPDVNKAPDAQKRFMEVKVAY
ETLSDAKQRAEYDRRLRGGYAGGRTGYSGSSSSSSGYGGAYGNSAGNWGSSYGTGGGNYG
NYTQEPLPGLDDLKELEKEYTAWVRERATKTGPGGRPKTLAELELEDLGGEFLDFLEEAL
GIKEEAGSSSSSSAGNGSSSSSTGAAAGAAFRETSKSAEQFDAWWQQYGDGSPLGGAGG
SSGAGASPAGSRSTSSGASASSSSSSASSSSSQRRRQAPPPPPRPPPPPPPKKSREEEI
DAELLALKKKLNKL

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung meiner Diplomarbeit unterstützt haben.

Prof. Dr. Haehnel danke ich für die Leitung dieser Arbeit.

Besonderer Dank gilt Dr. Michael Schroda, der mich während der Zeit dieser Arbeit hervorragend betreut hat. Ich möchte mich bedanken für die Klärung von Fragen, für die er jederzeit zur Verfügung stand, für Motivation und zielstrebige Konzepte. Er hat mir das Erlernen vielfältiger Techniken an einem interessanten Thema ermöglicht.

Bei der Bewältigung des Laboralltags standen mir vor allem Felix Willmund und Miriam Schulz-Raffelt mit Rat und Tat zur Seite. Für ihre Geduld und Zeit möchte ich mich besonders herzlich bedanken. Auch Mukesh, Barbara und Veronika möchte ich meinen Dank aussprechen für eine angenehme Arbeitsumgebung und eine schöne Zeit.

Vielen Dank auch an alle Freunde, die mich ermutigt und mir geholfen haben. Besonders möchte ich mich dabei bei Hugo Ramos und Silvia Willadt bedanken.

Ganz besonders dankbar bin ich meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichen haben und mir immer unterstützend zur Seite gestanden haben. Sie haben mich motiviert, mir Mut gemacht und mir auf meinem Weg geholfen.

Liebster Dank gebührt meinem Freund Damian, der immer für mich da ist, wenn ich ihn brauche, mir hilft, wenn ich nicht weiter weiß und hinter mir steht und mir den Rücken stärkt.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit vom 11. Mai 2006 bis zum 21. März 2007 am Institut für Biologie II der Albert-Ludwigs-Universität in Freiburg angefertigt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Freiburg, den 21.3.2007

Mareike Possienke