
**Lokalisierung und Charakterisierung der AAA⁺-Proteine
AFG1L2 und AFG1L1 aus *Arabidopsis thaliana***



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

vorgelegt von

Monika Fuchs

München, 25. Oktober 2012

Dissertation eingereicht am: 25. Oktober 2012

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Dezember 2012

Erstgutachterin: Prof. Dr. U. Vothknecht

Zweitgutachterin: PD Dr. C. Bolle

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

Erklärung

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

München, 25. Oktober 2012

Monika Fuchs

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Kalzium-Signalnetzwerk	1
1.2 AAA ⁺ -Proteine.....	3
1.3 AFG1-like Proteine in Arabidopsis	5
2. Material und Methoden	7
2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Saatgut.....	7
2.2 Größenmarker und Säulenmaterial	7
2.3 Enzyme und Kits.....	8
2.4 Bakterienstämme.....	8
2.5 Molekularbiologische Methoden	9
2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategie.....	9
2.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
2.5.3 Isolierung von RNA aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	10
2.5.4 cDNA-Synthese und qRT-PCR.....	11
2.6 Zellbiologische Methoden	12
2.6.1 Heterologe Expression von rekombinanten Protein.....	12
2.6.2 Pflanzenanzucht	12
2.6.3 Transiente Protoplastentransformation von <i>Brassica rapa</i>	12
2.6.4 Transformation von <i>Nicotiana benthamiana</i> und Protoplastenisolation	13
2.6.5 Stabile Transformation von <i>Arabidopsis thaliana</i> und GUS-Färbung	13
2.6.6 Generierung der <i>afg111/afg112</i> -Mutante durch Kreuzung.....	14
2.6.7 Hefe Anzucht und Split-Ubiquitin-Assay	14
2.7 Biochemische Methoden.....	15
2.7.1 Chromatographische Methoden	15
2.7.1.1 Aufreinigung an Ni-NTA	15
2.7.1.2 Größenausschlusschromatographie	15
2.7.1.3 Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose	16
2.7.1.4 Affinitätschromatographie an GFP-Trap oder IGG-Sepharose.....	16
2.7.2 BN-PAGE	17
2.7.3 Quervernetzungs-Versuche	17
2.7.4 ATPase-Aktivitätsnachweis	18
2.7.4.1 Dünnschichtchromatographie.....	18

2.7.4.2	Luziferase-Assay	18
2.8	Computeranalysen.....	18
2.9	Fluoreszenzmikroskopie	19
3.	Ergebnisse	20
3.1	Vergleichende Analyse von Proteindomänen in AFG1L2 und AFG1L1	20
3.2	Lokalisierungsstudien	23
3.2.1	Transiente Transformation von GFP-Fusionsproteinen.....	23
3.2.2	Analysen zur Lokalisation mittels „self-assembling“ GFP.....	25
3.2.3	Identifizierung der Transitsequenzen von AFG1L2 und AFG1L2	29
3.3	Expression von löslichem AFG1L2 und AFG1L1	31
3.4	Interaktionsstudien mit Calmodulin.....	33
3.4.1	Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose	34
3.4.2	Quervernetzungsversuche	36
3.4.2.1	Kalziumabhängige Quervernetzung von AFG1L2 und Calmodulin	36
3.4.2.2	Einfluss von ATP auf die Quervernetzung von AFG1L2 und Calmodulin	37
3.4.3	Versuche zur <i>in vivo</i> -Interaktion mittels Split-Ubiquitin.....	40
3.5	Oligomerisierungs- und Aktivitätsstudien	40
3.5.1	BN-PAGE	41
3.5.2	Größenausschlusschromatographie.....	42
3.5.2.1	Oligomerisierung und Aktivität von AFG1L2	42
3.5.2.2	Einfluss von 6-Aminohexansäure auf die Oligomerisierung von AFG1L2.....	45
3.6	<i>In planta</i> Untersuchungen zur Funktion von AFG1L2 und AFG1L1	49
3.6.1	Untersuchung von T-DNA-Insertionslinien von AFG1L2 und AFG1L1	50
3.6.2	Generierung einer <i>afg111/afg112</i> -Doppel-Mutante	52
3.6.3	Expressionsanalyse von <i>AFG1L2</i> und <i>AFG1L1</i>	55
3.6.3.1	Analyse der <i>AFG1L1</i> Expressionsdaten durch Genevestigator	55
3.6.3.2	GUS-Reporter-gen-Pflanzen.....	56
3.6.3.3	qRT-PCR	58
4.	Diskussion	64
5.	Literatur.....	71
6.	Zusammenfassung.....	78

7. Abstract	79
8. Danksagung	80
9. Anhang	81
9.1 Abkürzungsverzeichnis	81
9.2 Vektoren, Primer, erzeugte Konstrukte.....	82

1. Einleitung

Nach der Endosymbionten-Theorie entwickelten sich pflanzliche Zellen durch zwei aufeinanderfolgende Ereignisse. Im ersten endosymbiotischen Schritt wurde ein α -Proteobakterium, das die Fähigkeit der Respiration bereits entwickelt hatte, von einer bis heute unbekanntem Wirtszelle, vermutlich durch Phagozytose, aufgenommen. Daraus entwickelten sich die ersten eukaryotischen Zellen mit Mitochondrien. Im zweiten endosymbiotischen Schritt wurde ein Cyanobakterium, das zur Photosynthese befähigt war, aufgenommen, woraus sich die Chloroplasten und später alle pflanzlichen Zellen entwickelten. (Mereschkowsky 1905). Da heute in beiden Organellen überlebenswichtige metabolische Prozesse ablaufen, wie die Photosynthese und die Atmungskette, war es für die Wirtszelle notwendig die Organelle präzise in ihrer Funktion zu steuern. Über die Zeit wurde ein Großteil der genetischen Information der Organelle in den Zellkern übertragen, es muss daher auf ein ständig verändertes Bedürfnis der Organelle nach kernkodierten Proteinen eingegangen werden. Auf der anderen Seite variieren die Aufgaben der Organelle je nach Entwicklungsstadium und Umgebungseinfluss entsprechend der Anforderungen der umgebenden Zelle. Es war daher notwendig ein leistungsfähiges und variables Signalnetzwerk zu etablieren, um die verschiedenen Bedürfnisse von Organellen und umgebender Zelle zu koordinieren. Dazu können die Synthese von Proteinen oder Metaboliten oder auch Import und Export in die Organelle reguliert werden. Veränderungen werden über verschiedenste Sensoren registriert und über verschiedene Signalmoleküle wie zum Beispiel zyklische Nukleotide oder Kalzium zuverlässig und schnell weitergeleitet.

1.1 Das Kalzium-Signalnetzwerk

Kalzium ist ein wichtiges Signalmolekül in pflanzlichen Organismen (McAinsh and Pittman 2009). Anders als die Signalübertragung durch zyklische Nukleotid-Monophosphate (cAMP/cGMP) (Gehring 2010) oder durch aktive Sauerstoffmoleküle (Van Breusegem et al. 2001) ist die Signalübertragung durch Kalziumsignale bereits gut untersucht (Clapham 2007). Externe Reize wie Hitze, Trockenheit oder Fraßfeinde, und interne Reize, z.B. Hormone, lösen durch konzertierte Aktivität von Transportern und

Membrankanälen Kalziumsignale unterschiedlicher Stärke und Länge aus. Die veränderten Kalziumkonzentrationen werden von Sensorproteinen erfasst und in Reaktionen umgewandelt (Reddy and Reddy 2004). Viele der Proteine, die Kalzium-Signale erfassen, besitzen ein als EF-Hand bezeichnetes, konserviertes Helix-Loop-Helix-Motiv, welches ein einzelnes Kalziumion bindet. Das führt meistens zu einer Konformationsänderung im Protein. Zu den wichtigen Vertretern der EF-Hand-Proteine gehören zum Beispiel die Calmoduline oder auch kalziumabhängige Proteinkinasen. Diese kalziumbindenden Proteine sind an verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt und steuern die Entwicklung und die Aktivität der Zelle. Wie wichtig Kalziumsignale für Pflanzen sind, erkennt man an der großen Anzahl von Proteinen aus der EF-Hand-Familie, die in *Arabidopsis thaliana* exprimiert werden (Day et al. 2002).

Im *Arabidopsis*-Genom sind sechs Kopien für klassische Calmoduline vorhanden, die aber nur für drei Isoformen kodieren, während im menschlichen Genom nur drei Kopien zu finden sind, die alle für die gleiche Isoform kodieren (Pegues and Friedberg 1990). Außerdem kodiert das *Arabidopsis*-Genom für 50 Calmodulin-ähnliche-Proteine (calmodulin-like protein) (McCormack and Braam 2003), was auch nochmals unterstreicht wie wichtig dieser Signalweg in der Pflanzenwelt ist. Des Weiteren besitzen pflanzliche Organismen auch Calcineurin B-like-Proteine sowie kalziumabhängige Proteinkinasen (Luan et al. 2002; McCormack and Braam 2003). Im Fall von Calmodulin, Calmodulin-ähnlichen-Proteinen und Calcineurin B-like Proteinen wird ein Kalziumsignal weitergeleitet indem sich, abhängig von der Menge an gebundenem Kalzium, die Konformation ändert und so die Interaktion mit nachgeschalteten Proteinen verändert wird. Sie übermitteln ein Kalziumsignal, haben aber keine Katalytische- oder Enzymaktivität (Day et al. 2002; McCormack et al. 2005). Bei kalziumabhängigen Proteinkinasen kommt es durch Kalziumbindung direkt zur Änderung der Aktivität.

Calmoduline sind in ihrer Sequenz stark konservierte Proteine. Sie bestehen aus zwei globulären Strukturen mit je zwei EF-Händen, die durch eine flexible Helix verbunden werden (Chin and Means 2000). Jede EF-Hand kann mit einem Kalziumion besetzt werden, folglich können bis zu vier Kalziumionen pro Calmodulin gebunden werden.

Dadurch ist eine Vielzahl von Konformationsänderungen möglich. Es werden dann vorher nach innen gekehrte, hydrophobe Seitenketten nach außen exponiert, die die Interaktion mit einer Vielzahl von Zielproteinen erlauben. Calmodulin-ähnliche-Proteine haben zwischen einer und sechs EF-Hände, was zu einem noch größeren Spektrum an Reaktionen auf Kalziumsignale führt. Auch wurden bei Calmodulin-ähnlichen-Proteinen verschiedene Motive festgestellt, die möglicherweise für eine Lokalisierung in verschiedene Organelle oder für posttranslationelle Modifikationen notwendig sind (McCormack and Braam 2003; McCormack et al. 2005). Es gibt Hinweise, dass die von prokaryotischen Organismen abstammenden Organellen, Chloroplasten und Mitochondrien, die Kalzium/Calmodulin-Regulation der Wirtszelle übernommen haben, da in ihnen Proteine mit Calmodulin-Bindedomäne gefunden wurden (Bussemer et al. 2009; Chigri et al. 2006; Chigri et al. 2005; Kuhn et al. 2009; Yang and Poovaiah 2002). In Mitochondrien und Chloroplasten sind CaM-bindende AAA⁺-Proteine und eine CaM-bindende NAD(H)-Kinase zu finden (Anderson et al. 1980; Bussemer et al. 2009; Reddy et al. 2002). Das sind starke Hinweise darauf, dass die Organellen in das Kalzium-Signalnetzwerk eingebunden sind. Schon lange wird vermutet, dass Calmodulin und Calmodulin-ähnliche-Proteine in den Mitochondrien, Chloroplasten oder auch Peroxisomen zu finden sind (Biro et al. 1984; Jarrett et al. 1980; Yang and Poovaiah 2002) da auch innerhalb der Organelle Signale registriert und weitergeleitet werden müssen. In Peroxisomen, kleinen eukaryotischen Organellen, wurde Calmodulin mit der Aktivität der Katalase assoziiert (Yang and Poovaiah 2002). In einer neuen Studie wurde ein Calmodulin-ähnliches-Protein in Mitochondrien und eines in Peroxisomen identifiziert (Chigri et al. 2011). In Chloroplasten wurde bis heute kein Calmodulin oder Calmodulin-ähnliches-Protein detektiert.

1.2 AAA⁺-Proteine

AAA⁺-Proteine sind „ATPasen associated with various callular activities“ und, wie ihr Name sagt, an einer Vielzahl von zellulären Prozessen wie DNA-Replikation oder auch Proteinabbau beteiligt (Neuwald et al. 1999). AAA⁺-Proteine gehören zu einer Unterklasse der P-Loop-NTPasen. Die wichtigsten Motive bei allen klassischen

P-Loop-NTPasen sind das Walker A- und das Walker B- Motiv als die wichtigsten Bestandteile der ATP-Bindedomäne. Die Sequenzen GxxxxGK[T/S] im Walker A-Motiv und hhhhDE im Walker B-Motiv, wobei x für jede beliebige Aminosäure und h für hydrophobe Aminosäuren steht, sind stark konserviert und bei allen funktionellen P-Loop-NTPasen zu finden. Sie sind zuständig für die Bindung zum Nukleotid ATP, außerdem koordiniert das Aspartat (D) im Walker B- Motiv das für die Hydrolyse notwendige Magnesium und das Glutamat (E) aktiviert das hierfür benötigte Wasser (Iyer et al. 2004). Die AAA⁺-Domäne ist durch eine 200-250 Aminosäuren lange ATP-Bindedomäne charakterisiert, die aus einer bestimmten Abfolge von α -Helices und fünf β -Faltblättern besteht. In dieser Domäne befinden sich die beiden Walker-Motive und außerdem bestimmte weitere Motive, die charakteristisch für AAA⁺-Proteine sind. Zu diesen konservierten Motiven gehören das Sensor 1- und das Sensor 2- Motiv (Iyer et al. 2004; Neuwald et al. 1999) sowie ein oder zwei Arginin-Finger. Diese Region wird auch „Second region of homologie“ (SRH) genannt, ist aber in ihrer Gesamtheit nicht so stark konserviert wie die beiden Walker-Motive. Die (SRH) wird vermutlich für die Ausrichtung des ATPs im Protein benötigt. Mutationen in den Sensor Motiven oder den Arginin-Fingern führten zur Verschlechterung der ATP-Hydrolyse (Karata et al. 1999; Ogura et al. 2004). Die freigesetzte Energie aus der ATP-Hydrolyse führt zu einer Konformationsänderung im AAA⁺-Protein (Ogura and Wilkinson 2001). Um Ihre Aufgaben in der Zelle zu erfüllen assemblieren AAA⁺-Proteine zu Oligomeren, meist zu ringförmigen Hexameren (Neuwald et al. 1999). Die ATP-Bindestellen liegen dabei zwischen den einzelnen Untereinheiten (Lenzen et al. 1998). In der Mitte des Komplexes bildet sich eine Pore oder eine Einstülpung, in der das Substrat aufgrund der Konformationsänderung verändert werden kann. Es wird noch spekuliert, ob die ATP-Hydrolyse dabei synchronisiert über den ganzen Komplex abläuft oder um das Hexamer rotiert, oder ob nur einzelne Untereinheiten ATP hydrolysieren (Ogura and Wilkinson 2001).

1.3 AFG1-like Proteine in Arabidopsis

Es wurde nachgewiesen, dass am Aufbau der Thylakoide bei höheren Pflanzen Vesikel beteiligt sind und durch Versuche mit Inhibitoren wurde gezeigt, dass an der Fusion dieser Vesikel mit der Thylakoidmembran Calmodulin beteiligt ist (Westphal et al. 2001). Daraufhin wurde versucht, Komponenten der Thylakoidbiosynthese zu identifizieren, die von Calmodulin reguliert werden. AFG1L1 (AFG1-like Protein 1) wurde von Bussemer et al. (2009) unter Verwendung von Calmodulin-Agarose aus der Fraktion der löslichen Proteine aus Chloroplasten von *Arabidopsis thaliana* aufgereinigt. Die Namensgebung erfolgte aufgrund seiner Homologie zu dem Hefeprotein AFG1. Bei den weiteren Untersuchungen konnte die kalziumabhängige Bindung von Calmodulin an AFG1L1 bestätigt und die Calmodulin-Bindedomäne bestimmt werden. AFG1L1 wird in der Pflanze durch Kalziumsignale reguliert, während homologe Proteine von beispielsweise Mensch oder Hefe keine Calmodulin-Bindedomäne aufweisen. AFG1L1 war auch interessant, weil es ein AAA⁺-Protein ist und das Hefeprotein AFG1 als Homolog von NSF (N-Ethylmaleimide sensitive fusion protein) identifiziert wurde (Lee and Wickner 1992). NSF ist für die Disassemblierung des cis-SNARE-Komplexes nach erfolgter Vesikelfusion mit der Golgi-Membran zuständig. AFG1L1 erschien deshalb als vielversprechender Kandidat bei der Aufklärung des Ablaufs der Thylakoidbiosynthese. Das AFG1L1 eine Calmodulin-Bindedomäne besitzt ist ein weiterer Hinweis darauf, dass das Kalzium/Calmodulin-Netzwerk in Pflanzen weitreichende Verwendung findet und auch in die ursprünglich prokaryotischen Organellen übernommen wurde. Wie die weiteren Untersuchungen zeigten ist AFG1L1 *in vitro* dual in Chloroplasten und Mitochondrien lokalisiert (Bussemer et al. 2009). Es wurde postuliert dass AFG1L1 zu einer Familie prokaryotischen Ursprungs der AAA⁺-Proteine gehört (Iyer et al. 2004), aber in Cyanobakterien wurden keine Vertreter der AFG1-Familien gefunden. AFG1L1 hat vermutlich im Zuge der Evolution in Chloroplasten eine neue Aufgabe bekommen. Bei *in silico*-Analysen wurde ein Homolog zu AFG1L1 gefunden, das AFG1L2 genannt wurde. Untersuchungen der Aminosäuren-Sequenz zeigten auch dass AFG1L2 die Merkmale von AAA⁺-Proteinen besitzt.

Ziel dieser Arbeit war es AFG1L2 im Vergleich zu AFG1L1 zu charakterisieren. Es wurde analysiert ob AFG1L2 ebenfalls in das Kalzium-Signalnetzwerk eingebunden ist. Auch sollte die *in vivo*-Lokalisierung von beiden Proteinen untersucht werden. Ein weiterer Fokus lag auf der Aufklärung, ob AFG1L2 strukturelle und funktionelle Eigenschaften der AAA⁺-Proteine besitzt, und welche Funktion es in der Pflanze ausübt.

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Saatgut

Alle Chemikalien wurden von namhaften Herstellern in höchstmöglicher Qualität bezogen. Spezielle Chemikalien wurden bei folgenden Firmen gekauft: Rinderhirn-Calmodulin von Enzo Lifesciences (Lörrach, Deutschland); ATP, ADP und „Complete Protease Inhibitor Cocktail“ von Roche (Mannheim, Deutschland); nicht hydrolysierbares ATP (Adenosin 5'-[beta, gamma-imido] triphosphat Tetralithiumsalz) ist von Sigma-Aldrich (Seelze, Deutschland); die Quervernetzungsreagenzien EDC (1 Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid) und S-NHS (N-Hydroxysulfosuccinimid) von Thermo Scientific (Rockford, IL USA). Oligonukleotid-Primer wurden bei Eurofins MWG (Ebersberg, Deutschland) und Mitotracker[®] CMX Ros von Invitrogen (Darmstadt, Deutschland) bezogen.

Es wurden Samen von *A. thaliana* L. Ökotyp Columbia-0 und *Nicotiana benthamiana* verwendet. Die T-DNA-Insertionslinien wurden über „The European Arabidopsis Stock Centre NASC“ (Loughborough, Großbritannien) und das „IJPB INRA Centre de Versailles“ (Versailles Cedex, Frankreich) bezogen. Die Pflanzen wurden entweder auf Erde oder auf Platten mit Gelrite[®] (Duchefa Biochemie, Haarlem, Niederlande) gezogen.

2.2 Größenmarker und Säulenmaterial

Rekombinant heterolog exprimiertes Protein wurde über Ni-NTA Agarose der Firma Quiagen (Hilden, Deutschland) aufgereinigt. Calmodulin-Agarose für Calmodulin-Pulldown-Assays war von Sigma-Aldrich (Hamburg, Deutschland), GFP-Fusionsproteine wurden mit GFP-Trap von Chromotek (Planegg-Martinsried, Deutschland) aufgereinigt. Die Größenausschlusschromatographie wurde mit der Superdex 200 10/300 GL Säule von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Für die Dünnschichtchromatographie von Nucleotiden wurde DC PEI Cellulose F von Merck (Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Für die Größenbestimmung von Proteinen in der SDS-Page wurde „Low Molekular Weight“-Marker von Sigma-Aldrich benutzt. In der BN-PAGE wurde das „High Molekular Weight Calibration Kit for native electrophoresis“ von GE Healthcare verwendet. Um die Größe von DNA-Banden im Agarosegel abzuschätzen wurde mit den Enzymen EcoRI und HindIII geschnittene λ -Phagen-DNA von Fermentas (St. Leon Rot, Deutschland) verwendet.

2.3 Enzyme und Kits

Polymerasen und Restriktionsenzyme für die Klonierung wurden von Fermentas oder New England Biolabs (Frankfurt a.M., Deutschland) gekauft. Für Gateway-Klonierungen in den Vektor pKGWFS7 wurden der Entry-Vector pENTR D-TOPO und das Clonase-Kit von Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bezogen. Zur Aufreinigung von DNA wurde das NucleoSpin® Plasmid Kit von Machery-Nagel (Düren, Detuschland) verwendet. ATP-Konzentrationen wurden mit dem ATP Determination Kit von Biaffin (Kassel, Deutschland) bestimmt.

RNA wurde mit Hilfe des Maxwell®16 Systems und dem Tissue LEV Total RNA Purification Kit von Promega (Mannheim, Deutschland) isoliert und mit M-MLV reverser Transkriptase von Promega umgeschrieben. Quantitative-Real-Time-PCR wurde mit iQ SYBR Green Supermix durchgeführt.

2.4 Bakterienstämme

Der *E. coli* Stamm JM-109 von New England Biolabs und XL10-Gold von Stratagene (La Jolla, USA) wurden benutzt, um Plasmid-DNA zu vervielfältigen. Der Vektor pKGWFS7 wurde in *ccdB* Survival Cells von Invitrogen vermehrt. Um Protein rekombinant zu exprimieren wurden BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL von Stratagene verwendet.

Zur Erzeugung stabil transformierter Pflanzen wurde der Agrobacterienstamm *A. tumefaciens* GV3101::pMP90RK eingesetzt. Für die transiente Transformation von Tabak wurde *A. tumefaciens* LBA1334 benutzt.

Für Split-Ubiquitin Versuche wurde der Hefestamm NMY51 von DualsystemsBiotech (Schlieren, Schweiz) benutzt.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Die in dieser Arbeit angewandten molekularbiologischen Methoden wurden nach den Protokollen von Sambrook und Russel (2001) durchgeführt. Dazu gehören die DNA-Extraktion durch alkalische Lyse und Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten DNA. Bei der Verwendung von Kits zur PCR-Aufreinigung oder zur Gewinnung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurde genau nach Herstellerangaben von Machery-Nagel gearbeitet. Die Herstellung chemisch-kompetenter *E. coli* Zellen erfolgte nach der Methode von Hanahan (1983) die Transformation der Plasmide in die Zellen nach dem Protokoll von Pope und Kent (1996). Erzeugung elektrokompenter *A. tumefaciens* und Elektrotransformation erfolgte nach dem Protokoll „Micropulser™ Electroporation Apparatus Operation Instructions and Application Guide“ von Bio-Rad.

2.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Klonierungsstrategie

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von ausgewählten DNA-Fragmenten zur Bestimmung des Genotyps oder zum Einfügen von Restriktionsschnittstellen für die Klonierung nach Saiki et al. (1988) genutzt. Zum Ansetzen der Reaktion wurden die Herstellerangaben bei den Polymerasen beachtet. Die Reaktion startete mit einem zweiminütigem Denaturierungsschritt bei 96° C bzw. 98° C bei Verwendung der Phusion® Polymerase. Ein Zyklus umfasst einen Denaturierungsschritt bei 96° C/98° C für 15 Sekunden. Die Primeranbindung erfolgte

bei einer Temperatur 5° C unter der errechneten Primerschmelztemperatur für 30 Sekunden. Die Synthesephase lief bei 72° C ab, wobei die Dauer dieser von der Länge des zu erwartenden Produkts abhing und nach Herstellerangaben der Polymerasen berechnet wurde. Der Zyklus wurde 25-30-mal wiederholt. Für die Klonierungen wurde cDNA (Proteinkonstrukte ohne Introns) oder genomische DNA (Promotorkonstrukte) aus *A. thaliana* verwendet und entweder durch Restriktionsverdau und Ligation oder mit Gateway-Cloning[®] (Invitrogen, Darmstadt, Deutschland) in den Zielvektor gebracht. Deletionskonstrukte wurden durch „overlap extension“ erzeugt (Pogulis et al.). Die fertigen Klone durch Sequenzierung im Sequencing Service der Fakultät für Biologie (LMU München) auf ihre Richtigkeit geprüft. Die Liste mit den verwendeten Vektoren und erzeugten Konstrukten befindet sich im Anhang dieser Arbeit

2.5.2 Isolierung von genomischer DNA aus *Arabidopsi thaliana*

Ein Blatt von *A. thaliana* wurde mit 410 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl pH 7,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS) in der Kugelmühle zerkleinert, dann mit 17.000 g für 10 Minuten zentrifugiert und 300 µl vom Überstand in 300µl Isopropanol getropft und gut gemischt. Nach weiteren 10 Minuten Zentrifugation bei 17.000 g wurde der Überstand verworfen, das DNA-Pellet an der Luft getrocknet und in 50 µl Bidest-Wasser aufgenommen. Für die Genotypisierung wurden 1,5 µl genomische DNA pro 25 µl PCR-Ansatz verwendet.

2.5.3 Isolierung von RNA aus *Arabidopsis thaliana*

Für die Isolierung von RNA wurden 30-100 µg Pflanzenmaterial in 2 ml Mikroreaktionsgefäßen mit 5 mm „Stainless Steel Beats“ (Qiagen) für eine Minute mit flüssigem N₂ in der Kugelmühle gemörsert, dann mit 700 µl RNA-Lysepuffer aus dem Total RNA Kit versetzt und weitere zwei Minuten homogenisiert. Nicht lösliche Zellbestandteile wurden von den löslichen Bestandteilen durch Zentrifugation bei 17.000 g für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrennt. War der Überstand klar wurden 500 µl davon in eine RNA-Kartusche überführt, befanden sich noch Schwebeteilchen in

der Lösung wurde so viel Überstand wie möglich in ein neues 1,5 ml Mikroreaktionsgefäß überführt und die Verunreinigung durch Zugabe von 100 µl RNA Dilutionbuffer durch erneutes Zentrifugieren ausgefällt. Danach wurde der gesamte Überstand in die RNA-Kartusche überführt. Die Vorbereitung der Extraktionskartuschen und des Roboters erfolgten genau nach den Herstellerangaben von Promega.

2.5.4 cDNA-Synthese und qRT-PCR

Die cDNA-Synthese erfolgte genau nach der Anleitung von Promega mit „Random Hexamer“-Primern und je 1 µg gesamt RNA aus *A. thaliana*. Für die qRT-PCR wurde das iQ5 ThermalCycler-System benutzt. Es wurden 20 µl Ansätze genau nach dem Protokoll von Biorad vorbereitet. Die Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,5 µM eingesetzt. Die Auswertung der Daten erfolgte nach der Methode von Livak und Schmittgen (2001).

Tab. 1: Verwendete Primer für die qRT-PCR

Bezeichnung	Sequenz (5' ->3')
AFG1L2 fw	CTAGCTGGAGAACACAAAGG
AFG1L2 rw	GCTACATCATTGACCATGAACTC
AFG1L1 fw	CTCTGCTGAATACAAACTG
AFG1L1 rw	CCTGTTCTATTCACATCTGAGAC
Ubiquitin rw	GGAAAAAGGTCTGACCGACA
Ubiquitin fw	CTGTTACGGAACCCAATTC

2.6 Zellbiologische Methoden

2.6.1 Heterologe Expression von rekombinanten Protein

E. coli Zellen des Stammes BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL wurden mit Konstrukten im pCold-Vektor transformiert. Die Kolonien wurden in LB-Medium (Bertani 1951) unter Ampicillin-Selektion bei 37° C bis zu einer OD₆₀₀=0,4-0,6 angezogen. Die Zellsuspension wurde dann auf Eis für 10 Minuten gekühlt und mit 0,8 mM IPTG induziert. Die Expression erfolgte bei 16° C für 24 Stunden.

2.6.2 Pflanzenanzucht

Für Erdkulturen wurden Samen von *Arabidopsis thaliana* ausgelegt und im Gewächshaus mit einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden gezogen. Zur Kultivierung auf Nährstoffplatten (1% Saccharose; 0,5 g/l MES pH 5,8; 2,37 g/l Murashige+Skoog-Salze; 0,3% Gelrite®) wurden die Samen mit 70% Ethanol gewaschen, dann mit 50% Chlorbleiche sterilisiert und mit sterilem Wasser gespült bevor sie auf die Platten ausgelegt wurden. Die Samen auf den Platten wurden für drei Tage im Dunkeln stratifiziert bevor sie im Lichtschrank bei einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 16/8 Stunden bei einer Temperatur von 21° C bei Licht und 18° C bei Dunkelheit gezüchtet wurden. Bei Nährstoffplatten für Hochkantversuche wurde die Menge an Gelrite® auf 0,6% erhöht und die Platten senkrecht in den Lichtschrank gestellt.

2.6.3 Transiente Protoplastentransformation von *Brassica rapa*

Die Isolierung und Transformation von Protoplasten aus *Brassica rapa* erfolgte nach dem Protokoll von Mehlmer et al. (2011). Die Protoplasten werden durch den Verdau der Zellwand mit Cellulase und Mazerozym aus dem Zellverband gelöst. Die Zellzahl wurde mit einer Neubauer Zählkammer bestimmt. Etwa 3000 Zellen wurden mit 8 µg

Plasmid-DNA mittels PEG-Transformation transformiert (Koop et al. 1996). Transformierte Protoplasten wurden über Nacht im Dunkeln inkubiert und am nächsten Tag im Laser Scanning Mikroskop analysiert.

2.6.4 Transformation von *Nicotiana benthamiana* und Protoplastenisolation

A. tumefaciens LBA1334, die mit GFP-Konstrukte transformiert worden waren, wurden über Nacht in LB-Medium (Bertani 1951) unter Kanamycin-Selektion bei 28° C vermehrt. Die Agrobakterien wurden für 15 Minuten bei 3000 g pelletiert und die Zellsuspension auf eine OD₆₀₀=1 mit Infiltrationsmedium (10mM MES-KOH pH 5,6, 10mM MgCl₂, 150µM Acetosyringon) eingestellt und danach 2 Stunden bei Raumtemperatur geschüttelt. Zellsuspensionen, die Konstrukte –GFP₁₋₁₀ enthielten, wurden eins zu eins mit solchen gemischt die –GFP₁₁ enthielten. Die Mischungen wurden in Blätter von 3 bis 4 Wochen altem Tabak (*Nicotiana benthamiana*) infiltriert. Die Expression der Proteine erfolgte für 36 Stunden im Lichtschrank. Aus den infiltrierten Blättern wurden nach der Methode von (Koop et al. 1996) Protoplasten isoliert. Wurde eine Lokalisation in den Mitochondrien vermutet, wurden die Protoplasten 30 Minuten mit Mitotracker® CMX Rox (125 nM) gefärbt. Das GFP-Signal wurde mit Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

2.6.5 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana* und GUS-Färbung

Arabidopsis thaliana (Col-0) wurden für 4-5 Wochen auf Erde angezogen. Nach dem Aufblühen wurden die Blüten nach der Methode von Clough und Bent (1998) durch „Floral Dip“ mit *Agrobacterium tumefaciens* GV3101::pMP90RK, die Promotor-Konstrukte enthielten, transformiert. Die gewonnen Samen wurden auf Kanamycin-Nährmediumplatten (50 mg/l Kanamycin) selektioniert. Die F2-Generation wurde mittels PCR auf ihren Genotyp untersucht. Die Färbung der Pflanzenteile erfolgte nach dem Protokoll von Jefferson et al. (1987) mit 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-glucuronsäure (X-Gluc) für 16-24 Stunden bei 37° C. Anschließend wurden die

Proben fünf Mal mit 70% Ethanol gewaschen und mit dem LeicaDM1000 Mikroskop analysiert.

2.6.6 Generierung der *afg11/afg12*-Mutante durch Kreuzung

Arabidopsis thaliana der Linien FLAG_145G06 und SALK_060950 wurden auf Erde kultiviert. Nach der Ausbildung von Knospen wurden bei fünf Pflanzen beider Linien schon aufgeblühte Blüten entfernt um Selbstung zu vermeiden. Dann wurden vorsichtig die Sepalen, Petalen und Antheren von den ungeöffneten Blüten entfernt. Präparierte Knospen wurden mit den Pollen der jeweils anderen Linie bestrichen. Die Pflanzen wurden bis zur Samenreife im Gewächshaus gehalten.

2.6.7 Hefe Anzucht und Split-Ubiquitin-Assay

Hefezellen wurden auf YPDA-Agarplatten vermehrt und nach dem DUALmembrane Kit Protokoll mittels LiPEG transformiert. Für den Split-Ubiquitin-Assay werden Hefezellen mit zwei Vektoren, von denen der eine für eine Hälfte (CUB) und der andere für die andere Hälfte (NUB) von Ubiquitin kodiert, transformiert. Wenn die beiden Ubiquitin-Teilstücke interagieren, wird ein Transkriptionsfaktor (TF) abgespalten und die Hefen können auf Mangelmedium wachsen. Transgene Hefen bekamen je nach Vektor die Möglichkeit verschiedene Aminosäuren zu bilden und wurden auf Fertigmedium der Firma Clontech ausplattiert. Je nach Konstrukt wurden die vom Hersteller angegeben Drop-out-Medien zur Selektion verwendet. Zuerst wurde nur ein Konstrukt transformiert, um auf Autoaktivierung zu testen. War die Transformation erfolgreich wuchsen transgene Hefen auf „single-drop-out“-Agarplatten. Zeigte das Konstrukt Autoaktivierung, konnte auch auf „double-drop-out“-Agarplatten Hefewachstum festgestellt werden. Diese Konstrukte sind nicht für den Assay geeignet. Sind alle Konstrukte überprüft werden NUB und CUB Konstrukte mittels LiPEG kotransformiert.

2.7 Biochemische Methoden

Proteine wurden mittels SDS-PAGE nach der Methode von Laemmli (1970) in Acrylamid-Gelen mit einem Gehalt von 8% oder 10% aufgetrennt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie-Färbelösung (20% Isopropanol, 20% Essigsäure, 0,3% Coomassie R, 0,06% Coomassie G) oder mit Silberfärbung (Blum et al. 1987) analysiert. Proteinmengen-Bestimmungen wurden mit dem *Coomassie Protein Assay* von Thermo Scientific (Deutschland) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.7.1 Chromatographische Methoden

2.7.1.1 Aufreinigung an Ni-NTA

Die Aufreinigung von rekombinantem, heterolog exprimiertem Protein mit His-TAG über Ni-NTA erfolgte nach dem Protokoll für native Proteinaufreinigung von Qiagen. Die Puffer wurden zum Erreichen einer größeren Stabilität der Proteine angepasst und enthielten 50 mM Tris HCl pH 8,0, 300 mM NaCl, 75 mM 6-Aminohexansäure und die von Qiagen angegebenen Mengen Imidazol. Dem Elutionspuffer wurde noch 10% Glycerin zugesetzt

2.7.1.2 Größenausschlusschromatographie

Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatographie-SEC) wurde mit dem Äkta-FPLC-System von GE Healthcare (Freiburg, Deutschland) durchgeführt. Zur Bestimmung der Retentionszeiten der Superdex 200 10/300 GL-Säule wurde das „Gel filtration calibration Kit HMW“ von GE Healthcare verwendet. Zur Bestimmung der Komplexgrößen wurde ein Puffer aus 50 mM Tris-HCl pH 7,8; 0 mM-300 mM NaCl und 75 mM 6-Aminohexansäure verwendet. Die Probengröße der Fraktionen betrug zwischen 0,25 ml und 0,5 ml. Vor einem Quervernetzungsversuch wurde ein Puffer aus 50 mM HEPES pH 7,5 mit 150 mM NaCl benutzt.

2.7.1.3 Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose

Pulldown-Experimente an Calmodulin-Agarose wurden nach der Methode von Wang et al. (2005) mit folgenden Modifikationen durchgeführt: 25 µl Säulenmaterial wurden mit 20 µg aufgereinigtem AFG1L2_m oder AFG1L1_m in Anwesenheit von 100 µM Ca²⁺ oder 5 mM EDTA für 90 Minuten unter gelegentlichem Schütteln auf Eis inkubiert. Die Calmodulin-Agarose wurde durch zentrifugieren bei 500 g für 2 Minuten gesammelt und dreimal mit 100 µl Waschpuffer (50 mM Tris HCl pH 7,8 mit oder ohne Kalzium) gewaschen. Gebundenes Protein wurde entweder mit 20 µM Calmodulin oder mit EDTA/EGTA (je 10 mM) in dreimal 30 µl eluiert. Die Proben wurden anschließend über SDS-PAGE mit Coomassie-Färbung ausgewertet.

2.7.1.4 Affinitätschromatographie an GFP-Trap oder IGG-Sepharose

Proteine aus Pflanzenmaterial wurden mit IGG-Sepharose oder GFP-Trap aufgereinigt. Das Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff zerkleinert und mit einem Puffer aus 100 mM Tris HCl pH 7,5, 100 mM NaCl, je 5 mM EDTA und EGTA, 10 mM NaF, 1 mM 2 Sulfanylethanol, 0,1 mM Na₃VO₄, 0,1% Triton-X100 und 10% Glycerin homogenisiert. Feste Bestandteile wurden für 30 Minuten bei 20.000 g von löslichen Zellbestandteilen getrennt. Der Überstand wurde durch Watte gefiltert um Schwebeteilchen zu entfernen, bevor er mit dem Säulenmaterial zusammengeführt wurde. Nach zwei Stunden bei 4° C unter leichtem Schütteln wurde das Säulenmaterial durch Zentrifugation nach Herstellerangaben gesammelt und so lange gewaschen bis es wieder seine Ursprungsfarbe hatte. Gebundene Proteine wurden durch Kochen mit Gelladepuffer eluiert und die Proben mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Proteinbanden wurden ausgeschnitten, entfärbt und anschließend massenspektroskopisch identifiziert (Zentrallabor für Proteinanalytik der LMU).

2.7.2 BN-PAGE

Die Auftrennung von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen erfolgte nach dem Protokoll von Schägger und von Jagow (1991). Es wurde ein linearer Acrylamid-Gradient von 6-14% verwendet. Die nativ gereinigten Proteine wurden mit 10-fach Beladungspuffer (750 mM 6-Aminohexansäure, 5% Coomassie-G) versetzt und sofort geladen. Die Auftrennung in der ersten Dimension erfolgte entweder bei 70V über Nacht oder bei 400V für etwa 5 Stunden. Nachdem etwa die Hälfte des Gels gelaufen war wurde der blaue Kathodenpuffer gegen einen Kathodenpuffer ohne Coomassie gewechselt. Die Gelspuren wurden ausgeschnitten, eine Stunde in Denaturierungspuffer (1 mM 2-Sulfanylethanol, 25 mM Tris, 200 mM Glycin, 1% SDS) inkubiert und danach mittels SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert.

2.7.3 Quervernetzungs-Versuche

Für die Quervernetzungs-Versuche wurde die Methode von Arazi et al. (1995) angewendet. Für einen 60 µl Ansatz wurden je 15 µg rekombinantes AFG1L2_m oder AFG1L1_m verwendet und mit 5 µg Rinderhirn-Calmodulin versetzt. Je nach den zu untersuchenden Bedingungen wurde Kalzium (100 µM), EDTA und EGTA (je 5 mM), Magnesium (5 mM) und/oder ATP zugemischt und für 45 Minuten auf Eis gestellt. Die Ansätze wurden dann halbiert, die eine Hälfte wurde als Kontrolle nur mit Puffer (15 mM HEPES-NaOH pH7,5) versetzt, die andere Hälfte mit dem 0Å Quervernetzungsgemisch aus EDC (2 mM Endkonzentration) und S-NHS (5 mM Endkonzentration). Nach einer weiteren Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur wurde die Reaktion mit SDS-Gelladepuffer gestoppt und die Proben mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung ausgewertet.

2.7.4 ATPase-Aktivitätsnachweis

2.7.4.1 Dünnschichtchromatographie

AFG1L2_m oder AFG1L1_m wurden mit 5 mM ATP für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 96° C für 2 Minuten gestoppt und für 10 Minuten bei 4° C und 16.000 g zentrifugiert. 2 µl vom Überstand werden auf die DC-Platte aufgetragen. Die Chromatographie wird über 4 Stunden in 3 M K₂HPO₄ laufen gelassen und über UV-Löschung detektiert. ADP legt eine kürzere Strecke als ATP zurück, so kann gezeigt werden ob ATP zu ADP hydrolysiert wurde

2.7.4.2 Luziferase-Assay

Gereinigtes Protein wurde mit 10 µM ATP in An- oder Abwesenheit von 5 mM Magnesium für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Reaktion wurde durch Erhitzen auf 96° C für 2 Minuten gestoppt und das verbleibende ATP im Überstand genau nach Herstellerangaben des ATP-Determination Kits nach Zugabe des Luziferase-Mix im Bertholdt Luminometer vermessen. Zur Mengenbestimmung wurde eine Kalibriergerade mit gemessen. Mit diesem Assay lässt sich die Menge des hydrolysierten ATP quantifizieren.

2.8 Computeranalysen

Zur *in silico*-Bestimmung der subzellulären Lokalisierung der untersuchten Proteine in verschiedene Zellorganelle wurden verschiedene Vorhersageprogramme verwendet (vgl. Tab. 2). Für Sequenzanalysen und Sequenzvergleiche wurde die MIPS-Datenbank (Spannagl et al. 2007), ARAMEMNON (Schwacke et al. 2003) und die Funktion des „National center of biotechnology information“ (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) verwendet. Alingments wurden mit ClustalX2

(Thompson et al. 1997) erstellt. Für *in silico* Genexpressionsanalysen wurde der GENEVESTIGATOR (Zimmermann et al. 2004) verwendet.

Tab. 2: Verwendete Programme zur Vorhersage der Lokalisierung in den Organellen

MitoprotII	Claros and Vincens 1996
Prowler	Boden and Hawkins 2005
Predotar	Small et al. 2004
PredSL	Petsalaki et al. 2006
SLP Local	Matsuda et al. 2005
TargetP	Emanuelsson et al. 2000; Nielsen et al. 1997
WoLF PSORT	Horton 2006

2.9 Fluoreszenzmikroskopie

Das Detektieren und die Analyse von Fluoreszenz-Signalen erfolgte mit dem konfokalem Laser Scanning Mikroskop TCS-SP5 von Leica (Wetzlar, Deutschland) die Auswertung wurde mit der Analysesoftware von Leica LAS AF Lite durchgeführt.

3. Ergebnisse

In Pflanzen wird ein großer Teil der intrazellulären Signale über Kalzium vermittelt (McAinsh and Pittman 2009). Es verdichten sich die Hinweise, dass die Kalziumsignale auch in Chloroplasten und Mitochondrien von Calmodulin oder Calmodulin-ähnlichen-Proteinen (engl. calmodulin-like proteins CML) vermittelt werden, da in diesen Organellen Calmodulin-bindende Proteine gefunden wurden. In Mitochondrien konnte inzwischen auch ein Calmodulin-ähnliches-Protein nachgewiesen werden (Chigri et al., 2011), die Identifizierung eines chloroplastidären Calmodulins oder Calmodulin-ähnlichen-Proteins steht jedoch noch aus (Chigri et al. 2011; DeFalco et al. 2010; Fuchs et al. 2011). AAA⁺-Proteine spielen in vielen verschiedenen zellulären Prozessen eine wichtige Rolle (Neuwald et al. 1999), was eine Einbindung in das Signal-Netzwerk der Zelle zur Kontrolle der Aktivität nahe legt. In einer früheren Arbeit wurde das AFG1-like Protein 1 (AFG1L1) als calmodulin-bindendes Protein aus *Arabidopsis thaliana* identifiziert (Bussemer et al. 2009). Das Protein gehört zur Gruppe der AAA⁺-Proteine und ist sowohl in Chloroplasten als auch in Mitochondrien lokalisiert. Durch eine Sequenzvergleich-Analyse wurde ein zweites AFG1-like Protein (AFG1L2) identifiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde AFG1L2 untersucht und charakterisiert.

3.1 Vergleichende Analyse von Proteindomänen in AFG1L2 und AFG1L1

Bei Analysen in der MIPS-Datenbank (Spannagl et al. 2007) wurde AFG1L2 als Homolog des AAA⁺-Proteins AFG1L1 identifiziert. Ein Sequenzvergleich zwischen den beiden Proteinen zeigt, dass AFG1L2 zu 79% dieselbe Proteinsequenz wie AFG1L1 besitzt. AFG1L2 besitzt außerdem die für AAA⁺-Proteine charakteristische Abfolge von α -Helices und β -Faltblättern. Alle charakteristischen Domänen wie das Walker A und Walker B-Motiv (Walker et al. 1982) sind vorhanden. Der sogenannte Sensor 1 mit den polaren Aminosäuren, die den Kontakt zum γ -Phosphat herstellen (Hanson and Whiteheart 2005; Karata et al. 1999) bildet mit den Arginin-Fingern die „second region

of homologie“ gefolgt vom Sensor 2, dessen Arginin vermutlich Bindungsenergie für das ATP zur Verfügung stellt (Ogura et al. 2004).

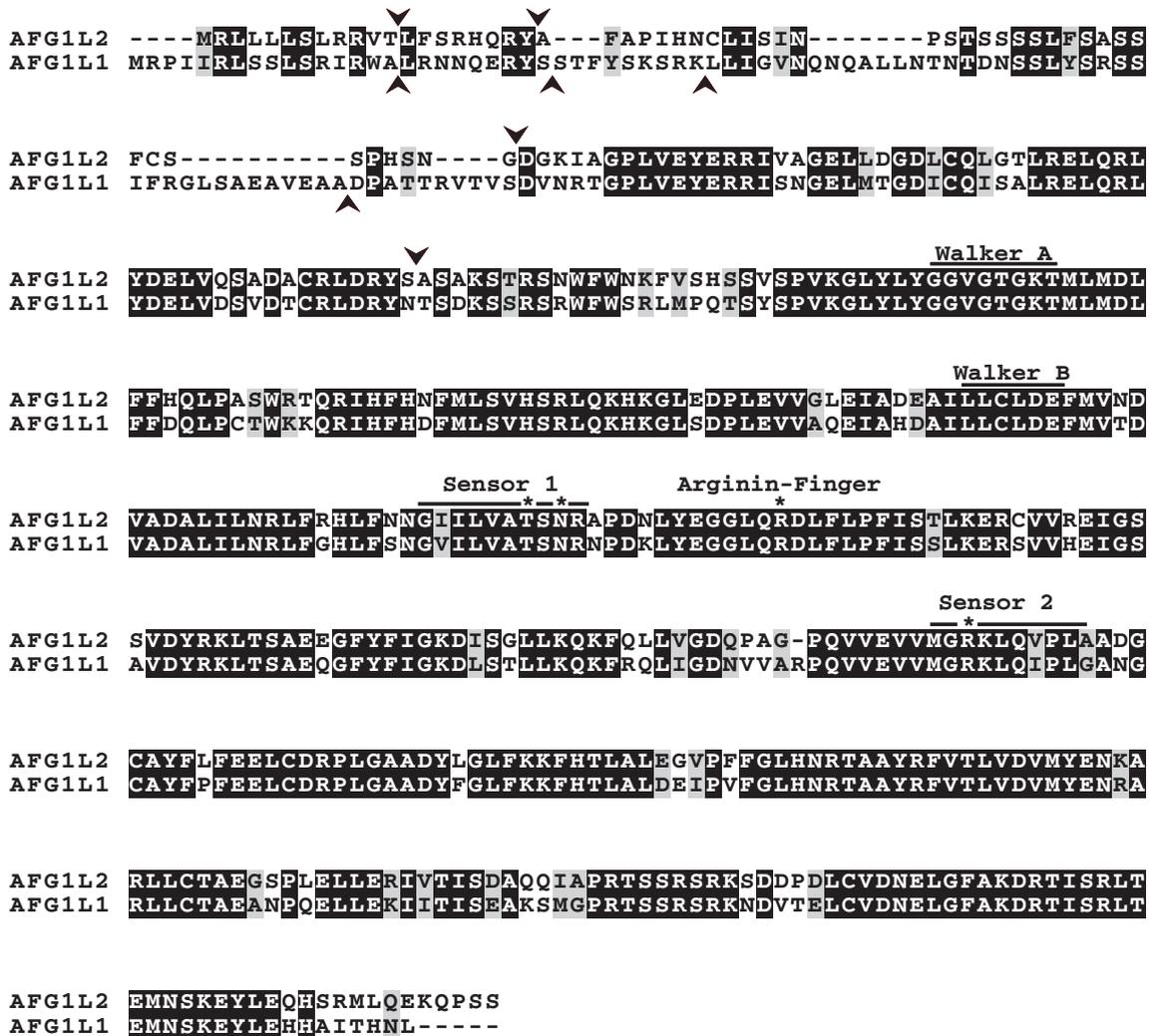


Abb. 1: Sequenzvergleich zwischen AFG1L2 und AFG1L1

Im hier gezeigten Sequenzvergleich ist die große Ähnlichkeit zwischen AFG1L2 und AFG1L1 zu erkennen. Schwarze Kästchen kennzeichnen identische, graue Kästchen chemisch ähnliche Aminosäuren. Für AAA⁺-Proteine charakteristische Motive sind eingezeichnet (Schwarzer Balken für Motive; *: die wichtigen Aminosäuren), Pfeile kennzeichnen durch verschiedene Vorhersageprogramme bestimmte Schnittstellen der Transitsequenz (Tab. 3).

Im Gegensatz dazu unterscheiden sich die beiden Proteine deutlich an ihrem N-Terminus, an dem sich bei Proteinen, die in Organelle gebracht werden, eine Transitsequenz befindet (Abb. 1). Dementsprechend unterscheiden sich auch die Ergebnisse für beide Proteine, wenn sie *in silico* mit Programmen analysiert werden, die eine subzelluläre Lokalisierung vorhersagen. Die unterschiedlichen Programme verwenden verschiedene Quellen zur Vorhersage der Lokalisierung. Während manche Vorhersageprogramme experimentell ermittelte Präsequenzen mit der angefragten Sequenz vergleichen benutzen andere bekannte Algorithmen über polare, unpolare und geladene Aminosäuren um eine Vorhersage zu treffen. Während danach AFG1L1 dual in Chloroplasten und Mitochondrien vorhanden ist, indizieren alle Vorhersage-Programme für AFG1L2 ausschließlich eine Lokalisierung in den Mitochondrien (Tab 3).

Tab. 3: Vorhersage der subzellulären Lokalisierung von AFG1L2 und AFG1L1

Es ist das zur Vorhersage benutzte Programm angegeben. Mito: Vorhersage für Lokalisierung in Mitochondrien; Chloro: Vorhersage für Lokalisierung in Chloroplasten; in Klammern die berechnete Länge der Transitsequenz, die nach erfolgtem Import abgespalten wird.

Vorhersageprogramm	AFG1L2	AFG1L1
MitoprotII (Claros and Vincens 1996)	Mito (12)	Mito (73)
PProwler (Boden and Hawkins 2005)	Mito	Mito
Predotar (Small et al. 2004)	Mito	Mito
PredSL (Petsalaki et al. 2006)	Mito (20)	Mito (34)
SLP Local (Matsuda et al. 2005)	Mito	Chloro/Mito
TargetP (Emanuelsson et al. 2000; Nielsen et al.	Mito (109)	Mito/Chloro
WoLF PSORT (Horton P 2006)	Mito	Mito/Chloro
PrediSi (Hiller et al. 2004)	(55)	(16)

Während die *in silico* Ergebnisse über die Lokalisierung von AFG1L1 bereits *in vitro* experimentell bestätigt wurden (Bussemer et al 2009), ist die Frage über die Länge des Transitpeptides noch offen. Für AFG1L2 ist weder die *in vivo* Lokalisierung noch die Länge des Transitsequenz bekannt. Auch sind sich die unterschiedlichen Vorhersageprogramme nicht über die Länge der Transitsequenz einig. Die Prognosen reichen von einigen wenigen bis hin zu über 100 Aminosäuren (Tab. 3).

3.2 Lokalisierungsstudien

In vitro Import Untersuchungen haben gezeigt, dass AFG1L1 ein dual in Mitochondrien und Chloroplasten lokalisiertes AAA⁺-Protein ist (Bussemer et al. 2009). Dies entspricht auch den Vorhersagen für AFG1L1 durch verschiedene Programme, während AFG1L2 von den Vorhersageprogrammen ausschließlich in die Mitochondrien sortiert wird. Mittels verschiedener Fluoreszenz-Techniken sollte daher die Lokalisierung beider Proteine *in vivo* weiter untersucht werden.

3.2.1 Transiente Transformation von GFP-Fusionsproteinen

In einem ersten Ansatz wurden einerseits die N-Terminale Sequenzen von AFG1L1 und AFG1L2 und andererseits die vollständige Proteinsequenz N-Terminal vor die Sequenz des grün-fluoreszierenden Proteins (GFP) fusioniert. Die Länge der N-Terminale Stücke wurde aus den vorhergegangenen *in vitro*-Importexperimenten abgeschätzt. Um die Konstrukte pOL-AFG1L2_{VL}::GFP, pOL-AFG1L2_{Prä}::GFP, pOL-AFG1L1_{VL}::GFP und pOL-AFG1L1_{Prä}::GFP transient in Protoplasten zu exprimieren wurden sie in Blattmesophyll-Protoplasten von *Arabidopsis thaliana* bzw. *Brassica rapa* transformiert. Bei den Volllängen-Konstrukten (VL) wird das ganze Protein zusammen mit dem GFP exprimiert, bei den die Präsequenz enthaltenden Konstrukten (Prä) wurden im Fall von AFG1L2 die ersten 87 Aminosäuren und im Fall von AFG1L1 die ersten 84 Aminosäuren an das GFP fusioniert. Dadurch sollten die Proteine in das richtige Kompartiment transloziert werden und so Aufschluss über die *in vivo*

Lokalisierung geben. Transformierte Protoplasten aus *Arabidopsis* zeigten mit keinem der vier Konstrukte ein GFP-Signal, obwohl derselbe Vektor schon in früheren Arbeiten mit anderen Proteinen für die erfolgreiche Transformation von *Arabidopsis* Protoplasten benutzt worden war. Im Gegensatz dazu konnte in transformierten Protoplasten aus *Brassica* zumindest mit den Präsequenz-Konstrukten ein Signal beobachtet werden. Dieses Signal war in beiden Fällen exklusiv in den Mitochondrien zu beobachten, wie die Überlagerung mit der Fluoreszenz des Mitotracker[®] CMX Ros, einem Fluoreszenzfarbstoffs zur Anfärbung von Mitochondrien, zeigt (Abb. 2). Dies entspricht der Vorhersage für AFG1L2, die Fluoreszenz von AFG1L1_{Prä}-GFP wurde jedoch ebenfalls in den Chloroplasten erwartet. Leider ergaben die Vollängen-Konstrukte auch in *Brassica rapa* kein GFP-Signal, so dass nicht ausgeschlossen werden kann, dass eine falsche Länge der Präsequenz für die ausbleibende Chloroplasten-Lokalisierung von AFG1L1_{Prä}-GFP verantwortlich ist.

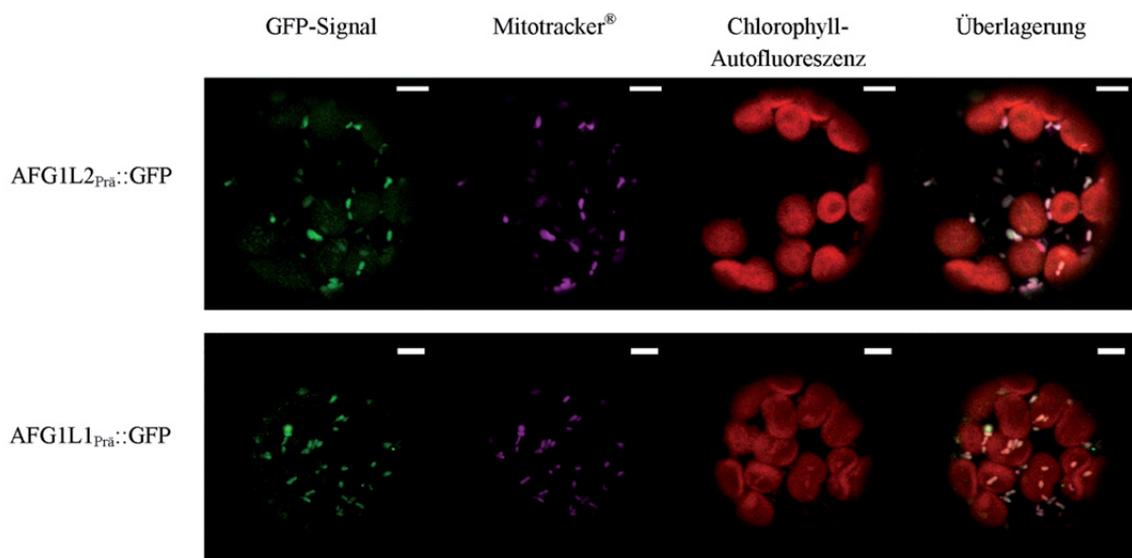


Abb. 2: Fluoreszenzanalyse nach Transformation von Brassica Protoplasten mit pOL-AFG1L2_{Prä}::GFP und pOL-AFG1L1_{Prä}::GFP

Protoplasten von *Brassica rapa* wurden mit AFG1L2_{Prä}::GFP und AFG1L1_{Prä}::GFP, GFP-Fusionskonstrukten, transformiert und nach 48 Stunden im Laser Scanning Mikroskop untersucht. Das GFP-Signal beider Proteine überlappt sich mit dem Signal des Mitotracker[®], was auf eine Lokalisierung beider Proteine in Mitochondrien hinweist. Die Größe der weißen Balken entspricht 15 µm.

3.2.2 Analysen zur Lokalisation mittels „self-assembling“ GFP

Es ist bekannt, dass ein GFP-Tag zu Fehllokalisationen und/oder falsch gefalteten Proteinen führen kann, die dann eventuell gar kein Signal geben, (Waldo et al. 1999). Um dieses Problem zu umgehen, wurde von Cabantous et al. (2005) das self-assembling-GFP-System (saGFP) entwickelt. Dabei wird die Sequenz für das GFP-Protein aufgeteilt, in ein großes Stück, welches für die β -Faltblätter 1-10 (GFP₁₋₁₀) kodiert und ein kurzes Stück, das für das elfte Faltblatt (GFP₁₁) kodiert. Die beiden Teile sind auf verschiedenen Vektoren kodiert und können so getrennt mit verschiedenen Proteinen fusioniert werden. Werden die beiden GFP-Teilstücke gleichzeitig in Zellen exprimiert und kommen in räumliche Nähe, formt sich das GFP-Protein und es kommt zum Signal. Dabei ist ausschließlich räumliche Nähe und keine Interaktion der Fusionsproteine notwendig. Der Vorteil ist nun, dass der kurze Teil des GFP-Proteins die Struktur des zu untersuchenden Proteins nicht so stark oder gar nicht stört. Durch Fusion des langen Teilstücks (GFP₁₋₁₀) mit Proteinen oder Transitsequenzen, deren Lokalisierung bekannt ist, können diese als Marker-Proteine bei der Zuordnung zu verschiedenen Kompartimenten verwendet werden.

In diesen Untersuchungen wurde die GFP₁₁ Sequenz C-Terminal an AFG1L1 und AFG1L2 fusioniert. Dazu wurden die Präsequenz der NADPH abhängigen Thioredoxinreductase C (TrxR) zur Lokalisierung in Chloroplasten oder die Präsequenz der 2-Oxoglutaratdehydrogenase E1 (OGD E1) für die Lokalisierung in Mitochondrien C-terminal an GFP₁₋₁₀ kloniert. Alle Konstrukte wurden in Agrobakterien transformiert und die Blätter von *Nicotiana benthamiana* wurden mit einer Mischung aus Agrobakterien, die einerseits mit einem GFP₁₋₁₀-Konstrukt und andererseits mit einem GFP₁₁-Konstrukt transformiert worden waren, infiltriert. Nach 36 Stunden wurden aus den Blättern Protoplasten isoliert. Sollte die Lokalisierung in Mitochondrien untersucht werden, wurden die Zellen zusätzlich mit Mitotracker[®] CMX Ros gefärbt. Die Fluoreszenzsignale der Protoplasten wurden anschließend im Laser-Scanning-Mikroskop analysiert.

Als Positivkontrolle wurden OGD E1::GFP₁₋₁₀ mit OGD E1::GFP₁₁ bzw. TrxR::GFP₁₋₁₀ mit TrxR::GFP₁₁ infiltriert. In Abb. 3, dritte Zeile ist die korrekte Lokalisierung für

OGD E1 in Mitochondrien gezeigt. Die Lokalisierung der TrxR in Chloroplasten sieht man in Abb. 4, zweite Zeile. Es blieb zu belegen dass TrxR und OGDH E1 ausschließlich in Chloroplasten bzw. Mitochondrien translozieren, und dass keine Fluoreszenz außerhalb dieser Kompartimente auftritt. Dazu wurden OGD E1::GFP₁₋₁₀ mit TrxR::GFP₁₁ und OGD E1::GFP₁₁ zusammen mit TrxR::GFP₁₋₁₀ infiltriert. In den Zeilen vier und fünf der Abb. 4 ist kein GFP-Signal zu erkennen, d.h. TrxR und OGDH E1 werden ausschließlich und quantitativ in ihre vorhergesagten Kompartimente gebracht und sind somit zur Bestimmung der Lokalisation geeignet. Wurde nun AFG1L2_{vi}::GFP₁₁ zusammen mit OGD E1::GFP₁₋₁₀ exprimiert, dann gab es ein Signal (Abb. 3 erste Zeile), das auch mit dem Signal des Mitotracker[®] CMX ROS überlappt. Zusammen mit TrxR::GFP₁₋₁₀ ließ sich jedoch keine GFP-Fluoreszenz detektieren (Abb. 4 3.Zeile). Das bestätigt die *in silico* Vorhersage und auch das Ergebnis aus der transienten Transformation der Protoplasten mit dem Konstrukt aus N-terminaler Sequenz und GFP, dass AFG1L2 *in vivo* ausschließlich in Mitochondrien lokalisiert ist. Im Vergleich dazu, gab AFG1L1_{vi}::GFP₁₁ ein Signal sowohl mit TrxR::GFP₁₋₁₀ in den Chloroplasten (Abb. 4 erste Zeile) als auch mit OGD E1::GFP₁₋₁₀ in Mitochondrien (Abb3 zweite Zeile). Das bestätigt die *in vitro* Import-Daten für duale Lokalisierung von AFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien auch *in vivo*.

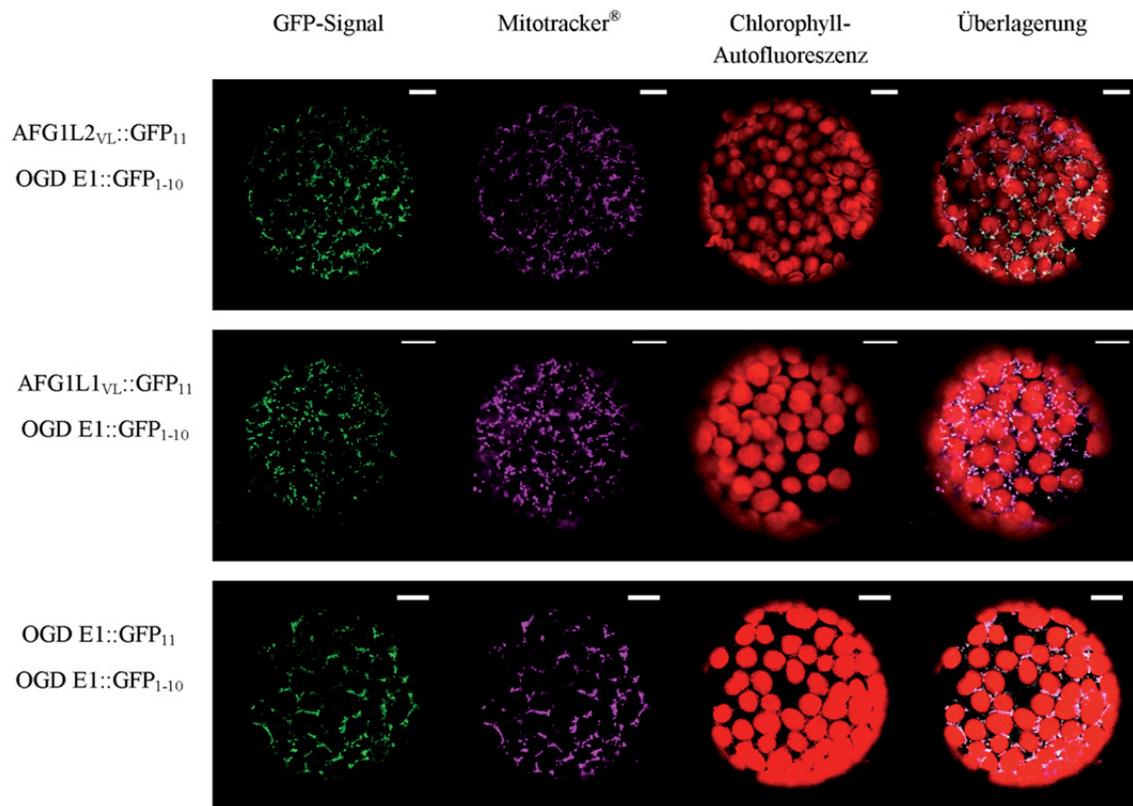


Abb. 3: Transiente Expression verschiedener saGFP-Fusionskonstrukte und deren Lokalisierung in den Mitochondrien

Blätter von *Nicotiana benthamiana* wurden mit den verschiedenen saGFP-Konstrukten infiltriert. Nach 36 Stunden Inkubation wurden Protoplasten isoliert und mit Mitotracker[®] gefärbt. Erste Spalte: GFP-Signal, tritt nur auf wenn sich die beiden an die GFP-Teilstücke fusionierten Proteine im selben Kompartiment befinden. Zweite Spalte: Mitotracker[®] Signal. Dritte Spalte: Autofluoreszenz des Chlorophylls. Vierte Spalte: Überlagerung. Der Balken entspricht 10 μ m.

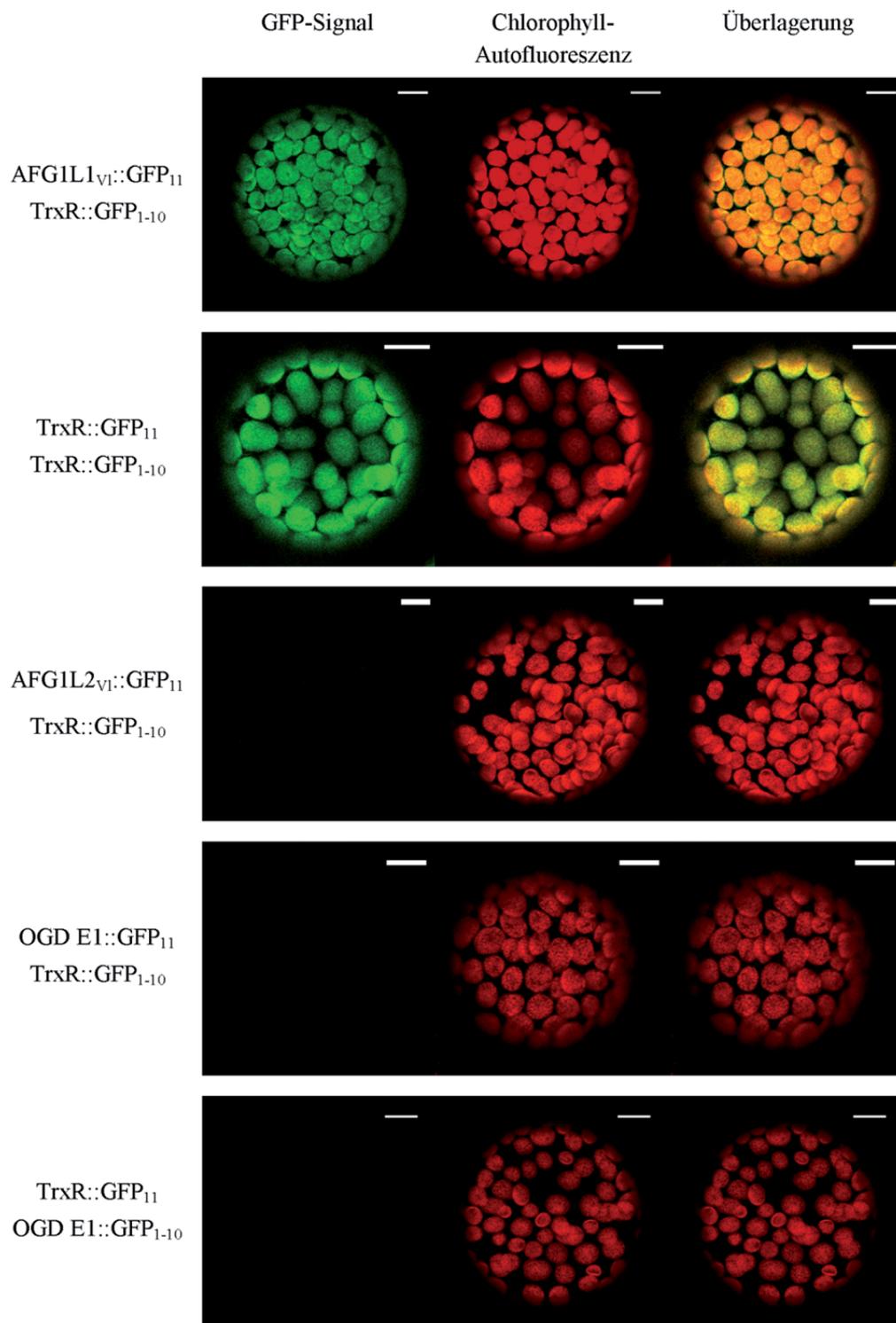


Abb. 4: Transiente Expression verschiedener GFP-Fusionskonstrukte und deren Lokalisierung in den Chloroplasten

Blätter von *Nicotiana benthamiana* wurden wie bei Abb. 3 beschrieben infiltriert und Protoplasten isoliert. Erste Spalte: Signal des vereinigten GFP-Moleküls, Zweite Spalte: Chlorophyll-Autofluoreszenz und die letzte Spalte die Überlagerung der Signale. Der Balken entspricht 10µm.

3.2.3 Identifizierung der Transitsequenzen von AFG1L2 und AFG1L1

In vitro Import-Versuche haben gezeigt, dass AFG1L1 mittels eines abspaltbaren Transitpeptids in die Organellen transportiert wird (Bussemer et al. 2009). Dies bestätigten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten transienten Transformationen in Protoplasten von Pflanzen, die zeigten, dass die Aminosäuren 1-84 reichen, um das Protein in die Mitochondrien zu transportieren. Ob diese Länge für den Import in die Chloroplasten ausreichend ist, konnte jedoch nicht bestätigt werden. Diese Versuche zeigten ebenfalls, dass die Aminosäuren 1-87 von AFG1L2 für den Import in die Mitochondrien ausreichend sind. Allerdings ist die tatsächliche Länge der Transitsequenz nicht bekannt. Die unterschiedlichen Vorhersageprogramme finden keinen Konsens bei den Prognosen über die Länge der Transitsequenz und schätzen Sequenzen von einigen wenigen bis hin zu über 100 Aminosäuren ab (Tab. 3). Es sollte daher versucht werden, diese Frage durch massenspektrometrische Analyse maturer Proteine zu klären. Im Falle von AFG1L1 wurde das Konstrukt AFG1L1_{VI}::GFP₁₋₁₀ verwendet, um es anhand seines GFP-Tags aus *Nicotiana benthamiana* aufzureinigen. AFG1L2 hingegen wurde als Fusionsprotein an Protein A mittels IGG-Sepharose aus Pflanzenmaterial aufgereinigt. Die Proteine wurden transient in Mesophyllzellen exprimiert und anschließend säulenchromatographisch entsprechend ihres Tags aufgereinigt. Da die Experimente mit saGFP gezeigt hatten, dass sie korrekt in die entsprechenden Organellen transportiert werden, sollten die Proteine dort in ihrer maturen, prozessierten Form vorliegen.

Tatsächlich konnte sowohl im Falle von AFG1L1 als auch AFG1L2 jeweils ein Protein korrekter Größe im Eluat der Säulenaufreinigung gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Diese Proteine wurden anschließend massenspektrometrisch analysiert. Die gefundenen Peptide sollten zum prozessierten Protein gehören, wodurch gewisse Rückschlüsse auf die die Länge der Transitsequenz gemacht werden können. Von AFG1L2 konnten eine Reihe Peptide gefunden werden, welche große Teile der Sequenz ab Aminosäure 58 abdecken (Abb. 5 oben). Dieses Ergebnis deckt sich mit der Vorhersage der Transitsequenz durch das PrediSi-Programm (Hiller et al. 2004), außerdem beginnt dort die Homologie zwischen AFG1L2 und AFG1L1 (Abb. 1). Bei

der Sequenzierung von AFG1L1 wurden Peptide bereits ab der 22-ten Aminosäure gefunden (Abb. 5 unten). Dies legt nahe, dass AFG1L1 eine deutlich kürzere Transitsequenz hat als durch die Ergebnisse der *in vitro* Import-Versuche vermutet wurde.

AFG1L2 Proteinsequenz

```

1  MRLLLLSLRR  VTLFSRHQRY  AFAPIHNCLI  SINPSTSSSS  LFSASSFCSS
51  PHSNGDGKIA  GPLVEYERRI  VAGELLDGDL  CQLGTLRELQ  RLYDELVQSA
101 DACRLDRYSA  SAKSTRSNWF  WNKFVSHSSV  SPVKGLYLYG  GVGTGKTMML
151 DLFFHQLPAS  WRTQRIHFHN  FMLSVHSRLQ  KHKGLEDPLE  VVGLEIADEA
201 ILLCLDEFMV  NDVADALILN  RLFRLHFNNG  IILVATSNRA  PDNLYEGGLQ
251 RDLFLPFIST  LKERCVVREI  GSSVDYRKLT  SAEEGFYFIG  KDISGLLKQK
301 FQLLVGDQPA  GPQVVEVVMG  RKLQVPLAAD  GCAYFLFEEL  CDRPLGAADY
351 LGLFKKFHTL  ALEGVPFFGL  HNRTAAYRFV  TLVDVMYENK  ARLLCTAEGS
401 PLELLERIVT  ISDAQQIAPR  TSSRSRKSDD  PDLCVDNELG  FAKDRTISRL
451 TEMNSKEYLE  QHSRMLQEKQ  PSS

```

AFG1L1 Proteinsequenz

```

1  MRPIIRLSSL  SRIRWALRNN  QERYSSTFYS  KSRKLLIGVN  QNQALLNTNT
51  DNSSLYSRSS  IFRGLSAEAV  EAADPATTRV  TVSDVNRTGP  LVEYERRISN
101 GELMTGDICQ  ISALRELQRL  YDELVDSVDT  CRLDRYNTSD  KSSRSRWFWS
151 RLMPQTSYSP  VKGLYLYGGV  GTGKTMLMDL  FFDQLPCTWK  KQRIHFHDFM
201 LSVHSRLQKH  KGLSDPLEVV  AQEIAHDAIL  LCLDEFMVD  VADALILNRL
251 FGHLFSNGVI  LVATSNRNPD  KLYEGGLQRD  LFLPFISSLK  ERSVVHEIGS
301 AVDYRKLTSA  EQGFYFIGKD  LSTLLKQKFR  QLIGDNVVAR  PQVVEVMGR
351 KLQIPLGANG  CAYFPFEELC  DRPLGAADYF  GLFKKFHTLA  LDEIPVFGLH
401 NRTAAYRFVT  LVDVMYENRA  RLLCTAEANP  QELLEKIITI  SEAKSMGPRT
451 SRSRKNDVT  ELCVDNELGF  AKDRTISRLT  EMNSKEYLEH  HAITHNL

```

Abb. 5: MS-Analyse von aus Tabak aufgereinigtem rekombinanten AFG1L1 und AFG1L2

Die sequenzierten Peptide sind in Rot dargestellt. Für AFG1L2 ist die für die Klonierung angenommene Länge der Präsequenz ist unterstrichen, für AFG1L1 die durch Import-Experimente bestimmte Länge der Präsequenz.

Bei der Aufreinigung von AFG1L1 mit Hilfe des GFP-Tags fiel eine Bande bei ca. 60kDa auf, die in einer Kontrolle mit TrxR::GFP₁₋₁₀ nicht vorhanden war (Abb. 6). Diese Bande wurde ebenfalls massenspektrometrisch analysiert. Das Genom von

Nicotiana benthamiana ist noch nicht vollständig annotiert, es waren jedoch mit Hilfe von „Sequence Blasts“ Sequenzen in *Nicotiana benthamiana* und zu *Arabidopsis thaliana* zu identifizieren, welche den gefundenen Massen entsprachen. Nach der Auswertung durch Sequenzvergleiche auch mit *Arabidopsis thaliana* konnte mit hoher Wahrscheinlichkeit geschlossen werden, dass es hierbei um ein Mitglied der Proteingruppe der Chaperonin 60-Proteine aus den Chloroplasten handelt. Dazu würde auch gut die Größe von etwa 60 kDa passen. Dieses Ergebnis unterstützt ebenfalls, dass zumindest ein Teil von AFG1L1 in die Chloroplasten und Mitochondrien transloziert wurde.

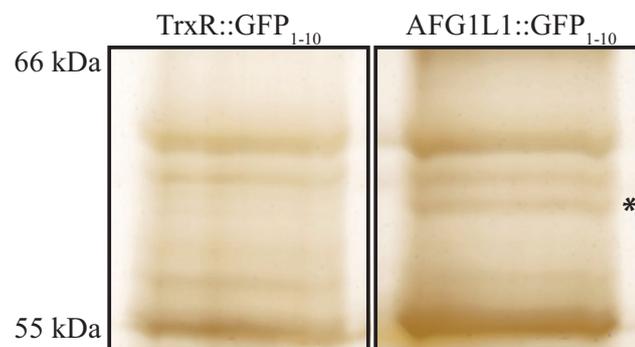


Abb. 6: Aufreinigung an GFP-Trap-Agarose

AFG1L1 (AFG1L1::GFP₁₋₁₀) wurde mit Hilfe des GFP-Tags aus *N. benthamiana* aufgereinigt. Dabei wurde ein weiteres Protein (*) mit aufgereinigt, das in der Kontrolle (TrxR::GFP₁₋₁₀) nicht zu sehen ist.

3.3 Expression von löslichem AFG1L2 und AFG1L1

Eine mögliche Methode die Struktur und Funktion von Protein zu analysieren, ist die Untersuchung von rekombinant in *E.coli* exprimierten Protein-Variationen (Sambrook and Russell 2001). Bei der Auswahl der zu klonierenden Sequenz ist es bei mitochondriell oder chloroplastidär lokalisierten Proteinen wichtig das Transitpeptid zu entfernen, da dieses die Faltung des exprimierten Proteins verhindern kann. Des Weiteren beeinflusst die Lokalisierung des Hexahistidin-Tags (His-Tag) N- oder

C-terminal zum Protein oft die Proteinfaltung und kann damit ausschlaggebend für eine Expression als lösliches Protein oder als unlösliches Aggregat in Einschluss-Körperchen sein. Die lösliche Expression von AFG1L2 und AFG1L1 bereitete dabei einige Schwierigkeiten. Alle Fusionsvarianten mit C-terminalem His-Tag wurden als unlösliche Aggregate in Einschluss-Körperchen synthetisiert. Es wurde trotzdem versucht diese Proteine denaturierend zu reinigen um sie dann durch Dialyse oder andere Methoden in einen nativen Zustand zu bringen. Dies zeigte jedoch keinen Erfolg. Um auszuschließen dass eine unzureichende Faltung, aufgrund von N-terminal falsch deduzierter Transitsequenzen stattfindet, wurden auch verschiedene N-terminal verkürzte Konstrukte kloniert, die ebenfalls als unlösliche Aggregate exprimierten (Daten nicht gezeigt). Darum wurden, basierend auf den Untersuchungen in 3.2.3, das Konstrukt AFG1L2_m, von Aminosäure 55 bis 473, in den pColdII-Vector von Takara kloniert. Das exprimierte Protein erhält so einen N-Terminalem His-Tag. Der pCold-Vector codiert zusätzlich für ein Cold-Shock-Protein, das bei der Proteinfaltung hilft. Die Expression von AFG1L2_m in diesem Vektor erfolgt daher bei 16° C für 24 Stunden. Nach der Expression in *E.coli* BL21 codon plus (DE3)-RIPL Zellen war es tatsächlich möglich lösliches Protein an Ni-NTA aufzureinigen (Abb. 7). Die Variante AFG1L2_{Δ113-133} wurde analog zu dem Konstrukt AFG1L1_{Δ141-161} aus Bussemer et. al. (2009) als Konstrukt mit deletierter Calmodulin-Bindedomäne exprimiert.

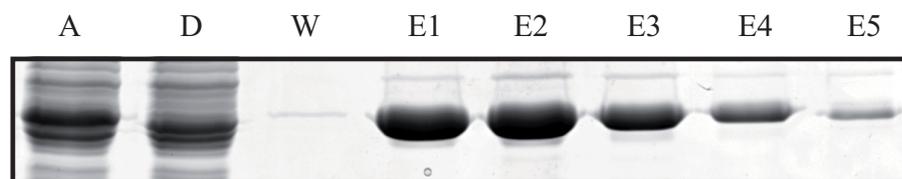


Abb. 7: Native Aufreinigung von AFG1L2_m an Ni-NTA-Agarose

Aufreinigung von heterolog exprimiertem AFG1L2_m an Ni-NTA-Agarose. Proteine der verschiedenen Säulenfraktionen wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Coomassie angefärbt. A: Auftrag, D: Durchlauf, W: Waschen, E1-E5: Eluate 1 bis 5

Die in Bussemer et al. (2009) beschriebenen Versuche zur Interaktion von AFG1L1 und Calmodulin wurden mit unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigtem AFG1L1 in 4 M Harnstoff durchgeführt. Um vergleichende Versuche zwischen AFG1L2 und AFG1L1 unter nativen Bedingungen vorzunehmen, wurde auch AFG1L1_m ab Aminosäure 84 in den pCold-Vektor umkloniert, da ab dort die beiden Sequenzen von AFG1L2 und AFG1L1 sehr ähnlich sind. Mit der Expression bei 16° C wurde auch die Synthese von löslichem Protein erreicht. Dieses degradierte jedoch innerhalb weniger Stunden nach der Aufreinigung über Ni-NTA. Auch das lösliche AFG1L2 war im aufgereinigten Zustand sehr instabil und wurde schnell degradiert.

Durch die Zugabe von 6-Aminohexansäure in die Aufreinigungspuffer konnte die Stabilität aller Varianten deutlich erhöht werden. Dadurch wurde es möglich, ausreichend stabiles, lösliches Protein zu exprimieren und somit die Eigenschaften der beiden AAA⁺-Proteine unter nativen Bedingungen genauer zu untersuchen. Für Quervernetzungsversuche wurden die Proteine zusätzlich über eine Superdex 200 10/300 GL Säule aufgereinigt. Dadurch wurden die Proteine in HEPES-Puffer überführt, um so Imidazol, 6-Aminohexansäure und Tris zu entfernen, die wegen ihren primären Aminogruppen ebenfalls mit dem Quervernetzungsreagenz reagieren würden. Darüber hinaus konnten leichte Verunreinigungen von Proteinen, die aufgrund ihrer Eigenschaften ebenfalls an Ni-NTA binden, zum größten Teil entfernt werden.

3.4 Interaktionsstudien mit Calmodulin

AFG1L1 wurde als calmodulin-bindendes Protein identifiziert. Daher sollte untersucht werden, ob AFG1L2 diese Eigenschaft ebenfalls besitzt. Außerdem sollte analysiert werden ob sich Calmodulin und ATP gegenseitig bei der Bindung an AFG1L2 beeinflussen.

3.4.1 Affinitätschromatographie an Calmodulin-Agarose

Eine anerkannte Methode die Interaktion von Proteinen mit Calmodulin zu testen ist der „Calmodulin-Pulldown-Assay“ nach der Methode von Wang et al. (2005) In Anwesenheit von Kalzium (CaCl_2) bzw. Abwesenheit von Kalzium (EDTA) wurden AFG1L2_m und AFG1L2 $_{\Delta 113-133}$ mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Nach Entfernen von nicht-gebundenem Proteinen, wurden gebundene Proteine mit EDTA/EGTA von der Matrix eluiert und die Fraktionen über SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert. Wurde die Inkubation in Anwesenheit von Kalzium durchgeführt, konnte AFG1L2_m an die Säulenmatrix binden und anschließend mit EDTA eluiert werden. (Abb. 8 A, Spur 1). In Abwesenheit von Kalzium (EDTA) war keine Anbindung von AFG1L2_m zu beobachten (Abb. 8, Spur 2). Um zu beweisen, dass AFG1L2_m spezifisch an Calmodulin bindet, wurde der Versuch unter denselben Bedingungen wiederholt, die Elution jedoch mit einem Überschuss an Rinderhirn-Calmodulin durchgeführt (Abb. 8 B). Auch unter diesen Umständen konnte AFG1L2_m von der Säule eluiert werden, was zeigt, dass das Protein kalziumabhängig und spezifisch an Calmodulin bindet. In weiteren Versuchen konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass AFG1L2 die Calmodulin-Bindedomäne an der gleichen Stelle wie AFG1L1 besitzt (Abb. 8 A, Spur 3), da die Deletionsmutante AFG1L2 $_{\Delta 113-133}$ nicht mehr an die Calmodulin-Agarose binden kann. Das untermauert, dass die Bindung zwischen AFG1L2 und Calmodulin spezifisch ist, da sie einer individuellen Domäne zugeordnet werden kann.

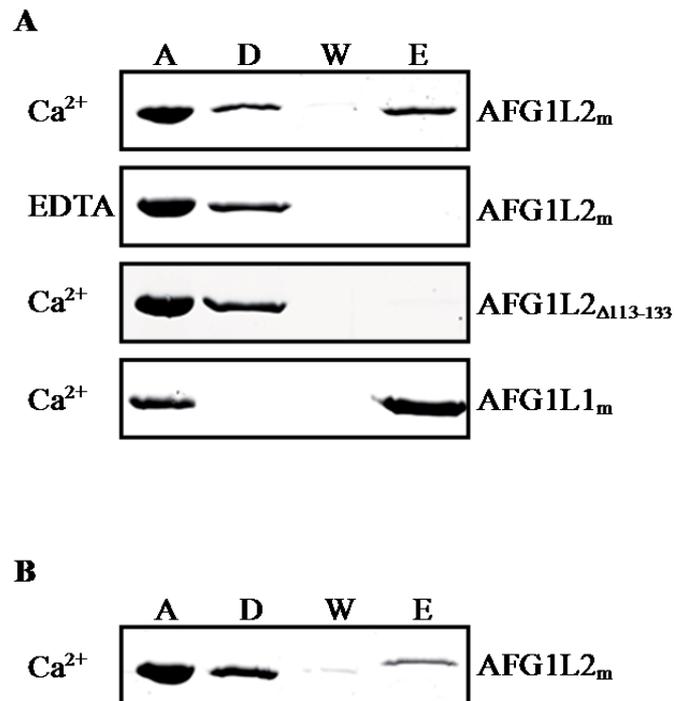


Abb. 8: Pulldown-Assay von AFG1L2 an Calmodulin-Agarose

A: Rekombinantes AFG1L2_m, AFG1L2_{Δ113-133} und AFG1L1_m wurden in Anwesenheit von Kalzium (Ca²⁺) oder in Abwesenheit von Kalzium (EDTA) mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Nach dem Waschen wurde mit EDTA eluiert. B: Rekombinantes AFG1L2_m wurde in Anwesenheit von Kalzium (Ca²⁺) mit Calmodulin-Agarose inkubiert. Elution mit einem Überschuss an Calmodulin. A: Auftrag, D: Durchlauf, W: Waschen, E: Elution

Der Versuch wurde vergleichend auch mit löslich expremierten AFG1L1_m durchgeführt. Dies diente zum einen als Positivkontrolle und zum anderen sollte so bestätigt werden, dass die von Bussermer et al. (2009) beschriebene Bindung von AFG1L1_m an Calmodulin-Agarose kein Artefakt der denaturierenden Pufferbedingungen war. Wie im Falle von AFG1L2 konnte auch AFG1L1 unter nativen Bedingungen kalzium-abhängig an Calmodulin-Agarose binden (Abb. 8, Spur 4) und anschließend mit EDTA von der Säule eluiert werden.

3.4.2 Quervernetzungsversuche

Bei Quervernetzungsversuchen werden zwei Proteine durch einen chemischen Linker kovalent miteinander verbunden, wenn sie in enger räumlicher Nähe zueinander vorliegen. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die zwei Proteine möglicherweise miteinander interagieren. Die erfolgreiche Quervernetzung zeigt sich in Analysen mittels SDS-PAGE anhand eines höheren Molekulargewichts, entsprechend dem additiven Molekulargewichts der Einzelproteine (Hemaprabha 2012). Die Quervernetzung wird durch reaktive, chemische Agenzien wie z.B. EDC/S-NHS erreicht, welches kovalente Bindungen zwischen Carboxyl- und Amingruppen ausbildet (Staros et al. 1986).

3.4.2.1 Kalziumabhängige Quervernetzung von AFG1L2 und Calmodulin

Quervernetzung ist eine andere Möglichkeit, um kalziumabhängige Interaktion von AFG1L2 mit Calmodulin zu überprüfen. Rekombinantes AFG1L2_m und AFG1L2_{Δ113-133} wurde über Ni-NTA und anschließend durch Gelfiltration gereinigt, um so Imidazol und 6-Aminohexansäure zu entfernen. Die Proteine wurden daraufhin mit Rinderhirn-Calmodulin in An- oder Abwesenheit von Kalzium inkubiert. Erst danach wurden die Versuchsansätze in den Kontrollansatz, der unbehandelt blieb, und den Testansatz, der mit Quervernetzungsreagenz versetzt wurde, aufgeteilt. Nach einer weiteren Inkubationszeit wurde die Reaktion mit SDS-Gelladepuffer gestoppt und die Reaktionen mittels SDS-PAGE und anschließender Silberfärbung ausgewertet. In allen Reaktionen ist eine dem monomeren AFG1L2 entsprechende Bande bei etwa 48 kDa zu sehen. Im Falle von AFG1L2_m war in der mit Kalzium und EDC/S-NHS versetzten Probe eine neue Bande bei etwa 65 kDa zu erkennen, welches gut auf die Größe eines Quervernetzungsprodukts aus AFG1L2 und dem ca. 16 kDa großen Calmodulin passt (Abb. 9 oben). Sowohl in der Abwesenheit von Kalzium als auch des Quervernetzers fehlt diese Bande (Abb. 9 oben), was nahe legt, dass AFG1L2_m kalziumabhängig mit Calmodulin interagiert. AFG1L2_{Δ113-133} ließ sich weder in Anwesenheit noch in Abwesenheit von Kalzium mit Calmodulin quervernetzen (Abb. 9 unten), was weiter

untermauert, dass AFG1L2 seine Calmodulin-Bindedomäne zwischen den Aminosäuren 113-133, also an entsprechender Stelle zu AFG1L1, besitzt.

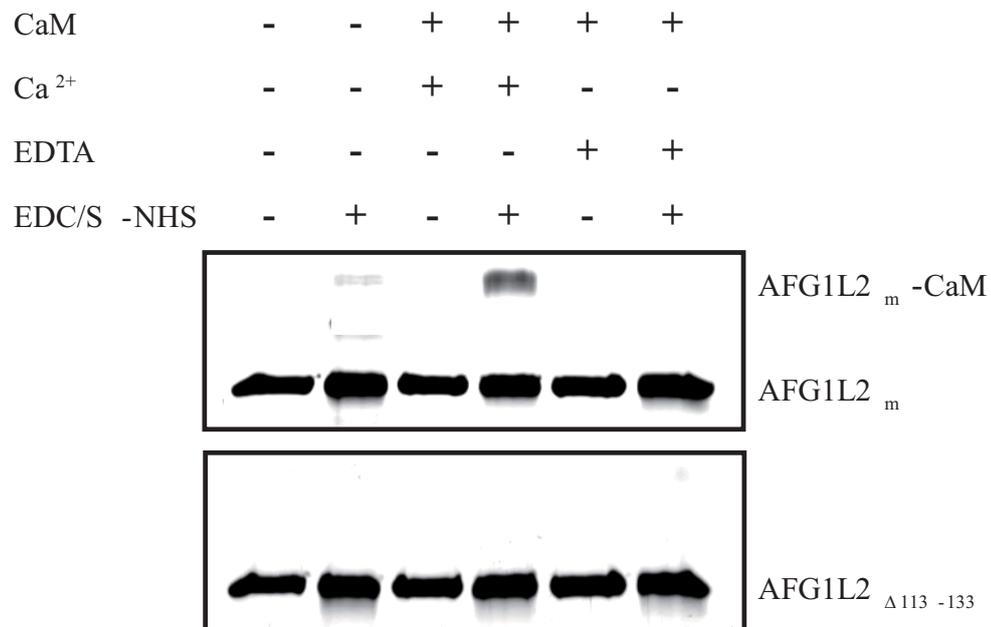


Abb. 9: Quervernetzung von AFG1L2_m mit Rinderhirncalmodulin

Rekombinantes AFG1L2_m und AFG1L2_{Δ113-133} wurde in An- bzw. Abwesenheit von Kalzium mit Rinderhirn-Calmodulin versetzt und mit dem 0Å Quervernetzer EDC/S-NHS behandelt. Die Reaktion wurde nach weiteren 30min mit SDS-Gelladepuffer gestoppt und die Proben über SDS-PAGE mit Silberfärbung analysiert. CaM: Rinderhirn-Calmodulin, AFG1L2_m-CaM: Komplex aus rekombinatem AFG1L2 und Calmodulin

3.4.2.2 Einfluss von ATP auf die Quervernetzung von AFG1L2 und Calmodulin

Über AAA⁺-Proteine ist bekannt das sie Magnesiumionen benötigen um ATP besser koordinieren zu können (Hanson and Whiteheart 2005), weshalb im weiteren der mögliche Einfluss von Magnesium und ATP auf die Interaktion von AFG1L2 und Calmodulin analysiert wurde. Dazu wurden die Proben für die Quervernetzung wie unter [3.4.2.1] beschrieben angesetzt und zusätzlich mit Magnesium sowie mit Magnesium und ATP versetzt. Interessanterweise konnte beobachtet werden, dass sich die monomeren AFG1L2_m entsprechende Proteinbande in allen Ansätzen mit

Magnesium leicht in einen höhermolekularen Bereich verlagert, unabhängig davon ob sich Calmodulin, Quervernetzter oder ATP im Ansatz befanden (Abb. 10, vergleiche Spur 1-4 mit Spur 5-9). Diese Verlagerung nach oben kommt vermutlich aufgrund einer durch Magnesium induzierten Konformationsänderung des Proteins zustande. Die Interaktion von AFG1L2_m und Calmodulin wird von Magnesium nicht beeinflusst, da immer ein Quervernetzungsprodukt gleicher Stärke gebildet wird (Abb. 10 Spur 4 und 7). Ist ATP zusätzlich zu Magnesium im Ansatz vorhanden, ist eine deutliche Zunahme der Menge des gebildeten Quervernetzungsprodukts zwischen AFG1L2_m und Calmodulin zu erkennen (Abb. 10 Spur 9). Dies könnte darauf hinweisen, dass ATP die Interaktion von AFG1L2_m mit Calmodulin verbessert.

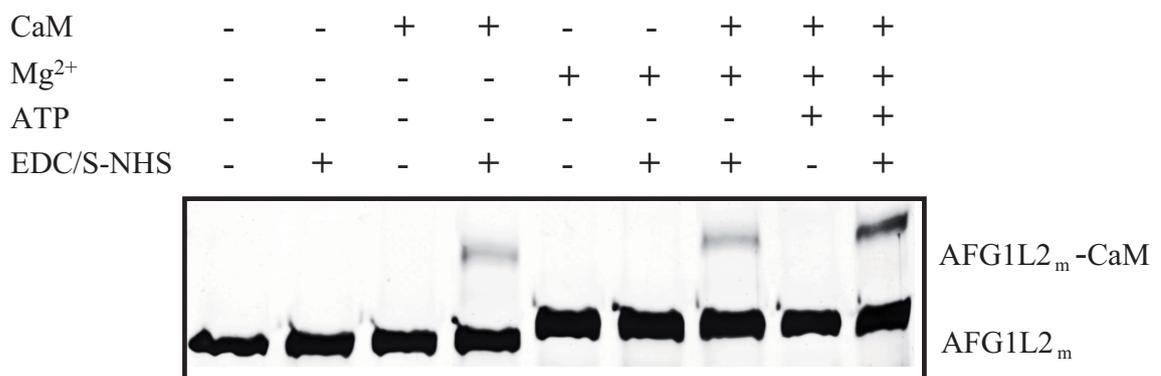


Abb. 10: Quervernetzung in Abhängigkeit von Magnesium und ATP

Rekombinantes AFG1L2_m und AFG1L2_{Δ113-133} wurde in Anwesenheit von Kalzium mit Rinderhirn-Calmodulin inkubiert, in weiteren Ansätzen wurden Mg²⁺ oder Mg²⁺ und ATP zugegeben. Die Proben wurden mit dem 0Å Quervernetzer EDC/S-NHS behandelt und die Reaktion nach weiteren 30min mit SDS-Gelladepuffer gestoppt. Die Ansätze wurden über SDS-PAGE mit Silberfärbung analysiert. CaM: Rinderhirn-Calmodulin, AFG1L2_m-CaM: Komplex aus rekombinatem AFG1L2 und Calmodulin.

Da ATP anscheinend einen Einfluss auf die Interaktion von AFG1L2_m mit Calmodulin hatte, wurde dies genauer untersucht. Dazu wurde ein Quervernetzungsversuch mit ansteigenden Mengen von 0-20 mM ATP im Puffer durchgeführt. In jedem Ansatz waren dabei Magnesium und Kalzium vorhanden. In Abb. 11 ist deutlich die Zunahme des Quervernetzungsproduktes bei gleichzeitiger Abnahme von AFG1L2_m zu erkennen.

Wurde der gleiche Versuch mit ADP durchgeführt, konnte ebenfalls einen Anstieg in der Menge an Quervernetzungsprodukt in Abhängigkeit von der ADP-Konzentration beobachtet werden (Abb. 11, 3. Zeile). Dies spricht dafür, dass nicht nur ATP, sondern auch ADP die Interaktion von Calmodulin und AFG1L2 verstärkt. Wurde der Versuch jedoch mit nicht hydrolysierbarem ATP (AMP-PNP) durchgeführt, blieb die Menge an gebildetem Interaktionsprodukt bei allen Konzentrationen vergleichsweise sehr schwach und im Wesentlichen gleich (Abb. 11, 2. Zeile). Dies ist am besten dadurch zu erklären, dass das rekombinante AFG1L2_m ein aktives AAA⁺-Protein ist, das in der Lage ist zur Verfügung gestelltes ATP zu hydrolysieren und so ADP für die Interaktion mit Calmodulin zur Verfügung steht. Die Interaktion von AFG1L2 mit Calmodulin ist demnach wahrscheinlich durch ADP und nicht durch ATP verstärkt.

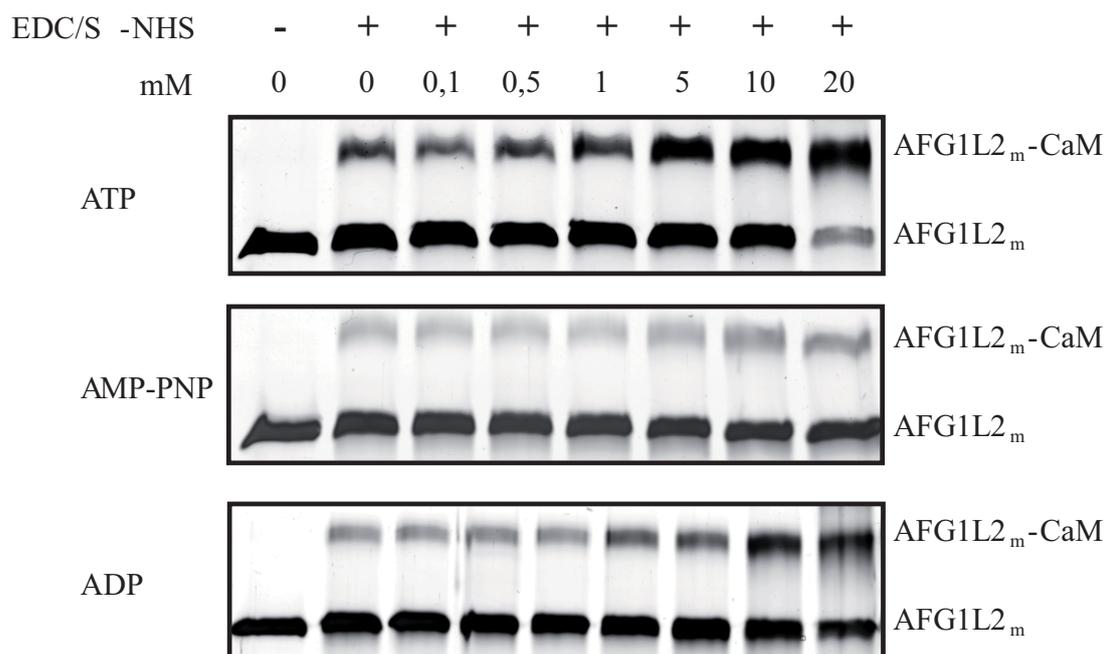


Abb. 11: Quervernetzung in Abhängigkeit von ATP und ADP

Rekombinantes AFG1L2_m wurde in Anwesenheit von Kalzium und Magnesium mit Rinderhirn-Calmodulin inkubiert und mit ansteigenden Mengen ATP, ADP und nicht hydrolysierbarem ATP (AMP-PNP) versetzt. Danach fand die Quervernetzung für weitere 30min mit dem 0Å Quervernetzer EDC/S-NHS statt. Die Reaktion wurde mit SDS-Gelladepuffer gestoppt und die Proben über SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. CaM; Rinderhirn-Calmodulin, AFG1L2_m-CaM: Komplex aus rekombinantem AFG1L2 und Calmodulin

3.4.3 Versuche zur *in vivo*-Interaktion mittels Split-Ubiquitin

Um zu zeigen, dass AFG1L2 und AFG1L1 auch *in vivo* eine funktionelle Einheit mit Calmodulin bilden können, wurden beiden Proteine zusammen mit Calmodulin 3 (AtCAM3) oder Calmodulin-like-Protein 30 (AtCML30) aus Arabidopsis in Vektoren des Split-Ubiquitin-Systems kloniert. Hefezellen werden mit zwei Vektoren, von denen der eine für eine Hälfte (CUB) und der andere für die andere Hälfte (NUB) von Ubiquitin kodiert, transformiert. Wenn die beiden Ubiquitin-Teilstücke interagieren, wird ein Transkriptionsfaktor (TF) abgespalten und die Hefen können auf Mangelmedium wachsen. Würden AFG1L2 oder AFG1L1 mit einem der Calmoduline interagieren, würde der Transkriptionsfaktor aufgrund der Zusammenführung der Ubiquitinhälften abgespalten und zu einem Wachstum der Hefen auf selektivem Medium führen.

Zur Kontrolle des Systems wurden zuerst die verschiedenen Konstrukte einzeln in Hefe transformiert und testweise auf Mangelmedium ausplattiert werden. Bei dieser Kontrolle zeigte sich, dass Hefen, die allein mit AFG1L2-NUB-TF oder AFG1L1-NUB-TF transformiert waren bereits zum Wachstum auf Mangelmedium befähigt waren. Dies ist ungewöhnlich. Eine mögliche Erklärung wäre, da AFG1L2 und AFG1L1 AAA⁺-Proteine sind und in dieser Klasse viele Proteasen zu finden sind (Lupas and Martin 2002), dass der Transkriptionsfaktor von dem zu untersuchenden AFG1L2 oder AFG1L1 selbst abgespalten wird und es so zu einer Autoaktivierung kommt.

3.5 Oligomerisierungs- und Aktivitätsstudien

Es ist beschrieben, dass AAA⁺-Proteine oft Hexamere als funktionelle Einheit bilden und diese für die Aktivität der Proteine notwendig sind (Neuwald et al. 1999). Daher wurde die Fähigkeit von AFG1L1 und AFG1L2 Oligomere zu bilden und eine möglicherweise damit gekoppelte Hydrolyseaktivität von ATP untersucht.

3.5.1 BN-PAGE

Eine Methode Protein-Komplexe unter nativen Bedingungen nachzuweisen, ist die Blue-Native-PAGE. In einer ersten Dimension werden die Proteine und Proteinkomplexe unabhängig von ihrer Ladung nach nativer Größe aufgetrennt. In einer zweiten Dimension können die Komplexe dann ggf. durch SDS denaturiert und die einzelnen Komponenten mittels SDS-PAGE weiter nach ihrem Molekulargewicht getrennt werden. Bei der Analyse zeigte sich, dass sowohl löslich exprimiertes rekombinantes AFG1L_{2m} als auch AFG1L_{1m} sich in der ersten Dimension nicht in sauberen Banden auftrennt. Stattdessen kann in der zweiten Dimension ein Schmierens des Proteins über große Teile des Gels beobachtet werden (Abb. 12). Allerdings lassen sich dabei Bereiche ausmachen, in denen die Proteine verstärkt angereichert sind. Diese finden sich zum einen im unteren Molekulargewichtsbereich (unter 66 kDa) und zum anderen bei über 200 kDa (AFG1L_{2m}) bzw. über 230 kDa (AFG1L_{1m}). Dieses legt nahe, dass Teile der Proteine monomerisch und Teile als höhermolekulare Komplexe vorliegen. Beide Proteine haben mit His-Tag ein Molekulargewicht von etwa 48 kDa, wodurch das Hexamer folglich etwa 289 kDa groß sein müsste. Es lässt sich anhand dieser Untersuchungen allerdings nicht eindeutig sagen, ob es sich bei den hochmolekularen Formen tatsächlich um Hexamere handelt, da insbesondere bei AFG1L_{2m} die Größe eigentlich zu gering ist. Dieser Versuchsansatz bestätigt jedoch die Annahme, dass AFG1L2 und AFG1L1 homo-oligomere Komplexe bilden.

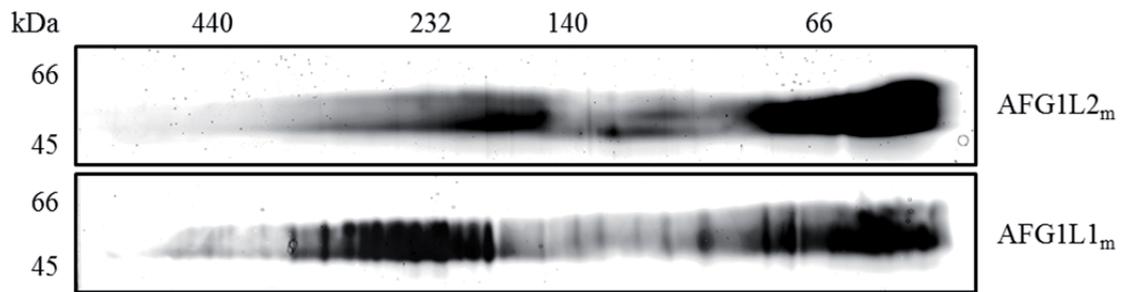


Abb. 12: Oligomerisierung von AFG1L2_m und AFG1L1_m

Rekombinantes AFG1L2_m und AFG1L1_m wurden in der ersten Dimension über eine 6%-14%-BN-PAGE getrennt und die Lauf-Spuren dann in der zweiten Dimension über 10% SDS-PAGE untersucht. Die Gele wurden danach mittels Silberfärbung analysiert. Links vertikal und oben horizontal sind die Massen des Größenmarkers aufgetragen.

3.5.2 Größenausschlusschromatographie

Mittels Größenausschlusschromatographie (size exclusion chromatographie - SEC) können Proteine und Protein-Komplexe Säulenchromatographisch anhand ihrer Größe und ihres Umfangs aufgetrennt werden. In dieser Arbeit wurde eine Superdex 200 HR 10/30 Säule verwendet, deren Auflösungsbereich zwischen 1×10^4 - 6×10^5 Dalton liegt. Proteine mit kleinem Umfang diffundieren in die Poren der Säulenmatrix und brauchen so länger um durch das Säulenbett zu gelangen, als Proteine, die zwischen der Säulenmatrix hindurchwandern können.

3.5.2.1 Oligomerisierung und Aktivität von AFG1L2

Um die Größe der AFG1L2_m und AFG1L1_m Oligomere zu bestimmen, wurde frisch über Ni-NTA aufgereinigtes Protein mittels SEC analysiert. Als Fließmittel wurde ein Tris-Puffer (50 mM Tris-HCl pH 7,8; 0 mM-300 mM NaCl) verwendet. Zur Bestimmung der Komplexgröße wurden Kalibrierläufe mit Proteinen von bekannter Größe aus dem „High Molecular Weight Calibration Kit for native electrophoresis“

erstellt. Zusätzlich wurde die Fähigkeit von rekombinantem AFG1L2_m und AFG1L1_m ATP zu hydrolysieren mit einem einfachen Ansatz überprüft: Frisch gereinigtes Protein wurde mit ATP inkubiert, die Reaktion durch Erhitzen auf 96°C gestoppt und die Nukleotide im Überstand mittels Dünnschichtchromatographie (DC) untersucht (Abb. 13). Als Marker wurden reines ATP, ADP und AMP verwendet. Aufgrund der Wahl des Laufpuffers besitzt ATP den höchsten R_f-Wert und AMP den niedrigsten. Die Ergebnisse zeigen, dass Ni-NTA gereinigtes rekombinantes AFG1L2_m bzw. AFG1L1_m in der Lage sind, ATP zu ADP zu hydrolysieren, nicht aber zu AMP. Wurden die Proteine vor dem Hydrolyse-Assay bei 96°C denaturiert konnte keine Umsetzung von ATP in ADP detektiert werden. So kann ausgeschlossen werden, dass ATP spontan zu ADP zerfallen ist.

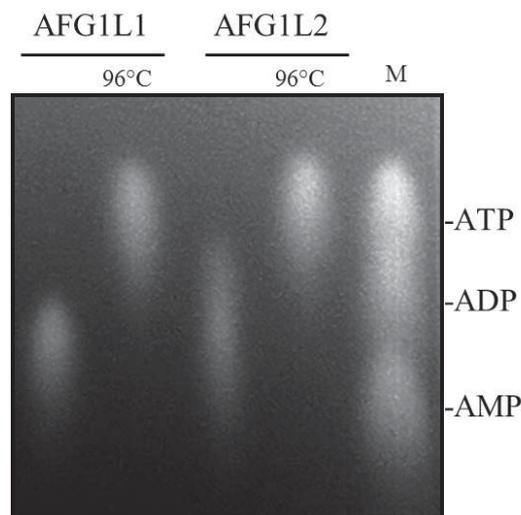


Abb. 13: ATP-Hydrolyse durch AFG1L1 und AFG1L2

AFG1L1_m bzw. AFG1L2_m wurden mit ATP inkubiert und verbleibende Nukleotide im Überstand über Dünnschichtchromatographie aufgetrennt. M: Marker; 96°C: vor Inkubation hitzedenaturiertes Protein

Zuerst wurde AFG1L2_m über SEC untersucht und um zu analysieren, ob das Vorliegen als Komplex oder als Monomer die Aktivität verändert, wurde mit den Proben der verschiedenen Fraktionen der SEC der oben beschriebene ATP-Hydrolyse-Versuch durchgeführt. In Abb. 14 sieht man den Monomer-Peak von AFG1L2_m aber keinen Peak

in der Größe eines möglichen Oligomers. AFG1L2_m liegt unter den gewählten Pufferbedingungen also als Monomer vor. Die Retentionszeiten der SEC veränderten sich auch durch Änderung des Kochsalzgehaltes oder die Zugabe von Magnesium in den Laufpuffer nicht (Daten nicht gezeigt). Wurden die Peak-Fractionen auf ATPase-Aktivität getestet (Abb. 14 unten), so zeigte sich, dass AFG1L2_m im monomeren Zustand in der Lage ist, ATP zu hydrolysieren. Es ist natürlich nicht auszuschließen, dass sich das Hexamer nur kurzweilig in Anwesenheit von ATP im Assay bildet und nach der Spaltung von ATP wieder zerfällt.

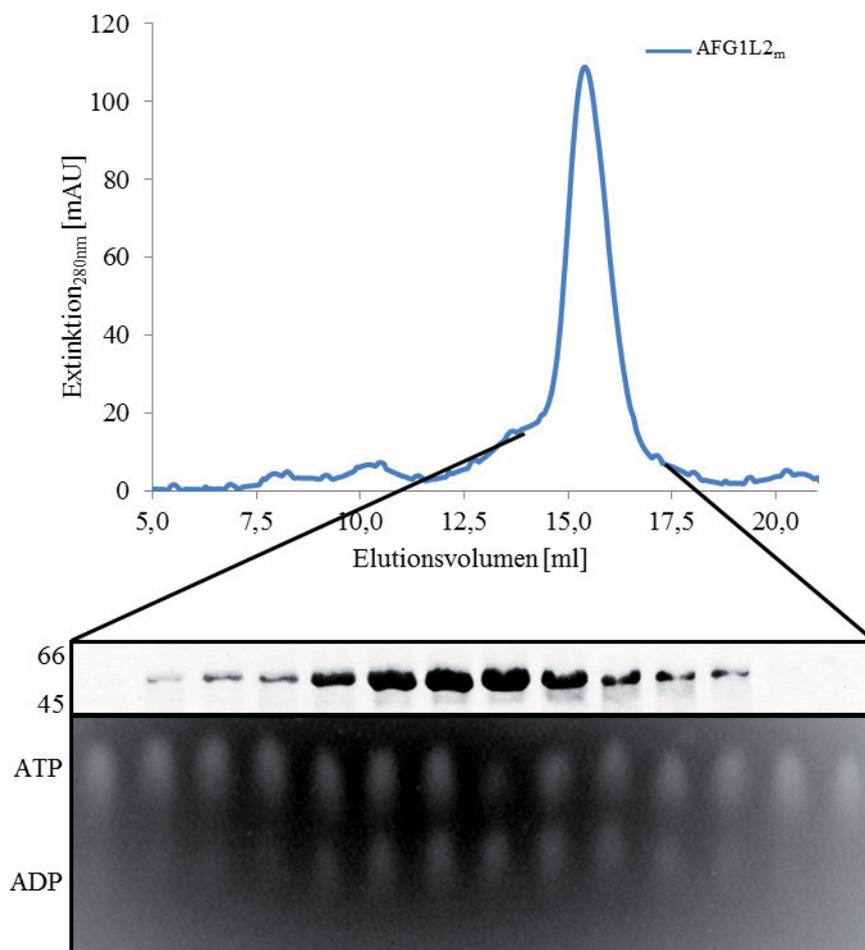


Abb. 14: Gelfiltration von AFG1L2 mit anschließendem ATP Hydrolyse-Assay

AFG1L2_m eluiert als Monomer von der Säule, ist aber trotzdem in der Lage ATP zu ADP zu hydrolysieren.

AFG1L1_m zeigte nach der SEC keinerlei ATPase-Aktivität mehr. Vermutlich ist das Protein zu instabil und wird deshalb während der SEC inaktiviert (Daten nicht gezeigt).

3.5.2.2 Einfluss von 6-Aminohexansäure auf die Oligomerisierung von AFG1L2

Wie schon erwähnt, erhöht 6-Aminohexansäure in den Puffern für die Proteinreinigung die Stabilität von AFG1L2_m. Auch bei der BN-PAGE enthält der Gelladepuffer große Mengen an 6-Aminohexansäure. Daher wurde 6-Aminohexansäure dem Laufpuffer für die SEC zugefügt. Unter diesen Bedingungen liegt AFG1L2_m immer noch hauptsächlich monomerisch (Elution bei 15,0 ml) vor, aber ein neuer, sehr kleiner Peak, bei einem Elutionsvolumen von 12,9 ml, der der Größe eines Trimers entspricht, konnte zusätzlich detektiert werden (Abb. 15). Anhand des coomassie-gefärbten Gels ließ sich zeigen dass AFG1L2_m tatsächlich dort eluiert (Abb. 15).

AFG1L2_{Δ113-133}, in dem die Calmodulin-Bindedomäne mit etwa 2 kDa fehlt, weist ebenfalls zwei Elutionspeaks auf. Beide liegen etwas früher, als die Peaks von AFG1L2_m, obwohl AFG1L2_{Δ113-133} eine kleinere Masse als AFG1L2_m hat (Abb. 15). Es ist möglich, dass sich AFG1L2_{Δ113-133} aufgrund der fehlenden Domäne nicht mehr so gut falten kann und so in einer weniger globulären Form vorliegt.

Eine genauere Untersuchung der ATPase-Aktivität erfolgte diesmal über einen Luziferase-Assay. Dieser hat den Vorteil dass sich über die Lichtemission nicht verbrauchte Mengen ATP bestimmen lassen und so eine Quantifizierung möglich wird. Über ATPasen ist bekannt, dass sie für die Koordination und Hydrolyse von ATP Magnesium als Cofaktor benötigen (Iyer et al. 2004). Darum wurde das gereinigte Protein auch in An- bzw. Abwesenheit von Magnesium mit ATP inkubiert. Außerdem wurde der Einfluss von Kalzium und Calmodulin auf die ATPase-Aktivität getestet. Es handelt sich hierbei um eine Endpunkt-Messung. Die Reaktion wurde durch Erhitzen gestoppt und denaturiertes Protein durch Zentrifugation entfernt. Ein Aliquot des Überstands wurde 1:1 mit Luziferase-Reaktions-Mix gemischt und die Lichtemission anschließend im Luminometer gemessen.

Die Proben, die die monomerische Proteinfraction enthielten, zeigten mit Magnesium einen Anstieg der Hydrolyserate. Die Hydrolyseaktivität war zwischen 10% und 30% höher als ohne Magnesium (Abb. 16). Die Zugabe von Kalzium und/oder Rinderhirn-Calmodulin hatte jedoch keinen Effekt auf die ATP-Hydrolyse (Daten nicht gezeigt). Auch ließ sich bei AFG1L2 $\Delta_{113-133}$ kein Unterschied zwischen der Aktivität des Proteins in der Trimer-Fraktion (Abb. 15, Elution bei 12,5 ml) und der Monomer-Fraktion (Abb. 15, Elu bei 14 ml) erkennen. Bei der Untersuchung des Trimers von AFG1L2_m der Fraktion bei 12,9 ml konnte keine ATP-Hydrolyse festgestellt werden, was aber an den geringen Proteinmengen im Eluat liegen könnte. Die Untersuchungen der Aktivität gestalteten sich allerdings wegen der geringen Stabilität der rekombinanten Proteine als äußerst schwierig. Dazu kommt dass das Substrat von AFG1L2 nicht bekannt ist und deshalb wirkliche enzymkinetische Messungen nicht möglich und Aussagen über Enzymhemmung oder -Induktion nur schwer zu treffen sind.

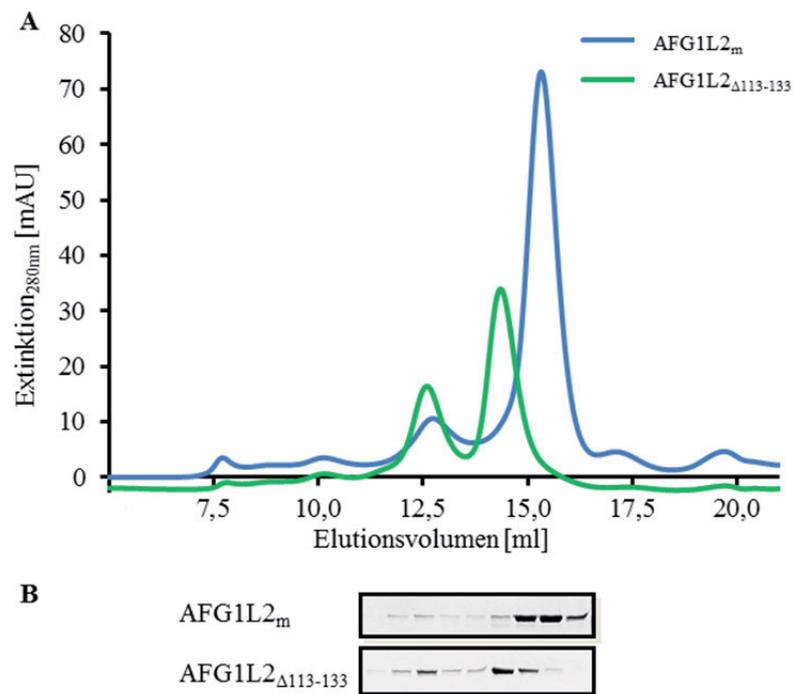


Abb. 15: Größenausschluss-Chromatographie mit anschließender Aktivitätsmessung

A: In einem Puffer mit 6-Aminohexansäure ergeben heterolog exprimiertes AFG1L2_m und AFG1L2_{Δ113-133} je einen Trimer-Peak bei 12,9 ml bzw 12,5 ml und einen Monomerpeak bei 15 ml bzw. 14 ml. B: Überprüfung der Identität der von der Säule eluierten Proteine mittels SDS-PAGE mit Coomassiefärbung.

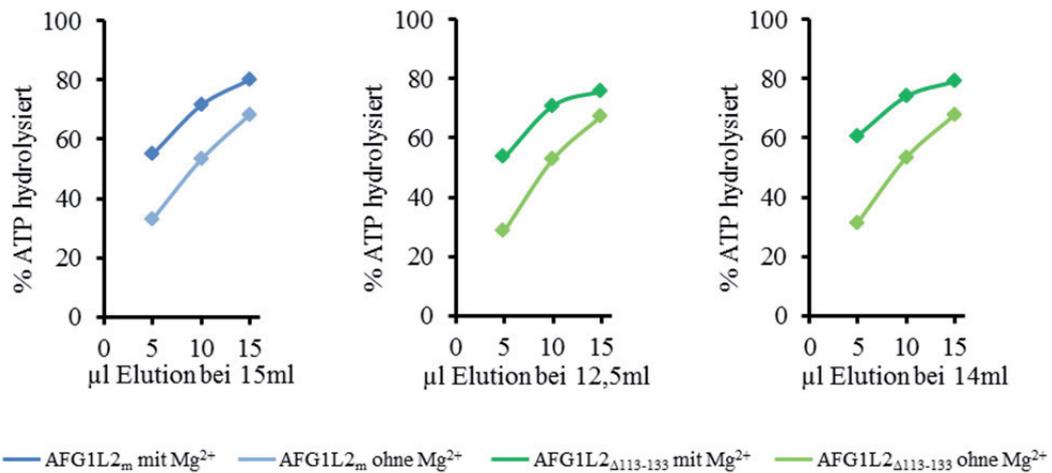


Abb. 16: ATP-Hydrolyse der Peak-Fractionen aus der SEC

ATP-Hydrolyse in An- und Abwesenheit von Magnesium durch AFG1L2_m und AFG1L2_{Δ113-133}. Elutionen bei 14 ml bzw. 15 ml enthalten das Monomer, die Elution bei 12,5 ml das Trimer.

Die Zugabe von 6-Aminohexansäure in den Laufpuffer der SEC, führt auch bei AFG1L1_m zu einer vorher nicht zu beobachtenden Komplexbildung (Abb. 17). Analysiert man AFG1L1_m mit SEC beobachtet man einen Peak auf der Höhe eines Trimers, der sogar höher ist als der des Monomers (Abb. 17). Dies bedeutet, dass mehr AFG1L1_m als Komplex vorliegt als monomerisch und deckt sich mit dem Ergebnis der BN-PAGE. Untersuchungen zur ATPase-Aktivität von AFG1L1_m waren allerdings nicht möglich, da das Protein seine Fähigkeit ATP zu hydrolysieren während der SEC vollständig verloren hat.

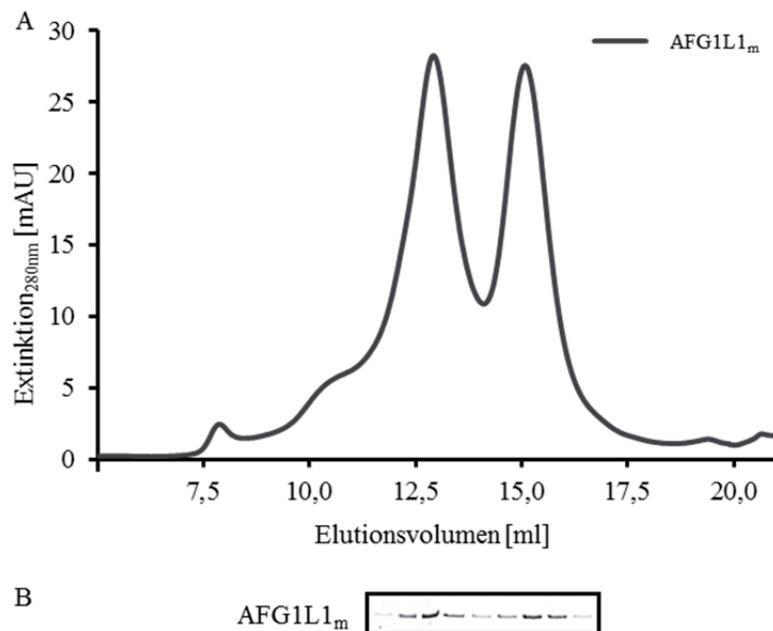


Abb. 17: Größenausschluss-Chromatographie von AFG1L1_m

A: In der SEC sind für AFG1L1_m zwei Peaks zu detektieren. B: Überprüfung der Identität der Proteine in den Eluatfraktionen mittels SDS-PAGE mit Coomassiefärbung.

3.6 *In planta* Untersuchungen zur Funktion von AFG1L2 und AFG1L1

Information über die *in vivo* Funktion eines Proteins kann man ggf. über die phänotypische Analyse von Knock-out-Mutanten erhalten. Im besten Fall zeigt sich ein Phänotyp, der eine deutliche Einordnung in einen Regelkreis oder Funktionsgruppe zulässt (Kuromori et al. 2009). Im Falle von paralogen Protein, kann dadurch auch geklärt werden, ob sie redundant die gleiche Funktion ausüben oder ob es sich um funktional unterschiedliche Paraloge handelt.

3.6.1 Untersuchung von T-DNA-Insertionslinien von AFG1L2 und AFG1L1

In höheren Pflanzen ist bisher keine homologe Rekombination von Genen zur gezielten Erzeugung von Mutationen möglich. Für *Arabidopsis thaliana* steht aber eine große Auswahl an T-DNA-Insertionslinien zur Verfügung. Bei diesen Linien werden durch Agrobakterien mehrere Tausend Basenpaar lange DNA-Fragmente in das Genom eingeschleust, was zu zufälligen Unterbrechungen von Genen führt. Durch Sequenzierung kann nun die Lokalisation der Insertion bestimmt werden und so bestimmte Knock-out-Mutanten identifiziert werden.

Im Falle von *AFG1L2* wurden drei potentielle Insertionslinien untersucht: SAIL_917_C06, GABI_957G01 und FLAG_145G06. Um die Pflanzen auf die Anwesenheit der T-DNA, und somit auf die Genmutation zu überprüfen wurden verschiedene PCR-Reaktionen mit genomischer DNA durchgeführt. Zum einen wurde mit einem genspezifischem Primerpaar untersucht ob das Gen noch ununterbrochen vorhanden war, zum anderen wurde mit einem Primer, der spezifisch für die T-DNA (LB - Left border oder RB - right border) ist, und einem genspezifischem Primer die Insertion der T-DNA im vorhergesagten Locus bestätigt. Die SAIL-Linie hat die T-DNA-Insertion in der Promoterregion ca. 300bp in der 5'UTR (Abb. 18 A) von *AFG1L2*. In der PCR an der genomische DNA ergeben die spezifischen Primer kein Produkt, wohl aber die Kombination aus LB-Primer und dem genspezifischem Primer. Bei einer Analyse von cDNA konnte aber mRNA von *AFG1L2* detektiert werden, woraufhin diese Pflanzenlinie nicht weiter untersucht wurde. Die Gabi-Kat-Linie hat die T-DNA-Insertion im vorletzten Exon (Abb. 18 A) und die Pflanzen sind weiterhin in der Lage eine verkürzte mRNA auszubilden. Es wurde nicht weiter untersucht, ob funktionsfähiges Protein daraus transkribiert wird. Die dritte Linie trägt die Insertion im ersten Exon (Abb. 18 A) und bei der Untersuchung der cDNA konnte kein PCR-Produkt mehr detektiert werden (Abb. 18 B). Das belegt, dass die Linie FLAG_145G06 eine echte Knock-out-Mutante für *AFG1L2* darstellt. Sie wird im Weiteren als *afg1l2* bezeichnet.

Für AFG1L1 Protein wurde die Linie SALK_060950 untersucht. Bei dieser Linie liegt die T-DNA Insertion im zweiten Exon und sie bildet keine mRNA mehr. Es handelt sich

also auch hier um eine Knock-out-Linie für AFG1L1 (Abb. 18 A und B), die im weiteren als *afg111* bezeichnet wird.

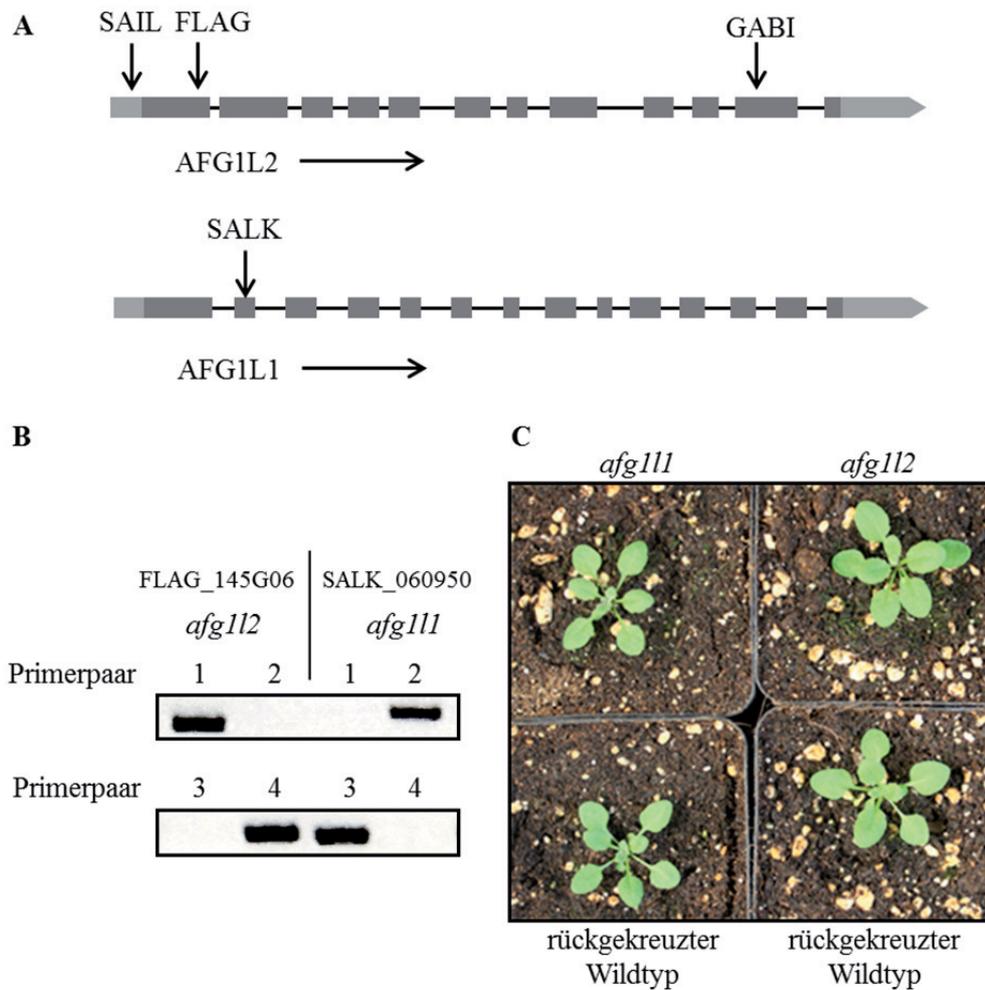


Abb. 18: Untersuchung der T-DNA-Insertionslinien

(A) Schematischer Aufbau des AFG1L2 und AFG1L1 Gens, graue Kästchen markieren Exons, hellgrau 3'- und 5'-UTR, Striche für Introns. Insertionsstellen der T-DNA sind für die einzelnen Linien markiert, die Insertionsstelle wurde durch Sequenzierung bestätigt. (B) PCR-Analyse der KO-Mutanten *afg111* und *afg112*. Primerpaar 1: AFG1L1fw mit AFG1L1rw; Primerpaar 2: AFG1L1rw mit LBA1, Primerpaar 3: AFG1L2fw mit AFG1L2rw; Primerpaar 4: AFG1L2rw mit RB4. (C) Vergleich der KO-Mutanten mit ihrem rückgekreuztem Wildtyp zeigt keinen Phänotyp

Beide Linien wurden unter verschiedenen Lichtbedingungen auf Erde angezogen, zeigten aber im Vergleich zum Wildtyp keinen ausgeprägten Phänotyp (Abb. 18 C). Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der Proteine wurde vermutet dass sie evtl. einander in der Funktion zumindest in den Mitochondrien, substituieren können.

3.6.2 Generierung einer *afg111/afg112*-Doppel-Mutante

Da die beiden Mutanten *afg111* und *afg112* keinen offensichtlichen Phänotyp zeigten, wurde durch Kreuzung der Linien FLAG_145G06 und SALK_060950 eine *afg111/afg112*-Doppel-Mutante generiert. Die F1-Generation dieser Kreuzung ist durchgehend heterozygot für beide Gene. Die mit sich selbst gekreuzte F2-Generation segregiert daher wie in der Tabelle 4 veranschaulicht. Daraus wird ersichtlich, dass unter 16 Pflanzen statistisch nur eine *afg111/afg112* Mutante zu finden ist (in der Tabelle mit **aabb** bezeichnet). Zur Identifizierung des Genotypes der F2-Pflanzen musste eine Analyse der genomischen DNA über vier verschiedene PCR-Ansätze durchgeführt werden, in der jeweils mit den genspezifischen Primern auf Vorhandensein des wildtyp Allels und mit einem weiteren Primerpaar auf Allele mit Insertion der T-DNA getestet wurde.

Tab. 4: Kreuzungsschema: Segregation der F2-Generation

Im Kreuzungsquadrat wird veranschaulicht wie die Allele in der F2-Generation aufspalten. A bzw. a representieren *AFG1L1* und *afg111*, B bzw. b representieren *AFG1L2* und *afg112*.

	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	AaBB	AaBb
Ab	AABb	AAbb	AaBb	Aabb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	<u>aabb</u>

Die Untersuchung ergab die in Tabelle 4 dargestellte Verteilung der F2 Generation auf die einzelnen Genotypen. Die Tatsache, dass *afg111/afg112* Linien identifiziert werden konnte, zeigt, dass auch das Fehlen beider Proteine nicht zu einem lethalen Phänotyp führt.

Im Weiteren wurden *afg111/afg112* Pflanzen unter verschiedenen Bedingungen angezogen und auf phänotypische Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp untersucht. Dabei ließen sich weder bei Anzucht auf Erde noch auf M/S-Platten signifikante Unterschiede zum rückgekreuztem Wildtyp (AABB der F2-Generation) oder zu den jeweiligen Einzel-Knock-out-Linien erkennen (Abb. 19 A). Lediglich im Wurzelwachstum lassen sich leichte Unterschiede ausmachen. Es ergibt sich der Eindruck als wären die Wurzeln der *afg111/afg112* Doppel Mutante stärker verzweigt. Der Effekt variierte jedoch je nach Verwendung des Gelierungsmittels (Gelrite® vs. Plant Agar) und bei Messung der Wurzellängen war keine statistische Signifikanz aufzuweisen (Abb. 19 B).

Bei der phänotypischen Untersuchung der in dieser Arbeit erzeugten *afg111/afg112* Doppel Mutante ist außerdem zu beachten dass es sich um eine hybride Linie aus den Ökotypen Columbia-0 und Wassilevskija-4 handelt und so das Erkennen von leichten phänotypischen Veränderungen erschwert wird. Durch Rückkreuzungen über mehrere Generationen könnte ein gleichmäßiger Hintergrund erreicht werden, vor dem dann die phänotypische Beurteilung wiederholt werden könnte.

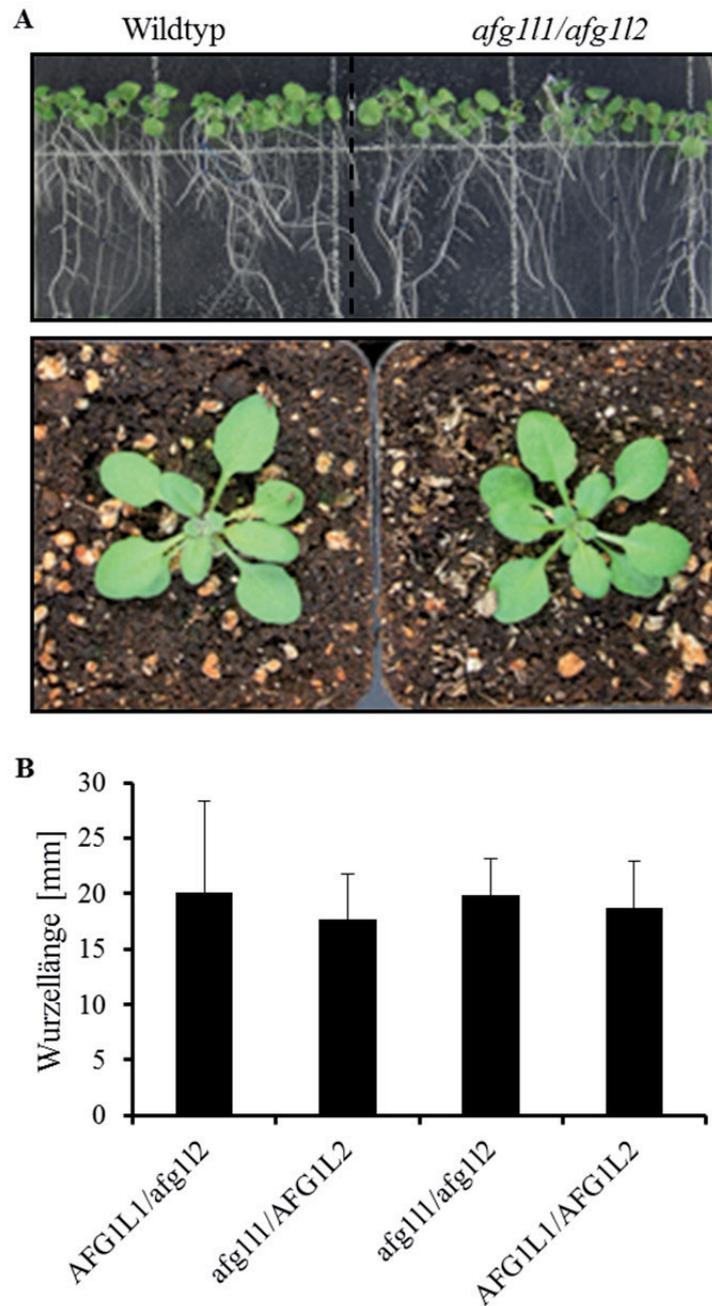


Abb. 19: Wurzellängen eine Woche nach Keimung auf Gelrite-Platten

A: Samen der Doppel-Knock-Out-Mutante und des Wildtyps wurden entweder sterilisiert und auf Platten mit Gelrite® Pflanzenmedium oder auf Erde ausgelegt. B: Samen der rückgekreuzten Linien von AFG1L1-KO, AFG1L2 -KO, Wildtyp und der Doppel-KO-Mutante wurden sterilisiert, und auf Platten mit Gelrite® Pflanzenmedium ausgelegt, drei Tage vernalisiert und dann senkrecht in einen Percival® Pflanzenbrutschrank gestellt. Zwei Tage nach Keimung wurde der Wurzelaustrittspunkt auf der Platte markiert. Die Wurzellänge wurde nach weiteren sieben Tagen von der Markierung bis zur längsten Wurzelspitze gemessen.

3.6.3 Expressionsanalyse von *AFGIL2* und *AFGIL1*

3.6.3.1 Analyse der *AFGIL1* Expressionsdaten durch Genevestigator

GENEVESTIGATOR (Hruz et al. 2008) ist eine Online-Plattform auf der Genomanalysedaten gesammelt und zur Verfügung gestellt werden. Für *Arabidopsis thaliana* gibt es in dieser Datenbank Sammlungen aus drei DNA-Micorarrays. Das Gen *AFGIL2* befindet sich nicht auf dem Affymetrixchip ATH1 22k Array, es liegen deshalb nur sehr wenige Daten vor, die mit dem neuen AGRONIMICS1 Chip (Rehrauer et al. 2010) generiert wurden. *AFGIL1* war dagegen bereits auf dem ATH1 Chip vorhanden, so dass hier deutlich mehr Daten vorliegen.

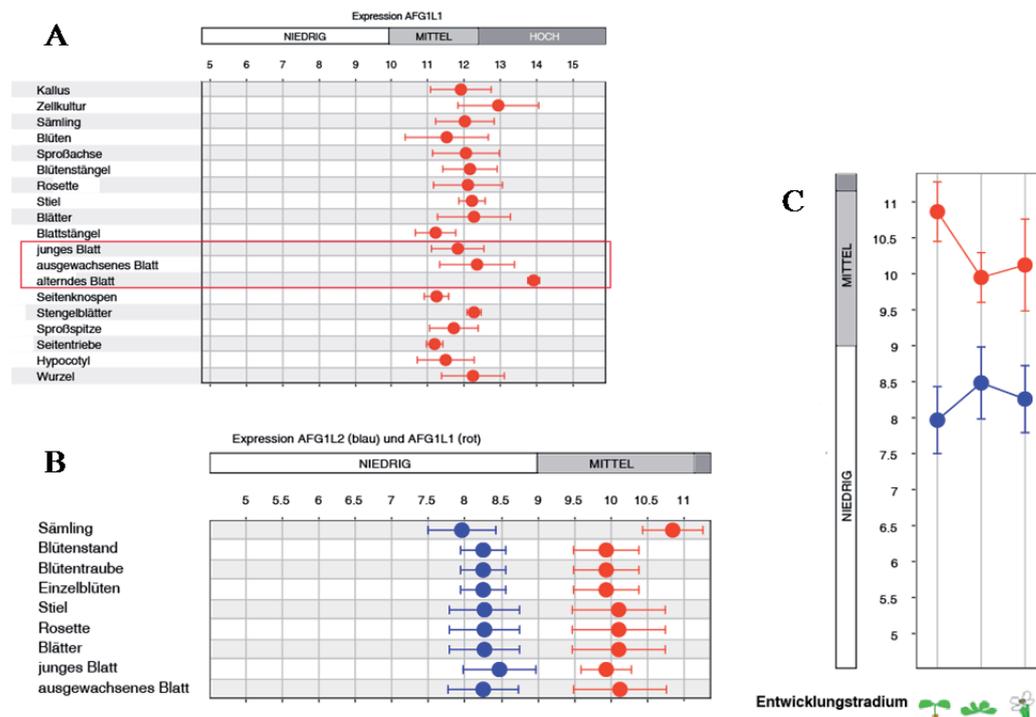


Abb. 20: In silico Recherche der Genexpression

Genevestigatoranalyse A: ATH1-Chip, Expression von *AFGIL1*; B: Gesamt-Expression aufgenommen mit ACRO1-Chip; C: Expression über die Entwicklungsstadien aufgenommen mit ACRO1 Chip. Expression von *AFGIL1* in rot, *AFGIL2* in blau

Analysen der Daten des AGRONOMICS1 Chips zeigen allgemein nur eine sehr niedrige Expression von *AFGIL2*, während *AFGIL1* eine mittlere Expressionstärke aufweist (Abb. 20 B/C). Auffällig ist eine reziproke Entwicklung der Expression von *AFGIL1* und *AFGIL2* beim Vergleich der Kotyledonen zur Blattrosette. Die Analyse der Daten des ATH1 22k Array für *AFGIL1* zeigt bei genauerer Betrachtung einen leichten Anstieg der Expression von *AFGIL1* mit zunehmendem Alter der Blätter (Abb. 20 A). Um einen besseren Vergleich der Expression zu erlangen, wurden zum einen GUS-Reporter-Pflanzen erzeugt und zum anderen qRT-PCR Analysen durchgeführt.

3.6.3.2 GUS-Reportergen-Pflanzen

Promotoren sind sehr variabel und selbst bei Prokaryoten lassen sich nur Konsensussequenzen bestimmen, die den Start der Transkription durch Bindung von Transkriptionsfaktoren regulieren. Bei Eukaryoten ist es allgemein noch schwieriger die Promotorregion genau einzugrenzen. Deswegen wurden für beide Gene je zwei verschieden lange Sequenzen vor der 5'-UTR ausgewählt, die von Programmen detektierbare Promotorelemente aufweisen (www.arabidopsis.org; „Plant Promotor and Regulatory Element resources“). Diese wurden in einen Vektor als Fusion zu einem GUS-Reporter kloniert. Alle Konstrukte wurden über die „Floral Dip“ Methode mittels Agrobakterien in *Arabidopsis* transformiert. Samen der F1-Generation dieser Pflanzen wurden über Kanamycin auf die Insertion der Konstrukte selektioniert. Dabei konnten nur für die Konstrukte *-2420bpAFGIL2::GUS*, *-2750bpAFGIL1::GUS* und *-1600bpAFGIL1::GUS* Pflanzen identifiziert werden. Diese wurden in der F2-Generation mit PCR auf Vorhandensein der jeweiligen Insertion überprüft.

Anschließend wurde die Aktivität der Promotoren anhand der *GUS* (Glucuronidase) Expression vermittelten Spaltung von 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- β -D-glucuronsäure (X-Gluc) analysiert. Diese Spaltung führt zu einer gut sichtbaren Blaufärbung der Organe, in denen eine Expression vorliegt. Es konnte für beide Promotor-Konstrukte von *AFGIL1* eine deutliche Blaufärbung der Blätter beobachtet werden (Abb. 21). Das belegt zum einen, dass *AFGIL1* in *Arabidopsis* exprimiert wird, zum anderen, dass für

dieses Gen ein Promotor innerhalb der ersten 1600 Basen vor der 5'-UTR ausreichend ist. Pflanzengewebe aus der Linie, die mit -2420bp*AFGIL2*::*GUS* transformiert wurde, ließ sich nicht mit X-Gluc färben (Abb. 21). Genauere Untersuchungen der Promoterregion von *AFGIL2* ergaben das nur ca. 1300 Basen aufwärts von *AFGIL2* das Gen At4G28060 beginnt. Im Konstrukt -2420bp*AFGIL2*::*GUS* ist somit sowohl die Promotorregion als auch ein Teil des Gens von At4G28060 vorhanden. Es ist möglich, dass in der gewählten Promoterregion Transkriptionsfaktoren binden, die die Expression von At4G28060 vermitteln und so die Bindung von Transkriptionsfaktoren an den *AFGIL2*-Promotor vermindert wird. Wahrscheinlicher ist jedoch, dass *AFGIL2* generell nur sehr schwach exprimiert wird, wie es auch die Daten der Genchip-Analyse indizieren und daher die Färbemethode mit X-Gluc nicht sensitiv genug ist, die Expression zu detektieren.

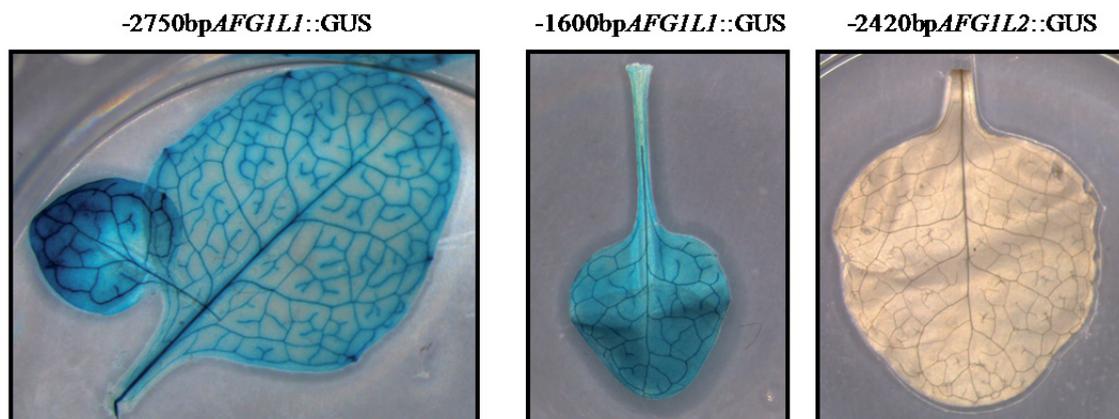


Abb. 21: GUS-Färbung

Blätter von Pflanzen, die Promotor-GUS-Fusionen tragen, wurden mit X-Gluc gefärbt. Nach Herauswaschen des Chlorophylls wurden die Blätter unter dem Mikroskop betrachtet.

3.6.3.3 qRT-PCR

Mit qRT-PCR-Experimenten wurde daraufhin die Expression von *AFGIL1* und *AFGIL2* in Blättern und Wurzeln von Wildtyp Pflanzen in vier aufeinanderfolgenden Wochen ermittelt. Die RNA wurde mit Hilfe des Maxwell[®]16 Systems gewonnen. Dieses System wurde für die Extraktion von RNA, DNA oder Proteinen aus menschlichem oder tierischem Gewebe entwickelt und wurde für die Extraktion von RNA aus Pflanzen angepasst. Es wurden verschiedene Methoden der Zerkleinerung von Pflanzenmaterial getestet, wobei sich eine Zerkleinerung in der Kugelmühle der in flüssigem Stickstoff eingefrorenen Probe, und dann ein weiter Aufarbeitungsschritt mit RNA-Lysepuffer als besonders effektiv erwiesen haben. Es zeigte sich, dass je besser die Homogenisierung des Probenmaterials erfolgte, umso mehr Ausbeute an RNA sich erzielen ließ. Auch wurden verschiedene von Promega erhältliche Kartuschen für die Aufreinigung der RNA getestet. Pflanzengewebe besitzt eine Zellwand, weswegen die Komponenten der Kartusche eine hohe Robustheit gegenüber Zellwandbestandteilen aufweisen muss. Die höchste Ausbeute ließ sich mit AS1220 Kartuschen erzielen. Die Zugabe von 2 Sulfonylethanol veränderte die RNA-Aufreinigung nicht, so dass es aufgrund seiner Giftigkeit nicht mehr zugegeben wurde. Die Konzentration der gewonnenen RNA wurde mittels Photometer bestimmt und die Qualität über ein Agarose-Gel ermittelt (Abb. 22). Nach dem Umschreiben in cDNA wurde eine 1:2 Verdünnung für die qRT-PCR eingesetzt. Da die *afg111*-Mutante den Ökotyp Col-0 besitzt und die *afg112*-Mutante im Ökotyp Wassilewskija erzeugt wurde, wurden auch beide Sorten gegeneinander für die Vergleiche herangezogen. Die Pflanzen wurden eine, zwei, drei und vier Wochen nach Keimung auf Gelrite[®]-Platten verwendet. Von je zehn Pflanzen wurden die Blätter und Wurzeln geerntet und zur RNA-Extraktion gepoolt. Die PCR wurde immer in Duplikaten pipettiert. Als interne Kontrolle wurde Ubiquitin verwendet.

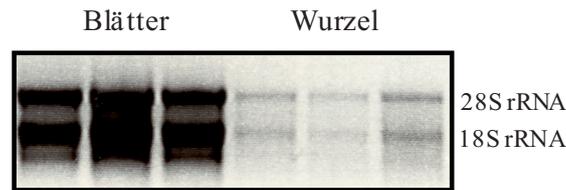


Abb. 22: Formaldehyd-Agarosegel mit RNA

Analyse der Qualität der isolierten gesamt RNA aus Blättern und Wurzeln von *Arabidopsi thaliana* über Formaldehyd-Agarosegel. RNA-Extraktion aus drei Columbia-0-Pflanzen jeweils von Blättern und Wurzeln.

Die Expression von *AFGIL1* wird in den Ergebnissen als Vielfaches der Expression im Wildtyp Col-0 der ersten Woche angegeben, die Expression von *AFGIL2* als Vielfaches der Expression im Wildtyp Wassilewskija in Woche eins. Zur Quantifizierung wurde die $\Delta\Delta C_t$ -Methode verwendet (Livak and Schmittgen 2001). Der C_t -Wert bezeichnet den Zyklus bei dem die Fluoreszenz des hybridisierten PCR-Produkts zum ersten Mal über die Hintergrundfluoreszenz hinausgeht. Aufgrund der niedrigeren C_t -Werte in Proben mit *AFGIL2*-Primern kann generell eine höhere Expression von *AFGIL2* gegenüber *AFGIL1* angenommen werden. Das steht im Gegensatz zu Daten aus den Gen-chip Analysen (siehe 3.6.3.2). Es könnte jedoch auch eine schlechtere Effizienz der PCR mit *AFGIL1*-Primern vorliegen.

Die Expression von *AFGIL1* ist in den Blättern von Ökotyp Col-0 höher als bei Wassilewskija. Bei den Proben des Col-0 Wildtyps steigt die Expression über vier Wochen an (Abb. 23), während die Proben des Wassilewskija Wildtyps nach der zweiten Woche keine Steigerung der *AFGIL1*-Expression mehr aufweisen. In den Wurzeln zeigt sich bei beiden Ökotypen ein kontinuierlicher Anstieg der *AFGIL1* Expression, wobei *AFGIL1* in den Proben von Columbia-0 in den ersten zwei Wochen höher exprimiert ist. Die Expression von *AFGIL1* in den Proben von Ökotyp Wassilewskija steigt jedoch stärker und liegt dann ab der dritten Woche höher als im Ökotyp Col-0 (Abb. 23).

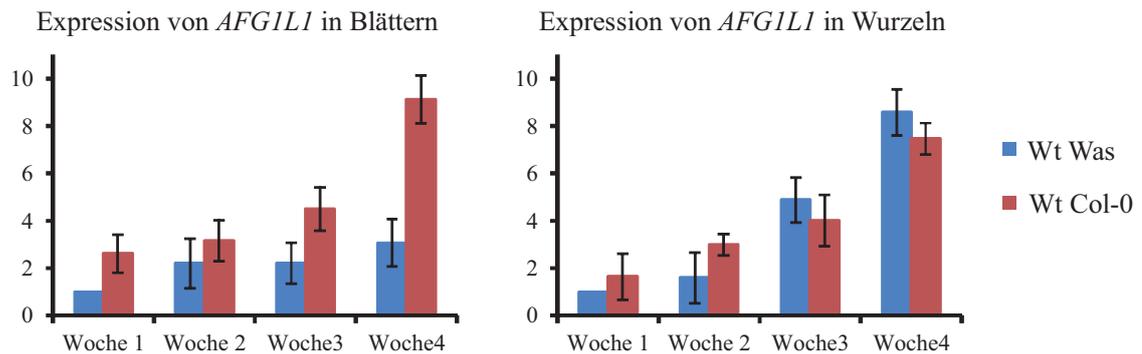


Abb. 23: Mittels qRT-PCR ermittelte Expression von *AFGIL1* über vier Wochen

Die Expression von *AFGIL1* wurde relativ zum Wildtyp Wassilewskija in der ersten Woche berechnet.

Bei der Auswertung der mit den *AFGIL2*-Primern gewonnenen Daten fällt zunächst die hohe Standardabweichung auf, die eine eindeutige Aussage einschränkt. Die Expression von *AFGIL2* bleibt nach dieser Datenlage über die vier Wochen in den Blättern des Ökotyps Col-0 relativ konstant (Abb. 24). In den Wurzeln kommt es in der zweiten Woche beim Ökotyp Col-0 zum Anstieg der *AFGIL2* Expression, die dann wieder auf Ausgangsniveau zurückfällt (Abb. 24). Das könnte ein Hinweis sein, dass *AFGIL2* bei der zu diesem Zeitpunkt beobachteten beginnenden Verzweigung der Wurzeln eine Rolle spielt.

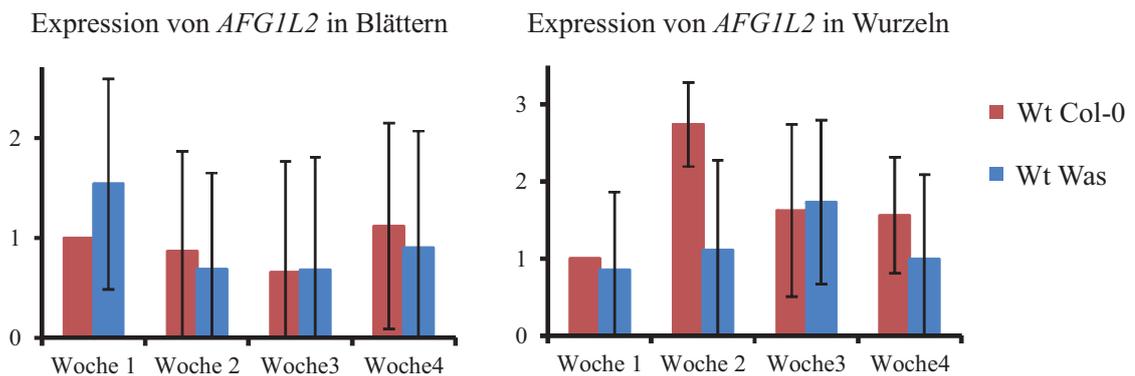


Abb. 24: Expressionsanalyse mittels qRT-PCR von AFGIL2 über vier Wochen

Die Expression von *AFGIL2* wurde relativ zu Wildtyp Col-0 in der ersten Woche berechnet.

In weiterem wurde untersucht, ob sich das Fehlen von *AFGIL1* in der Homozygoten Mutante auf die Expression von *AFGIL2* auswirkt und umgekehrt. Ein Vergleich der *afg112/afg112* Pflanzen mit dem rückgekreuztem Wildtyp zeigt dabei keinen signifikanten Unterschied in der Expressions-Rate von *AFGIL1* in Blättern oder Wurzeln (Abb. 25). Im Allgemeinen erscheint *AFGIL1* in der *afg112*-Mutante sogar weniger stark exprimiert als im Wildtyp (Abb. 25). Obwohl der Unterschied nicht signifikant ist, spricht es eindeutig gegen die These, dass ein Fehlen von *AFGIL1* durch höhere Expressionsraten von *AFGIL2* substituiert wird.

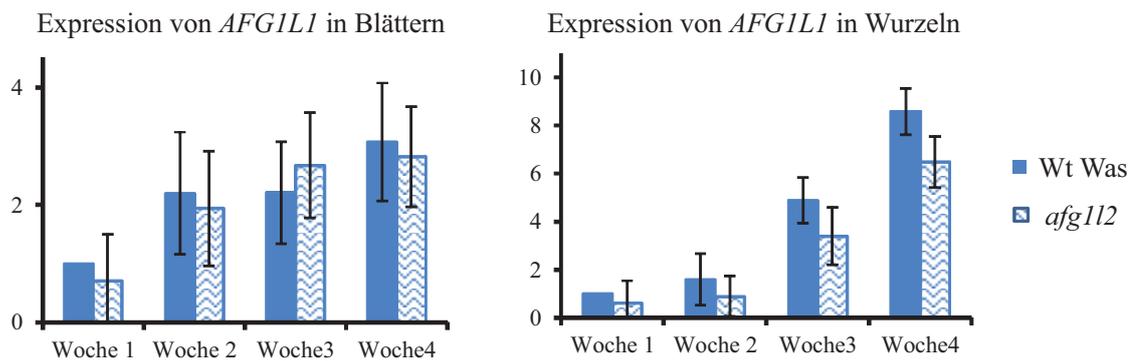


Abb. 25: Expressionsanalyse von *AFG1L1* in Wildtyp und *afg112*-Mutante

Die Expression von *AFG1L1* wurde relativ zum Wildtyp Wassilewskija der ersten Woche berechnet.

Auch bei *afg111/afg111* Pflanzen zeigt sich keine Veränderung in der Expression von *AFG1L2* in den Blättern (Abb. 26). In den Wurzeln steigt die Expression von *AFG1L2* nur im rückgekreuzten Wildtyp in der zweiten Woche an, um dann wieder auf Ausgangsniveau zurück zu fallen. Dies entspricht dem Anstieg der *AFG1L2* Expression, wie er bereits zuvor im Wildtyp beobachtet worden war. Angesichts der beobachteten Unabhängigkeit der *AFG1L2* Expression von der An- oder Abwesenheit von *AFG1L1*, stellt sich die Frage, warum dieser Anstieg in der *afg111/afg111* Mutante ausbleibt.

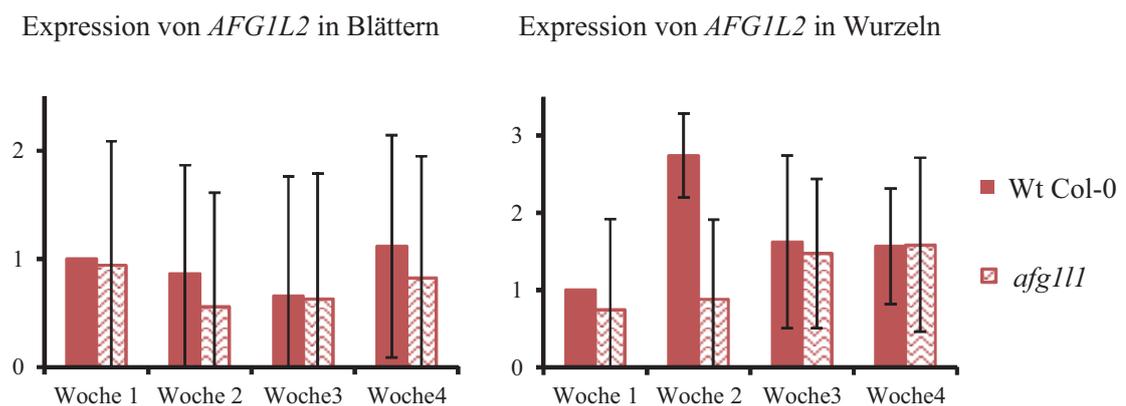


Abb. 26: Expressionsanalyse von *AFG1L2* in Wildtyp und *afg111*-Mutante

Die Expression von *AFG1L2* wurde relativ zum Wildtyp Columbia-0 der ersten Woche berechnet.

Diese Analyse zeigt, dass auch *afg111*-Mutanten nicht durch Überexpression von *AFG1L2* versuchen das fehlende Protein zu kompensieren. Die Versuche zur Genexpression sollten aber durch detailliertere Analysen mit verschiedenen Methoden (z.B. RNA-Seq) überprüft werden.

4. Diskussion

In Pflanzen werden viele interne und externe Reize über das Kalzium-Signalnetzwerk weitergeleitet (McAinsh and Pittman 2009). Die Verarbeitung eines Kalziumsignals in eine Reaktion der Zelle wird in Pflanzen über kalzium-bindende Proteine, wie zum Beispiel Calmoduline (CaM), Calmodulin-ähnliche-Proteine (calmodulin-like proteins; CML), kalzium-abhängige Proteinkinasen (CDPK) und Calcineurin-B-Like Proteine (CBL) vermittelt (DeFalco et al. 2010; Fuchs et al. 2011). Bei der Untersuchung zu chloroplastidären Proteinen, die unter dem Einfluss des Kalzium-Signal-Netzwerks stehen, wurde AFG1L1 als calmodulin-bindendes AAA⁺-Protein isoliert (Bussemer et al. 2009). AAA⁺-Proteine sind „ATPasen associated with various callular activities“ und, wie schon ihr Name sagt, an verschiedensten zellulären Prozessen beteiligt. AAA⁺-Proteine können in allen drei Domänen des Lebens, den Bakterien, Eukaryoten und Archaeen nachgewiesen werden, und allen gemeinsam ist die stark konservierte AAA-Domäne (Iyer et al. 2004; Neuwald et al. 1999). Die durch Hydrolyse von ATP gewonnene Energie wird von AAA⁺ Proteinen für Konformationsänderungen im Protein genutzt. Bei den Zielproteinen führt das zu vielfältigen Veränderungen wie Disassemblierung, Faltung oder Entfaltung (Frickey and Lupas 2004).

AFG1L1 wurde aufgrund seiner Sekundärstruktur und vorhandenen Protein-Domänen als AAA⁺-Protein identifiziert (Bussemer et al. 2009). Die Namensgebung von AFG1L1 erfolgte aufgrund seiner strukturellen Verwandtschaft zu dem Hefeprotein AFG1 (Lee and Wickner 1992), als AFG1-Like Protein 1. Bei den Untersuchungen zu AFG1L1 wurde im Genom von *Arabidopsis thaliana* ein Homolog zu AFG1L1 gefunden, das AFG1L2 genannt wurde. Auch im homologen AFG1L2 lassen sich alle wichtigen Strukturelemente wie das Walker A- und Walker B-Motiv, die Sensoren 1 und 2 als auch der Arginin-Finger identifizieren (Abb. 1). Das Vorhandensein dieser Motive klassifiziert AFG1L2 als AAA⁺-Protein aus der Gruppe der P-Loop-NTPasen. Durch Analysen mit rekombinantem AFG1L2-Protein konnte auch für dieses die kalziumabhängige Interaktion mit Calmodulin bestätigt werden (Abb. 8), die bereits vorher für AFG1L1 beschrieben worden war (Bussemer et al. 2009). Ebenso wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass AFG1L2 die Calmodulin-Binde-Domäne in direkter Nähe

zum Walker A-Motiv hat. Dieses Motiv ist für die ATP-Bindung zuständig und eine Mutation führt zur Zerstörung der ATPase-Funktion (Babst et al. 1998; Matveeva et al. 1997). Dies ließe vermuten, dass AFG1L2 von Kalzium-Signalen über Calmodulin in seiner Aktivität reguliert wird, allerdings konnte in vitro kein Einfluss von Calmodulin auf die ATP-Hydrolyse Aktivität des Proteins gemessen werden. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Interaktion von AFG1L2 mit Calmodulin sowohl durch ATP als auch durch ADP verstärkt wird (Abb. 11 und 12). Wurde nicht hydrolysierbares ATP verwendet, so konnte keine Zunahme der Interaktion zwischen AFG1L2_m und Calmodulin beobachten werden (Abb. 12). Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass AFG1L2_m als aktives AAA⁺-Protein das zur Verfügung gestelltes ATP zu ADP hydrolysiert, welches dann für die Verstärkung der Interaktion mit Calmodulin verantwortlich ist. Das könnte ein Hinweis auf eine inhibierende Wirkung des Calmodulins auf AFG1L2 sein, da das Nukleotid anscheinend nicht mehr aus dem Protein freigesetzt wird und so eventuell keine erneute ATP-Hydrolyse stattfinden kann. Wie die Regulation der ATP-Hydrolyse abläuft, muss durch weitere Versuche gezeigt werden, zum Beispiel mit Proteinvarianten, die keine aktive AAA⁺-Domäne mehr enthalten. Auch müssten die Zielproteine identifiziert werden, um festzustellen, zu welchem Zweck die Energie verbraucht wird.

Ein weiteres Merkmal von AAA⁺-Proteinen ist ihre Fähigkeit Homo-Oligomere zu bilden. Meist werden Hexamere beschrieben, selten, vor allem bei bakteriellen AAA⁺-Proteinen, auch Heptamere oder andere Komplexformen (Babst et al. 1998; Kim et al. 2000; Neuwald et al. 1999; Rohrwild et al. 1997; Seol et al. 1995). Es wurde postuliert, dass die Komplexe notwendig für den Ablauf der ATP-Hydrolyse sind (Neuwald et al. 1999). Aus den BN-PAGE Versuchen wurde ersichtlich, dass sowohl AFG1L2 als auch AFG1L1 in der Lage sind hochmolekulare Komplexe zu bilden (Abb. 13). Hierbei könnte es sich um Hexamere handeln, obwohl AFG1L2 und AFG1L1 ein zu schnelles Laufverhalten im Vergleich mit dem Größenmarker aufweisen. Es ist jedoch auch von anderen AAA⁺-Proteinen bekannt, dass sie aufgrund ihrer kompakten Faltung in der Größenausschlusschromatographie oder in nativen Gelen bei vergleichsweise zu niedrigen Molekularmassen laufen (Kim et al. 2000). Die großen Komplexe, die in der BN-PAGE zu sehen waren, ließen sich in der

Größenausschlusschromatographie nicht nachweisen (Abb. 15). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Bedingungen zur Oligomerisierung nicht optimal sind. Durch Veränderungen an den Laufpuffer-Eigenschaften konnten aber Komplexe in der Größe eines Trimers detektiert werden (Abb. 15). Wichtigste Veränderung war dabei der Zusatz von 6-Aminohexansäure. Diese Aminosäure wird in der BN-PAGE statt Natriumchlorid eingesetzt, um die Löslichkeit von Proteinen zu verbessern (Schagger and von Jagow 1991). Außerdem wird 6-Aminohexansäure medizinisch zur Blutung-Stillung eingesetzt, da es als Serin-Protease-Inhibitor Plasmin hemmt (Gans 1966). In der Klasse der AAA⁺-Proteine sind viele Proteasen zu finden (Langer 2000). Es ist möglich, dass AFG1L2 Proteaseaktivität besitzt und *in vitro* unkontrolliert andere Proteine und auch sich selbst zersetzt. 6-Aminohexansäure könnte nun die Stabilität von AFG1L2 durch Hemmung der Autoproteolyse verbessern. Eventuell werden aber auch durch eine verbesserte Löslichkeit des Proteins die Beweglichkeit und Interaktionsfähigkeit optimiert und so die Komplexe stabilisiert. In weiteren Versuchen müsste geklärt werden, ob Interaktionsproteine und/oder Substrate zu einer weiteren Oligomerisierung von AFG1L2 führen. Es ist auch möglich, dass sich der Komplex durch das Zusammenwirken mit Interaktionsproteinen neu bildet und nach ATP-Hydrolyse oder Substratumsetzung wieder zerfällt, so dass *in vitro* keine stabilen Komplexe entstehen können (Vale 2000).

Ein anderes Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung der Lokalisierung der beiden AAA⁺-Proteine in der Zelle. Aus *in vitro*-Import Experimenten war eine duale Lokalisierung in Chloroplasten und Mitochondrien für AFG1L1 bekannt (Bussemer et al. 2009). Verschiedene Programme, die zur Vorhersage der Lokalisierung verwendet wurden, legten für AFG1L1 ebenfalls eine duale Lokalisierung nahe. Im Vergleich dazu wurde AFG1L2 von den Programmen jedoch ausschließlich als mitochondrielles Protein bestimmt. Mit Hilfe von *in vivo* Versuchen mit „self assembling GFP“ (saGFP) konnte sowohl die duale Lokalisierung von AFG1L1 als auch die Lokalisierung von AFG1L2 ausschließlich in Mitochondrien bestätigt werden (Abb. 3 und 4). Außerdem eignete sich das GFP-Fusionsprotein zur Aufreinigung der Proteine direkt aus Pflanzenmaterial. Ein Vorteil dieser Aufreinigungsmethode ist, dass die Lokalisierung der Proteine über das GFP-Signal bestätigt war. Somit konnte davon ausgegangen

werden, dass AFG1L2 und AFG1L1 von mitochondriellen bzw. chloroplastidären Peptidasen prozessiert worden waren und nun in ihrer gereiften Form vorlagen. Aus Versuchen mit transient transformierten Protoplasten von *Brassica rapa* war bereits bekannt, dass N-terminalen Sequenzen von 87 Aminosäuren Länge für AFG1L2 und 84 Aminosäuren Länge für AFG1L1 ausreichten, um beide Proteine in die Mitochondrien zu translozieren (Abb. 2). Bei der massenspektroskopischen Analyse von AFG1L2 wurden Peptide ab der 58. Aminosäure gefunden. Das stimmt gut mit der Vorhersage von PrediSi (Hiller et al. 2004) überein, dass sich die Schnittstelle nach der 55. Aminosäure befindet. Zwischen Aminosäure 1 und 57 konnten keine Peptide gefunden werden, da diese Teil der Transitsequenz sind und nach dem erfolgreichen Import abgespalten und abgebaut werden. Auch passt die vorhergesagte Länge der Transitsequenz von 55 Aminosäuren bei AFG1L2 gut zum Start der Homologie zwischen AFG1L2 und AFG1L1 (Abb. 1). Bei der massenspektroskopischen Analyse von AFG1L1 wurden Peptide ab der 23. Aminosäure gefunden und 25 Aminosäuren werden durch TargetP (Emanuelsson et al. 2000; Nielsen et al. 1997) als Transitsequenz vorhergesagt. Dieses Ergebnis steht in Diskrepanz zu den Import-Experimenten von Bussemer et al. (2009). In ihren Experimenten ist ein deutlicher Größenunterschied von etwa 5kDa zwischen dem Volllängen und dem gereiften Protein bestimmt worden. Das entspricht eher einer Transitsequenz von ca. 50 bis 60 Aminosäuren. Es gibt verschiedene Möglichkeiten, wie es zu dieser Abweichung kommen konnte. Zum einen ist in Abb. 10 zu sehen, dass rekombinantes AFG1L2 unter dem Einfluss von Magnesium sein Laufverhalten im SDS-Gel verändert. Aufgrund der Homologie der Proteine ist das auch für AFG1L1 zu erwarten. Es ist also auch möglich, dass prozessiertes Protein durch eine sehr kompakte Faltung nach Abspaltung der Transitsequenz im SDS-Gel bei kleineren Molekularmassen detektiert wird, als es seiner eigentlichen Größe entspricht. Eine andere denkbare Möglichkeit wäre auch, dass das AFG1L1, das im saGFP-Vektor unter der Kontrolle des 35S-Promotors steht und somit überexprimiert wird, in so großer Menge in den Zellen vorlag, dass nicht das gesamte exprimierte Protein in die Chloroplasten bzw. Mitochondrien transportiert werden konnte. Somit würde nach der Aufreinigung von AFG1L1 aus ganzen Blättern eine Mischung aus Volllängenprotein und prozessiertem Protein extrahiert. Bei der Massenspektrometrie würden aufgrund der ungünstigen Verteilung der Arginine und

Lysine am N-Terminus die durch den Trypsin-Verdau sehr kleinen Peptide nicht gefunden werden. Um die tatsächliche Schnittstelle der Transitsequenz zu bestimmen, könnten AFG1L1 und AFG1L2 mittels dem GFP-Tag direkt aus Chloroplasten oder Mitochondrien aufgereinigt werden und diese dann N-Terminal durch Edman-Abbau (Edman 1949) sequenziert werden.

Bei der Aufreinigung von rekombinantem AFG1L1 aus Mesophyllzellen von *Nicotiana benthamiana* fiel eine Bande bei etwa 60kDa im SDS-Gel auf, die in der Kontrolle nicht vorhanden war (Abb. 6). Die gefundenen Peptide passten zu einem Protein dessen Homologe die Chaperonin-60 Proteine von *Arabidopsis thaliana* sind. Chaperonin-60 Proteine kommen in Pflanzen in den Chloroplasten, zum Beispiel als rubisco-untereinheitbindende Proteine, oder in den Mitochondrien als HSP 60 vor. Chaperonin-60 Proteine sind dort an verschiedenen Funktionen in der Proteinfaltung und der Stress-Resistenz beteiligt (Hill and Hemmingsen 2001; Martel et al. 1990). Für ihre Funktion benötigen Chaperonine ATP. Für die Mangrove *Brugiera sexangula* ist beschrieben, dass ein Chaperonin, CCT α , eine Rolle bei der Toleranz von Salz-Stress und osmotischem Stress spielt (Yamada et al. 2002), diese Funktion ist jedoch unabhängig von ATP. Es ist möglich, dass ein Chaperonin aus *Arabidopsis thaliana* zusammen mit AFG1L1 eine funktionelle Einheit bildet, um negative Auswirkungen von Salz- und osmotischem Stress besser zu vermeiden, da auch für *AFG1L1* eine höhere Expression unter diesen Stress-Bedingungen beschrieben ist (Van Aken et al. 2009). AFG1L1 könnte dabei der Motor sein und durch ATP-Hydrolyse Konformationsänderungen auf Chaperonin-60 übertragen, ohne dass dieses selbst ATP verbraucht.

Knock-out-Mutanten sind eine gute Möglichkeit die Funktion eines Proteins *in vivo* zu untersuchen. Fehlt der Pflanze ein Protein, kann es zu phänotypischen Veränderungen kommen, wie zum Beispiel Wachstumsverzögerungen oder auch Albinismus (Bolle 2009). Die Knock-out-Mutanten *afg1l2* und *afg1l1* zeigten aber sowohl unter den im Gewächshaus herrschenden Wachstumsbedingungen als auch auf Kulturplatten keinen ausgeprägten Phänotyp (Abb. 18). Aufgrund der Ähnlichkeit der Proteine wurde angenommen, dass sie sich gegenseitig substituieren können. Genevestigator-Analysen

(Hruz et al. 2008) ergeben für *AFGIL1* und *AFGIL2* nur sehr niedrige Expressionsraten, wobei *AFGIL1* trotzdem höher exprimiert ist als *AFGIL2*. Das ist ein Hinweis, dass die beiden Proteine unter normalen, nicht gestressten Bedingungen nur in geringen Mengen produziert werden und die Pflanze diese entweder nicht benötigt oder das Fehlen kompensieren kann. *AFGIL2* wurde noch nicht unter Stress auf einem DNA-Chip zur Bestimmung der Genexpression auf RNA-Level unter verschiedenen Bedingungen getestet, da das Gen nicht auf dem ATH1 22k Array Chip vertreten war. Allerdings ist für *AFGIL1* eine Hochregulierung der Genexpression unter Salz-, osmotischem und Hitze-Stress beschrieben (Van Aken et al. 2009). Das ist ein Anhaltspunkt dafür, dass die beiden AAA⁺-Proteine an der Stress-Antwort der Pflanze beteiligt sein könnten. Es wird sich mit der breiteren Verwendung des AGRONOMICS1-Chips die Möglichkeit ergeben auf Daten aus verschiedenen Stress-Analysen zurückgreifen zu können.

Generell deckt sich die Expressionslevel-Analyse mit dem Ergebnis der in dieser Arbeit untersuchten GUS-Reporterpflanzen. Blätter von Pflanzen, die mit Konstrukten aus *AFGIL1*-Promotor und Glucuronidase transformiert worden waren, konnten innerhalb von ca. 20 Stunden mit X-Gluc blau gefärbt werden (Abb. 21). Im Vergleich dazu, führt der *AFGIL2*-Promotor fusioniert an Glucronidase in den Blättern von transformierten Pflanzen nicht zu einer Umsetzung von X-Gluc. Die Färbemethode mit X-Gluc ist allerdings nicht sehr sensitiv, deshalb kann es auch sein dass die Färbung nur zu schwach war um sie zu detektieren. Der Versuch könnte mit einem MUG-Assay (4-methylumbelliferyl β -D-glucuronide) wiederholt werden, da diese Methode sensitiver ist (Gallagher 1992).

Bei qRT-PCR Experimenten über vier Wochen Wachstum unter Standardbedingungen auf Kulturplatten konnte kein signifikanter Unterschied in der Expression von *AFGIL2* in den *afg111*-Mutanten und von *AFGIL1* in den *afg112*-Mutanten festgestellt werden. Das Fehlen des einen Proteins ist für die Pflanze offensichtlich nicht so gravierend, dass sie mit der Überexpression des anderen Homologs reagieren müsste. Alternativ haben *AFGIL1* und *AFGIL2* so unterschiedliche Funktionen, dass sie sich nicht gegenseitig substituieren können. In der Tat ist über den Zeitraum von vier Wochen ein Anstieg der

Expression von *AFG1L1*, sowohl in den Blättern, als auch in den Wurzeln zu bemerken, während die Expression von *AFG1L2* nur in den Wurzeln Veränderungen aufweist. Das ist ein Hinweis auf die Beteiligung von *AFG1L2* in der Wurzelentwicklung. Es gibt Andeutungen darauf, dass *AFG1L1* als vermutlich phylogenetisch jüngeres Protein (Iyer et al. 2004) eine neue Aufgabe bekommen hat, die es nun in Chloroplasten und Mitochondrien ausübt, während *AFG1L2* seine Aufgabe ausschließlich in den Mitochondrien erfüllt. Um das zu belegen könnten die *afg1l1*- und die *afg1l2*-Mutanten unter verschiedensten Stress-Bedingungen untersucht werden, um dann Veränderungen in der Expression der Proteine zu untersuchen.

Eine andere Möglichkeit zu untersuchen ob *AFG1L2* und *AFG1L1* die gleichen Aufgaben in der Zelle übernehmen, war die Erzeugung einer *afg1l1/afg1l2*-Doppelmutante durch Kreuzung. Unter den normalen Bedingungen im Gewächshaus oder auch auf den Nährstoff-Platten zeigten Doppel-Mutanten ebenfalls keinen ausgeprägten Phänotyp. Bei Hochkant-Versuchen, in denen das Wurzelwachstum näher beobachtet wurde, konnte eine stärkere Verzweigung der Wurzeln in der Doppelmutante im Vergleich zu Wildtyp-Pflanzen festgestellt werden (Abb. 19). Denkbar wäre, dass sowohl *AFG1L2* als auch *AFG1L1* ihre Hauptaufgabe in den Wurzeln erfüllen und dort auch an der Entwicklung beteiligt sind, dass aber die tatsächliche Funktion erst unter Stressbedingungen zum Tragen kommt.

AFG1L2 ist, im Gegensatz zu *AFG1L1*, ein exklusiv in Mitochondrien lokalisiertes AAA⁺-Protein. Da es eine Calmodulin Bindedomäne besitzt wird seine Aktivität als AAA⁺-Protein wahrscheinlich durch Kalzium/Calmodulin negativ beeinflusst. Es ist in der Lage ATP unabhängig vom Vorliegen eines höhermolekularen Komplexes zu hydrolysieren. Die genaue Funktion in der Pflanze konnte nicht bestimmt werden, aber alle Hinweise deuten darauf hin, dass *AFG1L2* an der Stressantwort beteiligt ist.

5. Literatur

Anderson JM, Charbonneau H, Jones HP, McCann RO, Cormier MJ (1980) Characterization of the plant nicotinamide adenine dinucleotide kinase activator protein and its identification as calmodulin. *Biochemistry* 19: 3113-3120

Arazi T, Baum G, Snedden WA, Shelp BJ, Fromm H (1995) Molecular and biochemical analysis of calmodulin interactions with the calmodulin-binding domain of plant glutamate decarboxylase. *Plant Physiol* 108: 551-561

Babst M, Wendland B, Estepa EJ, Emr SD (1998) The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *EMBO J* 17: 2982-2993

Bertani G (1951) Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 62: 293-300

Biro RL, Daye S, Serlin BS, Terry ME, Datta N, Sopory SK, Roux SJ (1984) Characterization of oat calmodulin and radioimmunoassay of its subcellular distribution. *Plant Physiol* 75: 382-386

Blum H, Beier H, Gross HJ (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *ELECTROPHORESIS* 8: 93-99

Boden M, Hawkins J (2005) Prediction of subcellular localization using sequence-biased recurrent networks. *Bioinformatics* 21: 2279-2286

Bolle C (2009) Phenotyping of *Arabidopsis* mutants for developmental effects of gene deletions. *Methods Mol Biol* 479: 17-34

Bussemer J, Chigri F, Vothknecht UC (2009) *Arabidopsis* ATPase family gene 1-like protein 1 is a calmodulin-binding AAA⁺-ATPase with a dual localization in chloroplasts and mitochondria. *FEBS J* 276: 3870-3880

Cabantous S, Terwilliger TC, Waldo GS (2005) Protein tagging and detection with engineered self-assembling fragments of green fluorescent protein. *Nat Biotech* 23: 102-107

Chigri F, Flosdorff S, Pilz S, Kölle E, Dolze E, Gietl C, Vothknecht U (2011) The *Arabidopsis* calmodulin-like proteins AtCML30 and AtCML3 are targeted to mitochondria and peroxisomes respectively. *Plant Mol Biol*

Chigri F, Hormann F, Stamp A, Stammers DK, Bolter B, Soll J, Vothknecht UC (2006) Calcium regulation of chloroplast protein translocation is mediated by calmodulin binding to Tic32. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103: 16051-16056

- Chigri F, Soll J, Vothknecht UC (2005) Calcium regulation of chloroplast protein import. *Plant J* 42: 821-831
- Chin D, Means AR (2000) Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol* 10: 322-328
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* 131: 1047-1058
- Claros MG, Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241: 779-786
- Clough SJ, Bent AF (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16: 735-743
- Day IS, Reddy VS, Shad Ali G, Reddy AS (2002) Analysis of EF-hand-containing proteins in *Arabidopsis*. *Genome Biol* 3: RESEARCH0056
- DeFalco TA, Bender KW, Snedden WA (2010) Breaking the code: Ca²⁺ sensors in plant signalling. *Biochem J* 425: 27-40
- Edman P (1949) A method for the determination of amino acid sequence in peptides. *Arch Biochem* 22: 475
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300: 1005-1016
- Frickey T, Lupas AN (2004) Phylogenetic analysis of AAA proteins. *Journal of Structural Biology* 146: 2-10
- Fuchs M, Vothknecht UC, Chigri F (2011) Calmodulin and Calmodulin-like proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* 21: 114-121
- Gallagher S (ed) (1992) Quantitation of GUS activity by fluorometry, San Diego
- Gans H (1966) Thrombogenic properties of epsilon amino caproic acid. *Ann Surg* 163: 175-178
- Gehring C (2010) Adenyl cyclases and cAMP in plant signaling - past and present. *Cell Communication and Signaling* 8: 15
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of molecular biology* 166: 557-580
- Hanson PI, Whiteheart SW (2005) AAA+ proteins: have engine, will work. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6: 519-529

-
- Hemaprabha E (2012) Chemical Crosslinking of Proteins: A Review. *Journal of Pharmaceutical and Scientific Innovation*: 22-26
- Hill JE, Hemmingsen SM (2001) *Arabidopsis thaliana* type I and II chaperonins. *Cell Stress Chaperones* 6: 190-200
- Hiller K, Grote A, Scheer M, Munch R, Jahn D (2004) PrediSi: prediction of signal peptides and their cleavage positions. *Nucleic Acids Res* 32: W375-379
- Horton P, PK-J, Obayashi T, Nakai K (2006) Protein Subcellular Localization Prediction with WoLF PSORT. *Proceedings of the 4th Annual Asia Pacific Bioinformatics Conference APBC06*
- Hruz T, Laule O, Szabo G, Wessendorp F, Bleuler S, Oertle L, Widmayer P, Gruissem W, Zimmermann P (2008) Genevestigator v3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Adv Bioinformatics* 2008: 420747
- Iyer LM, Leipe DD, Koonin EV, Aravind L (2004) Evolutionary history and higher order classification of AAA+ ATPases. *J Struct Biol* 146: 11-31
- Jarrett HW, Charbonneau H, Anderson JM, McCann RO, Cormier MJ (1980) Plant calmodulin and the regulation of NAD kinase. *Ann N Y Acad Sci* 356: 119-129
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987) GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* 6: 3901-3907
- Karata K, Inagawa T, Wilkinson AJ, Tatsuta T, Ogura T (1999) Dissecting the role of a conserved motif (the second region of homology) in the AAA family of ATPases. Site-directed mutagenesis of the ATP-dependent protease FtsH. *J Biol Chem* 274: 26225-26232
- Karimi M, Inze D, Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci* 7: 193-195
- Kim KI, Cheong GW, Park SC, Ha JS, Woo KM, Choi SJ, Chung CH (2000) Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 303: 655-666
- Koop HU, Steinmuller K, Wagner H, Rossler C, Eibl C, Sacher L (1996) Integration of foreign sequences into the tobacco plastome via polyethylene glycol-mediated protoplast transformation. *Planta* 199: 193-201
- Kuhn S, Bussemer J, Chigri F, Vothknecht UC (2009) Calcium depletion and calmodulin inhibition affect the import of nuclear-encoded proteins into plant mitochondria. *Plant J* 58: 694-705

-
- Kuromori T, Takahashi S, Kondou Y, Shinozaki K, Matsui M (2009) Phenome analysis in plant species using loss-of-function and gain-of-function mutants. *Plant Cell Physiol* 50: 1215-1231
- Laemmli UK (1970) Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Langer T (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends in Biochemical Sciences* 25: 247-251
- Lee YJ, Wickner RB (1992) AFG1, a new member of the SEC18-NSF, PAS1, CDC48-VCP, TBP family of ATPases. *Yeast* 8: 787-790
- Lenzen CU, Steinmann D, Whiteheart SW, Weis WI (1998) Crystal structure of the hexamerization domain of N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein. *Cell* 94: 525-536
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25: 402-408
- Luan S, Kudla J, Rodriguez-Concepcion M, Yalovsky S, Gruissem W (2002) Calmodulins and calcineurin B-like proteins: Calcium sensors for specific signal response coupling in plants. *Plant Cell* 14: S389-S400
- Lupas AN, Martin J (2002) AAA proteins. *Curr Opin Struct Biol* 12: 746-753
- Martel R, Cloney LP, Pelcher LE, Hemmingsen SM (1990) Unique composition of plastid chaperonin-60: alpha and beta polypeptide-encoding genes are highly divergent. *Gene* 94: 181-187
- Matsuda S, Vert JP, Saigo H, Ueda N, Toh H, Akutsu T (2005) A novel representation of protein sequences for prediction of subcellular location using support vector machines. *Protein Sci* 14: 2804-2813
- Matveeva EA, He P, Whiteheart SW (1997) N-Ethylmaleimide-sensitive Fusion Protein Contains High and Low Affinity ATP-binding Sites That Are Functionally Distinct. *Journal of Biological Chemistry* 272: 26413-26418
- McAinsh MR, Pittman JK (2009) Shaping the calcium signature. *New Phytologist* 181: 275-294
- McCormack E, Braam J (2003) Calmodulins and related potential calcium sensors of *Arabidopsis*. *New Phytologist* 159: 585-598
- McCormack E, Tsai YC, Braam J (2005) Handling calcium signaling: *Arabidopsis* CaMs and CMLs. *Trends Plant Sci* 10: 383-389

-
- Mehlmer N, Sippel C, Peres Hernandez D, Vothknecht UC (2011) *Brassica rapa*: a new model plant for the isolation of chloroplasts and biochemical studies. *Journal of Endocytobiosis and Cell Research* 21: 52-58
- Mereschkowsky K (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Centralbl.* 25: 593-604
- Neuwald AF, Aravind L, Spouge JL, Koonin EV (1999) AAA+: A class of chaperone-like ATPases associated with the assembly, operation, and disassembly of protein complexes. *Genome Res* 9: 27-43
- Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Eng* 10: 1-6
- Ogura T, Whiteheart SW, Wilkinson AJ (2004) Conserved arginine residues implicated in ATP hydrolysis, nucleotide-sensing, and inter-subunit interactions in AAA and AAA+ ATPases. *Journal of Structural Biology* 146: 106-112
- Ogura T, Wilkinson AJ (2001) AAA+ superfamily ATPases: common structure--diverse function. *Genes Cells* 6: 575-597
- Pegues JC, Friedberg F (1990) Multiple mRNAs encoding human calmodulin. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172: 1145-1149
- Petsalaki EI, Bagos PG, Litou ZI, Hamodrakas SJ (2006) PredSL: a tool for the N-terminal sequence-based prediction of protein subcellular localization. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 4: 48-55
- Pogulis RJ, Vallejo AN, Pease LR Recombination and Mutagenesis by Overlap Extension PCR. pp 857-864
- Pope B, Kent HM (1996) High efficiency 5 min transformation of *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res* 24: 536-537
- Reddy VS, Ali GS, Reddy ASN (2002) Genes Encoding Calmodulin-binding Proteins in the Arabidopsis Genome. *J. Biol. Chem.* 277: 9840-9852
- Reddy VS, Reddy ASN (2004) Proteomics of calcium-signaling components in plants. *Phytochemistry* 65: 1745-1776
- Rehrauer H, Aquino C, Gruissem W, Henz SR, Hilson P, Laubinger S, Naouar N, Patrignani A, Rombauts S, Shu H, Van de Peer Y, Vuylsteke M, Weigel D, Zeller G, Hennig L (2010) AGRONOMICS1: a new resource for Arabidopsis transcriptome profiling. *Plant Physiol* 152: 487-499

-
- Rohrwild M, Pfeifer G, Santarius U, Muller SA, Huang HC, Engel A, Baumeister W, Goldberg AL (1997) The ATP-dependent HslVU protease from *Escherichia coli* is a four-ring structure resembling the proteasome. *Nat Struct Mol Biol* 4: 133-139
- Saiki R, Gelfand D, Stoffel S, Scharf S, Higuchi R, Horn G, Mullis K, Erlich H (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491
- Sambrook J, Russell D (eds) (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*
- Schagger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* 199: 223-231
- Schägger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical biochemistry* 199: 223-231
- Schwacke R, Schneider A, van der Graaff E, Fischer K, Catoni E, Desimone M, Frommer WB, Flugge UI, Kunze R (2003) ARAMEMNON, a novel database for *Arabidopsis* integral membrane proteins. *Plant Physiol* 131: 16-26
- Seol JH, Baek SH, Kang MS, Ha DB, Chung CH (1995) Distinctive roles of the two ATP-binding sites in ClpA, the ATPase component of protease Tl in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 270: 8087-8092
- Small I, Peeters N, Legeai F, Lurin C (2004) Predotar: A tool for rapidly screening proteomes for N-terminal targeting sequences. *Proteomics* 4: 1581-1590
- Spannagl M, Noubibou O, Haase D, Yang L, Gundlach H, Hindemitt T, Klee K, Haberer G, Schoof H, Mayer KF (2007) MIPSPlantsDB--plant database resource for integrative and comparative plant genome research. *Nucleic Acids Res* 35: D834-840
- Staros JV, Wright RW, Swingle DM (1986) Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Analytical biochemistry* 156: 220-222
- Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 25: 4876-4882
- Vale RD (2000) AAA proteins. Lords of the ring. *J Cell Biol* 150: F13-19
- Van Aken O, Zhang B, Carrie C, Uggalla V, Paynter E, Giraud E, Whelan J (2009) Defining the Mitochondrial Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular Plant* 2: 1310-1324
- Van Breusegem F, Vranová E, Dat JF, Inzé D (2001) The role of active oxygen species in plant signal transduction. *Plant Science* 161: 405-414

Waldo GS, Standish BM, Berendzen J, Terwilliger TC (1999) Rapid protein-folding assay using green fluorescent protein. *Nat Biotech* 17: 691-695

Walker JE, Saraste M, Runswick MJ, Gay NJ (1982) Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO J* 1: 945-951

Wang Z, Xie W, Chi F, Li C (2005) Identification of non-specific lipid transfer protein-1 as a calmodulin-binding protein in Arabidopsis. *FEBS Lett* 579: 1683-1687

Westphal S, Soll J, Vothknecht UC (2001) A vesicle transport system inside chloroplasts. *FEBS Letters* 506: 257-261

Yamada A, Sekiguchi M, Mimura T, Ozeki Y (2002) The Role of Plant CCT α in Salt- and Osmotic-Stress Tolerance. *Plant and Cell Physiology* 43: 1043-1048

Yang T, Poovaiah BW (2002) Hydrogen peroxide homeostasis: activation of plant catalase by calcium/calmodulin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 4097-4102

Zimmermann P, Hirsch-Hoffmann M, Hennig L, Gruissem W (2004) GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol* 136: 2621-2632

6. Zusammenfassung

Das Kalzium-Signalnetzwerk ist ein wichtiger Übermittler von internen und externen Reizen in der Pflanze. Diese Signale werden unter anderem durch Calmodulin und calmodulin-ähnlichen-Proteine an verschiedene Effektorproteine weitergeleitet. AFG1L2 (AFG1-like Protein 2) wurde in dieser Arbeit als calmodulin-bindendes Proteine aus der Familie der AAA⁺-Proteine (ATPasen associated with various cellular activities) identifiziert. Mit Hilfe von GFP-Fusionskonstrukten konnte die *in vivo* Lokalisierung von AFG1L2 in Mitochondrien gezeigt werden, und die duale Lokalisierung des bereits zuvor beschriebenen Homologs AFG1L1 in Chloroplasten und Mitochondrien bestätigt werden. Die Bindung von Calmodulin erfolgt bei AFG1L2 kalziumabhängig und die Calmodulin-Bindedomäne befindet sich homolog zu AFG1L1 nahe dem für die ATP-Hydrolyse essenziellen Walker A-Motiv in der AAA-Domäne. Es konnte gezeigt werden, dass ADP die Interaktion von AFG1L2 und Calmodulin verstärkt. Das weist auf einen inhibierenden Effekt von Calmodulin hin, da die Nucleotid-Bindetasche besetzt bleibt und keine erneute ATP-Hydrolyse stattfinden kann. Neben den konservierten Motiven haben AAA⁺-Proteine die Bildung von Oligomeren, meist Hexameren gemeinsam. In der Regel ist der Komplex die hydrolytisch aktive Form. Es konnte gezeigt werden, dass AFG1L2 prinzipiell in der Lage ist Oligomere zu bilden, aber dass das Vorliegen als Komplex wahrscheinlich nicht für die Hydrolyse von ATP erforderlich ist. Um die Funktion von AFG1L1 und AFG1L2 in der Pflanze zu bestimmen, wurden *afg1l1*- und *afg1l2*-Mutanten untersucht. Diese zeigten aber unter den normalen Bedingungen keinen Phänotyp. Auch eine im Zuge dieser Arbeit generierte *afg1l1/afg1l2* Doppel-Mutante wies unter Standard-Bedingungen keine Beeinträchtigungen im Wachstum auf. Analysen der Expression der Proteine legen nahe, dass AFG1L1 und AFG1L2 unter Gewächshaus-Bedingungen einander nicht substituieren. DNA-Microarray Daten lassen jedoch auf eine Beteiligung von AFG1L1 an der Stress-Toleranz gegen Salz und Hyper-Osmolarität schließen.

7. Abstract

The calcium-signaling network is an important transducer of internal and external stimuli in plants. These signals are transduced by a diverse set of calcium-sensors such as calmodulin and calmodulin like proteins. In this work, AFG1L2 (AFG1 like protein 2) was characterized as a calmodulin binding protein that belongs to the family of AAA⁺ proteins (ATPases associated with various cellular activities). Using GFP fusion constructs it was possible to determine the *in vivo* localization of AFG1L2 in mitochondria and also to confirm the dual localization of a previously described homologue, AFG1L1, to mitochondria and chloroplasts. The interaction between AFG1L2 and calmodulin is calcium dependent and the calmodulin binding site of the AFG1L2 protein is in the AAA domain at a site homologous to the AFG1L1 protein, in very close proximity to the Walker A Motif, which is essential for ATP hydrolysis. It could be shown that ATP and ADP intensify the interaction between AFG1L2 and calmodulin. AAA-proteins are not only described by their conserved motifs but also tend to form oligomers, often hexameres. Usually, only the complex form is the hydrolytically active form. It was shown that AFG1L2 basically is able to form oligomers but the AFG1L2 monomer seems to be able to hydrolyze ATP. To determine the function of AFG1L1 and AFG1L2 in plants *afg1l1* and *afg1l2* mutant plants of *Arabidopsis thaliana* were analysed. Those mutant plants did not show any visible phenotype under normal growth conditions. Therefore a *afg1l1/afg1l2* double mutant was generated but it also showed no visible phenotype. Analyses of the expression profile of AFG1L1 and AFG1L2 suggest that both proteins do not substitute for each other under non-stress conditions. But DNA Microarray data propose an involvement of AFG1L1 in salt stress tolerance or in tolerance against hyper-osmolarity.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich besonders bei Frau Professor Ute Vothknecht bedanken, die mich während meiner Doktorarbeit betreut und vielfältig unterstützt hat. Ich danke ihr für das interessante Thema, und die vielen Möglichkeiten es auf nationalen und internationalen Konferenzen zu präsentieren.

Auch danke ich Fatima Chigri für die Diskussion meiner Ergebnisse und die vielen Tipps für das Arbeiten im Labor.

Bei den Mitgliedern meines Thesis Advisory Komitees Prof. Thorsten Mascher und Prof. Martin Biel bedanke ich mich für ihre Zeit, die sie für TAC-Meetings für mich zur Verfügung stellten sowie ihre Anregungen und Konstruktive Kritik.

Besonders bedanke ich mich bei meinen (ehemaligen) Kollegen und Praktikanten Sandra, Claudia, Norbert, Henning, Simone, Geraldine, Agostinho, Steffi, Adrian und Wiebe für das tolle Arbeitsklima und die ständige Hilfsbereitschaft in allen Labordingen.

Mein Dank geht auch an „die üblichen Verdächtigen“ Tini, Julia, Claudia, Steffi und Flo, Steffi und Martin, Miri und Manu, Maria und Basti für die fröhlichen (Spiele-) Abende, gemeinsamen Essen, lustige Urlaube, ganz einfach weil ihr die besten Freunde der Welt seid.

Ich bedanke mich von ganzem Herzen bei Chris, der mich immer unterstützt und motiviert, und mir in allen Lebenslagen zur Seite steht. Danke dass du immer für mich da bist!

Mein herzlicher Dank geht an meine Eltern, die mich immer unterstützen und für mich da sind, und auch an meine Geschwister, es ist schön dass es euch gibt!

9. Anhang

9.1 Abkürzungsverzeichnis

AAA	<u>A</u> TPasen <u>a</u> ssociated with various callular <u>a</u> ctivities
AFG1L1	AFG1 like Protein 1
AFG1L2	AFG1 like Protein 2
AMP-PNP	Nicht hydrolysierbares ATP (Adenosin 5'-[beta, gamma-imido] triphosphat)
CaM	Calmodulin
CML	Calmodulin-like protein
Ct-Wert	„Cycle treshold“-Wert
EDC	1 Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid hydrochlorid
GFP	Grün floureszierendes Protein
KO	Knock out
S-NHS	N-Hydroxysulfosuccinimid

9.2 Vektoren, Primer, erzeugte Konstrukte

Tab. 5: Verwendete Vektoren

pCold II	Takara Bio Inc (Shiga, Japan)
pET21b;pET21d	Stratagene (La Jolla, USA)
pBIN19 AN-3CI-YFP; pBIN19 AN YFP	Von Dr. Norbert Mehlmer freundlicherweise zur Verfügung gestellt
pBIN19 saGFP ₁₋₁₀ ; pBIN19 saGFP ₁₁	Von Dr. Simon Lander Stael freundlicherweise zur Verfügung gestellt
pKGWFS7	Universität Gent (Karimi et al. 2002)
pOL GFP	Von Dr. Jörg Meurer freundlicherweise zur Verfügung gestellt

Tab. 6: Liste der verwendeten Primer

Bei Klonierungs-Primern ist die angehängte Schnittstelle angegeben. VI: Volllängenkonstrukt; AS: ab/ bis zu dieser Aminosäure; rw: Rückwärtsprimer; fw: Vorwärtsprimer

Oligoname	Sequenz (5'->3')
AFG1L2 VI KpnI rw	GAGGTACCGTCTTAGTGTACCTAGCTGAC
AFG1L2 AS 87 KpnI rw	GTGGTACCGTGCAATCTTTCCATCTCCATTG
AFG1L2 AS1 SpeI fw	GTACTAGTATGCGATTGCTTCTTCTCTCC
AFG1L1 AS 84 KpnI rw	GTGGTACCGTGTTCTATTACATCTGAG
AFG1L1 AS 1 SpeI fw	CAACTAGTATGAGACCAATCATTAGGTTATCATC
AFG1L1 VL KpnI rw	GTGGTACCGCAGATTGTGTGTTATGG
AFG1L1 AS 1 ApaI fw	GGGCCCATGAGACCAATCATTAGGTTATC
AFG1L1 VL NotI rw	GCGGCCGCCAGATTGTGTGTTATGG
AFG1L2 AS 1 ApaI fw	GGGCCCATGCGATTGCTTCTTCTCTCCCTTC
AFG1L2 VL NotI rw	GCGGCCGCCAGAAGAAGGCTGCTTCTC
AFG1L2 overlap Extension	CATCTGCAAAAGGCTTATACTTATATGGAGG
AFG1L2 overlap Extension	GCCTTTTGCAGATGCAGAATAACG
AFG1L1 As 84NdeI fw	CCTCATATGGATGTGAATAGAACAGGTC
AFG1L1 VL XhoI rw	CCACTCGAGTTACAGATTGTGTGTTATG
AFG1L2 VL XhoI rw	GGACTCGAGCTAAGAAGAAGGCTG
AFG1L2 AS 55 NdeI fw	CCTCATATGGGAGATGGAAAGATTGCAG
AFGL1 AS 84 SfiI fw	CTACAGGGCCATTACGGCCATGAATAGAACAGGTCCTC
AFGL1 VL SfiI rw	CTATAAGGCCGAtGCGGCCATCAGATTGTGTGTTATGGC
AFG1L2 AS 54 SfiI fw	CTACAGGGCCATTACGGCCATGAATGGAGATGGAAAGA
AFG1L2 VL SfiI rw	CTATTAGGCCGAGGCGGCCATAGAAGAAGGCTGCTTCT
AFGL1 Prom1600fw	caccCTAAGCTTGTTTAATCCAATTATATATTG
AFGL1 Prom2750fw	caccCCTACTCAAGACTATTAGTCTACTTC
AFGL2 Prom2420fw	caccGAGGATTCCGAGGAGATTGTTGC
AFGL2 Prom1300fw	caccCTAGCTGGTTAATACATGATTCAATTAAAG
AFGL1 Prom rw	CTACGATCAATGCAAATTCAATTCAGCAGC
AFGL2 Prom rw	GGTGAGAATGAGAATGAGAGAGAGAGAAAG
LBa1	GATGGCCCACTACGTGAACCAT
RB4	TCACGGGTTGGGGTTTCTACAGGAC
AFG1L1 fw	TCTCTCTTATCCAGATTTATCATCGTC
AFG1L1 rw	CTTGAGGATTTATCAGAAGTATTATAACCG
AFG1L2 fw	ATGCGATTGCTTCTTCTCCCT
AFG1L1 rw	CAAGTCCATGAGCATTGTCTTTCC

Tab. 7: Für diese Arbeit erzeugte Konstrukte

Vektor	Insert	Aminosäuren/ <i>deletierte As</i>	Bezeichnung	Abkürzung
pCold II	AFG1L2	55-473	Matur	AFG1L2 _m
pCold II	AFG1L2	55-473/ 113-133	ohne CaM-Bindedomäne	AFG1L2 _{Δ113-133}
pCold II	AFG1L1	84-497	Matur	AFG1L1 _m
pCold II	AFG1L1	84-497/ 141-161	ohne CaM-Bindedomäne	AFG1L1 _{Δ141-161}
pOL	AFG1L2	1-87	Präsequenz	AFG1L2 _{Prä}
pOL	AFG1L2	1-473	Volllänge	AFG1L2 _{VI}
pOL	AFG1L1	1-84	Präsequenz	AFG1L1 _{Prä}
pOL	AFG1L1	1-497	Volllänge	AFG1L1 _{VI}
pBin19 saGFP	AFG1L2	1-473	saGFP ₁₁	
pBin19 saGFP	AFG1L2	1-473	saGFP ₁₋₁₀	
pBin19 saGFP	AFG1L1	1-497	saGFP ₁₁	
pBin19 saGFP	AFG1L1	1-497	saGFP ₁₋₁₀	
pBin19 saGFP	NADPH abhängige Thioredoxin-reductase C	1-90	saGFP ₁₁	TrxR::GFP ₁₁
pBin19 saGFP	NADPH abhängige Thioredoxin-reductase C	1-90	saGFP ₁₋₁₀	TrxR::GFP ₁₋₁₀
pBin19 saGFP	2-Oxo-glutaratde-hydrogenase E1	1-66	saGFP ₁₁	OGDE1::GFP ₁₁
pBin19 saGFP	2-Oxoglutarat-dehydrogenase E1	1-66	saGFP ₁₋₁₀	OGDE1::GFP ₁₋₁₀
pBin19 Protein	AFG1L2	1-473	Volllänge	
A-Tag				
pBin19 Protein	AFG1L1	1-497	Volllänge	
A-Tag				

pBin 19 YFP	AFG1L2	1-473	Volllänge	
pBin 19 YFP	AFG1L1	1-197	Volllänge	
pKGWFS7	Promotor L2	2420 As vor ATG		
pKGWFS7	Promotor L1	2750 As vor ATG		
pKGWFS7	Promotor L2	1300 As vor ATG		
pKGWFS7	Promotor L1	1600 As vor ATG		
pBT3-N	AFG1L2	55-473		
pBT3-N	AFG1L1	84-497		
pBT3-C	AFG1L2	55-473		
pBT3-C	AFG1L1	84-497		

