

Komponenten der Thylakoidbiogenese in Cyanobakterien und Chloroplasten

1. Einleitung

Erst die Entstehung der oxygenen Photosynthese hat ein Leben auf unserer Erde, wie wir es heute kennen, möglich gemacht. Seit Entwicklung dieses Prozesses und seiner Ausbreitung durch Cyanobakterien und später durch Algen und Höhere Pflanzen werden pro Jahr über 10^{11} Tonnen Kohlenstoff als Biomasse fixiert und in entsprechender Menge Sauerstoff aus der Wasserspaltung freigesetzt. Erst dadurch wurde unsere Atmosphäre aerob und es entwickelte sich die für unsere Atmung notwendige Sauerstoffkonzentration. Ohne die oxygene Photosynthese wäre daher nicht nur die Erde weniger grün, tierisches Leben wäre ebenfalls nicht möglich. Auch heute gibt es noch Habitate, die den Bedingungen auf der Erde vor der Anreicherung mit Sauerstoff ähnlich sind, und diese geben uns eine Vorstellung davon, wie unsere Welt aussähe, wenn es nicht vor etwa 3 Milliarden Jahren zur Entwicklung der oxygenen Photosynthese gekommen wäre (Fig. 1).



Fig. 1: Die Ergrünung unseres Planeten trat erst nach Entstehung der oxygenen Photosynthese ein. Zuerst begannen Cyanobakterien und Algen damit, die Meere zu besiedeln und dann eroberten Pflanzen die Landmassen der Erde. Im Vergleich dazu geben z.B. Geysire, wie hier im Yellowstone Nationalpark, eine Vorstellung vom Leben auf der Erde, wenn sich die oxygene Photosynthese nicht entwickelt hätte.

1.1 Entstehung der oxygenen Photosynthese und der Thylakoidmembran

Der Prozess der Photosynthese entstand zuerst in einer Form, welche die notwendigen Elektronen aus Schwefelwasserstoff oder einfachen organischen Verbindungen erhält. Diese sogenannte anoxygene Photosynthese kommt in Bakterien vor und beruht auf einem einzelnen Photosystem (Xiong and Bauer, 2002), welches entweder dem Photosystem I (grüne Schwefelbakterien) oder aber dem Photosystem II (Purpurbakterien und grüne Nichtschwefelbakterien) der oxygenen Photosynthese verwandt ist. Ähnlich den Mitochondrien befindet sich bei diesen Organismen das Photosystem auf Einstülpungen der inneren Bakterienmembran, welche jedoch nicht vollständig von dieser abgeschnürt werden. Im Gegensatz dazu nutzt die oxygene Photosynthese zwei Photosysteme, die in Tandem geschaltet sind (Ort and Yokum, 1996). Durch die Ausbildung des sogenannten sauerstoffentwickelnden Apparates (OEC = oxygen evolving complex) können die notwendigen Elektronen aus der Wasserspaltung gewonnen werden und als Beiprodukt dieses Prozesses wird Sauerstoff freigesetzt. Diese Entwicklung begann vor etwa 3,5 – 2,5 Milliarden Jahren und es entstand eine Gruppe oxygen-photosynthetisierender Bakterien, die Cyanobakterien (Xiong and Bauer, 2002). Parallel zur Entstehung der oxygenen Photosynthese kam es zur Ausbildung eines von der inneren Bakterienmembran abgetrennten, eigenständigen Membransystems, den Thylakoiden. Dadurch entstand ein neues Kompartiment innerhalb der prokaryotischen Zelle, das Thylakoidlumen. Die Thylakoidmembran stellt die einzige bekannte interne Kompartimentierung von Bakterienzellen dar. Thylakoide finden sich ausschließlich in Organismen mit oxygenen Photosynthese und sie scheinen notwendig zu sein, damit dieser Prozess effizient vonstatten geht.

1.2 Endosymbiotische Entstehung der Chloroplasten und Entwicklung der verschiedenen Plastidenformen

Alle Chloroplasten gehen nach heutiger Ansicht auf einen singulären endosymbiotischen Vorgang zurück (Mereschkovsky, 1905; Margulis, 1979; Palmer et al., 2000). Hierbei wurde ein freilebendes, photosynthetisches Cyanobakterium von einer Wirtszelle aufgenommen, die bereits mit Mitochondrien ausgestattet war. Im Laufe der Entwicklung wurde der

Endosymbiont mehr und mehr seiner Selbständigkeit beraubt und letztendlich in ein Zellorganell umgewandelt. Dabei spielte insbesondere massiver Gentransfer aus dem Endosymbiont in den Zellkern eine entscheidende Rolle, da so die Wirtszelle die Kontrolle über das entstehende Organell übernahm (Martin and Herrmann, 1998; Abdallah et al., 2000). Besonders wichtig für die weitere Entwicklung war, dass der Endosymbiont seine Fähigkeit zur oxygenen Photosynthese in das Reich der Eukaryonten transferierte.

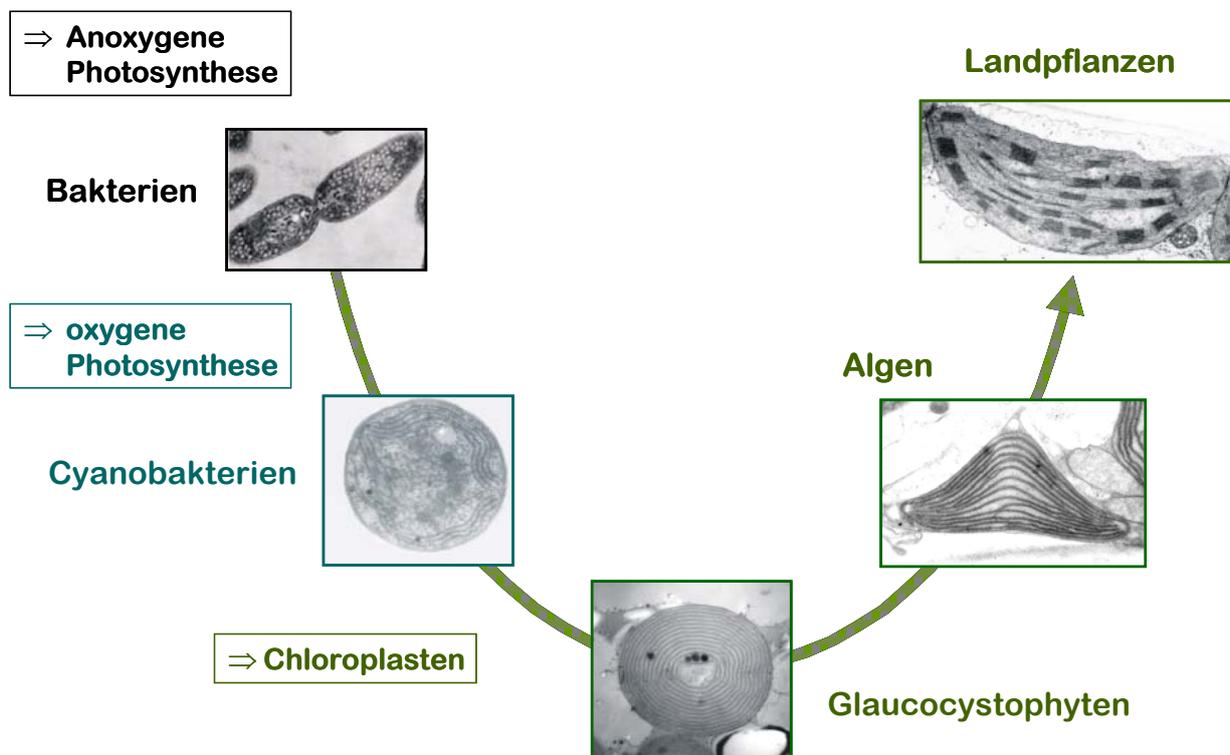


Fig. 2: Der Prozess der Photosynthese entstand zuerst anaerob in Bakterien. In den Vorfahren heutiger Cyanobakterien entwickelte sich dann die oxygene Photosynthese. Über die endosymbiotische Entstehung der Chloroplasten kam die oxygene Photosynthese in das Reich der Eukaryonten, von wo die Entwicklung zu den heutigen Landpflanzen verlief. Damit verbunden war eine stetige Differenzierung der photosynthetischen Membran von Einstülpungen der Plasmamembran in den Bakterien, zu den einfach strukturierten Thylakoiden der Cyanobakterien und Algen, bis letztlich zu dem komplexen Membransystem in den Chloroplasten der Landpflanzen.

Das aus dieser Endozytobiose hervorgegangene Organell, der Chloroplast, ist mit seiner ihn umgebenden Doppelmembran und dem zusätzlichen internen Membransystem, den Thylakoiden, dem Cyanobakterium strukturell noch sehr ähnlich (Fig. 2). Dies ist besonders in den *Glaucocystophyten* sichtbar, die sogar noch eine Peptidoglycanschicht zwischen ihren beiden Hüllmembranen besitzen. Nach der Entstehung des ersten photosynthetischen Eukaryoten haben sich dann im Laufe der Evolution verschiedene Linien von Organismen ausgebildet, die auch heute noch auf der Erde present sind (Bhattacharya and Medlin, 1998; Moreira and Philippe, 2001). Nur eine dieser Linien führte dabei zur Entstehung der Landpflanzen. Dabei änderte sich im Laufe der Entwicklung die Struktur der Thylakoide. Im Vergleich zu den Chloroplasten Höherer Pflanzen sind die Thylakoide der Cyanobakterien relativ einfach geformt und es existiert noch keine Differenzierung in Granastapel und Stromalamellen. Diese einfache Struktur ist auch in den meisten Algen erhalten geblieben. Einige Grünalgen zeigen jedoch bereits eine beginnende Differenzierung der Thylakoide. Zwei bis drei Membranen verlaufen dabei über weite Bereiche parallel zu einander. Dies wird als eine frühe Form der Granastapelung angesehen (Stefansson et al., 1997). Die Differenzierung der Thylakoide setzt sich in der Gruppe der Charophyten weiter fort. Dieses sind hoch entwickelte Grünalgen, von deren Linie sich die Landpflanzen abzweigen (Bhattacharya and Medlin, 1998; Moreira and Philippe, 2001). Erst mit den Moosen, den ursprünglichsten Landpflanzen, beginnt jedoch die komplexe Struktur von Granathylakoidstapeln, die durch Stromalamellen miteinander vernetzten sind, und wie sie für alle Landpflanzen charakteristisch ist (Fig. 2).

Neben der Entwicklung einer komplexen Thylakoidstruktur kam es während der Evolution photosynthetischer Organismen noch zu einer weiteren, wichtigen Veränderung dieses Organells. Die insbesondere für Landpflanzen charakteristische Biogenese von Chloroplasten aus unscheinbaren, nahezu membranfreien Proplastiden ist eine eigenständige Weiterentwicklung, die ihren Ursprung nicht im cyanobakteriellen Endosymbionten hat. Desgleichen gilt für die Entstehung nicht-photosynthetischer Plastiden: der Etio-, Chromo- und Leukoplasten. Zu Beginn der Chloroplastenentwicklung könnten die ersten internen Membranen durch langgestreckte Einstülpungen der inneren Hüllmembran des Proplastiden entsethen, die sich abschnüren und in die Mitte des Organells wandern (von Wettstein, 1959; Mühlenthaler and Frey-Wyssing, 1959). Bereits nach kurzer Entwicklungszeit sind solche

Einstülpungen jedoch nicht mehr festzustellen. Statt dessen kann man im Stroma zwischen Hüllmembran und Thylakoiden vesikuläre Strukturen beobachten, welche nach neueren Untersuchungen Bestandteil eines chloroplastidären Vesikeltransportsystems sind (siehe 2.2.2). Vesikeltransport ist im Cytosol der eukaryotischen Zelle zwar weit verbreitet, ist in prokaryotische Organismen und endosymbiotische Organellen jedoch nicht beschreiben. Das Vorkommen eines solchen Transportsystems innerhalb des Chloroplasten ist daher um so bemerkenswerter. Dieses Vesikeltransportsystem könnte an der weiteren Synthese und der Modulation der Thylakoide beteiligt sein. Wichtige Bestandteile der Thylakoidmembran werden an der inneren Hüllmembran synthetisiert oder über diese in den Chloroplasten transportiert (Joyard et al., 1998). Dazu zählen die Membranlipide selber, aber auch Proteine, Pigmente und andere Co-Faktoren der Photosysteme. Viele dieser Komponenten sind hydrophob und können daher nicht ohne weiteres das Stroma durchqueren. Die Frage nach dem ‚Wie‘ der Thylakoidsynthese tritt dabei in der Umwandlung von Proplastiden zu Chloroplasten am deutlichsten zu Tage; dieses Problem betrifft aber natürlich auch die Chloroplasten von Algen und die Thylakoide der Cyanobakterien. Hier muss nach einer Teilung das Thylakoidsystem entsprechend dem Zell- bzw. Organellwachstum vergrößert werden. Darüber hinaus ist davon auszugehen, dass auch die Anpassung der Photosyntheseleistung an wechselnde Umweltbedingungen mit einem Umbau der Thylakoidmembran einhergeht. Bei der Umwandlung von Chloroplasten in Chromo- oder Leukoplasten, z.B. bei der Fruchtreife, ist es insbesondere der Rückbildung der Thylakoidmembran, der bewältigt werden muss.

1.3 Regulation der Chloroplastenentwicklung und der Thylakoidbiogenese

Im Lebenszyklus der Cyanobakterien verläuft die Thylakoidbiogenese sehr einheitlich. Bei der Zellteilung werden etwa gleiche Anteile Thylakoidmembranen an die Tochterzellen weitergeben. Davon ausgehend wird die Membran während des Zellwachstums weiter vergrößert, aber nicht wesentlich verändert. Cyanobakterien leben, anders als anaerob photosynthetische Bakterien, obligat aerob. Es findet kein Wechsel zwischen photosynthetischen und nicht-photosynthetischen Lebensphasen statt. Änderungen der

Thylakoidmembranzusammensetzung dienen daher im wesentlichen dem Wachstum und der Anpassung an wechselnde Lichtverhältnisse.

Im Gegensatz dazu sind die Chloroplasten der Landpflanzen einem viel größerem Anpassungsdruck ausgesetzt. Folglich unterliegt die Chloroplastenentwicklung einer strikten Regulation sowohl durch die umgebende Zelle, als auch durch den metabolischen Zustand des Organelles selber. Diese Regulation betrifft insbesondere die Thylakoidmembran und ihre für die Photosynthese notwendigen Komponenten. Alle an der Photosynthese beteiligten Multiproteinkomplexe, aber auch viele metabolische Synthesewege des Chloroplasten, bestehen aus Komponenten, die zum Teil im Kern und zum Teil im Organell selber kodiert sind. Daher benötigen so ziemlich alle plastidären Funktionen das Zusammenspiel von Zellkern und Plastom. Ein komplexes Regulationsnetzwerk stellt sicher, dass nukleäre und plastomische Transkription aufeinander abgestimmt sind. Darüber hinaus finden regulatorische Prozesse auch auf der Ebene der Translation und bei post-translationalen Prozessen statt (Gray et al., 2002; Jarvis, 2003). So wird z.B. der Import verschiedener kernkodierter Proteine differenziell kontrolliert, aber auch der Zusammenbau der Proteinkomplexe oder die Koordination mit nicht-proteinösen Co-Faktoren dienen als Ansatzstelle für regulatorische Prozesse. Viele dieser Faktoren sind kernkodiert und dienen der Kontrolle des Organelles durch die Zelle. Gleichzeitig gibt es jedoch auch ein Feedback der Plastide an den Kern. Dieses oft als Plastidenfaktor bezeichnete Signal beeinflusst die Expression kernkodierter Plastidenproteine.

Diese Feedbacksignale des Chloroplasten sind bis heute nur wenig verstanden. Allerdings gibt es Hinweise, dass dabei der Chlorophyllvorstufe Mg-Protoporphyrin IX eine Schlüsselstellung zukommt (Mochizuki et al, 2001). Mg-Protoporphyrin IX ist die erste spezifische Vorstufe der Chlorophyllsynthese. Bis zum Protoporphyrin IX verlaufen die Synthese von Häm und Chlorophyll gleich. Danach entscheidet der Einbau von Eisen durch die Ferro-Chelatase oder von Magnesium durch die Magnesium-Chelatase über den weiteren Syntheseweg (Papenbrook and Grimm, 2001). Interessanterweise scheint es das Mg-Protoporphyrin IX selber zu sein, welches als Signalmolekül agiert (Strand et al., 2003). Auf welche Weise es diese Funktion wahrnimmt, ist jedoch noch nicht geklärt.

2. Arbeiten zur Habilitation

Die Entwicklung der oxygenen Photosynthese war ein wesentlicher Schritt in der Entwicklung heutigen Lebens. Sowohl in Cyanobakterien als auch in Chloroplasten ist die oxygene Photosynthese dabei mit der Entwicklung der Thylakoidmembran verbunden. Aufgrund der speziellen Architektur der Photosysteme in diesem Membransystem können Cyanobakterien und Pflanzen Sonnenenergie in chemische Energie umwandeln, und dies mit einer Effizienz, die jeglichen von Menschenhand entworfenen photovoltischen Systemen deutlich überlegen ist. Daher ist die Fähigkeit diese Membran auszubilden und an wechselnde Umweltbedingungen anzupassen eine entscheidende Eigenschaft der Zelle. Dank der Kombination zahlreicher physiologischer, struktureller, biochemischer und genetischer Analysen gibt es heute fundierte Kenntnisse über die Struktur und Komposition der Thylakoidmembran und der in ihr residierenden Komplexe. Was jedoch weitgehend fehlt, sind Einblicke in die molekularen Prozesse, welche an der Entstehung, Ausbildung und Anpassung der Membran selber beteiligt sind. Auch spezifische Proteine und andere Faktoren, die für die Ausbildung der Membran benötigt werden, sind zumeist unbekannt. Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit war es solche Komponenten zu identifizieren und zu charakterisieren.

2.1 Die Chlorophyllbiosynthese als regulatorische Komponente der Chloroplastenbiogenese

Die Chlorophyllbiosynthese ist ein wichtiger Prozess nicht nur für die Funktion der Photosynthese, sondern auch für die Regulation der Chloroplasten- bzw. Thylakoidbiogenese. Um das Auflaufen potentiell toxischer Zwischenprodukte der Chlorophyllsynthese zu verhindern, wird der gesamte Syntheseweg durch Feedbackhemmung schon in seinen frühen Schritten reguliert (Papenbrook and Grimm, 2001). Darüber hinaus findet eine von verschiedenen Umweltfaktoren, wie z.B. Licht, abhängige Regulierung der Transkription und Translation verschiedener Schlüsselenzyme statt. So stellt die Glutamyl-tRNA Reduktase (GluTR), das zweite Enzym des C₅-Weges, auf dem die gemeinsame Vorstufe aller Tetrapyrrole gebildet wird, einen wesentlichen Ansatzpunkt für die Feedbackhemmung der

Chlorophyllbiosynthese dar. Die Aktivität von GluTR ist *in vitro* sowohl durch Häm als auch durch Protochlorophyllid hemmbar (Dörnemann et al., 1989; Pontoppidan and Kannangara, 1994). Beides sind Endprodukte bzw. späte Intermediate der Häm- bzw. Chlorophyllbiosynthese. Bei Überexpression des Gerstenproteins in *E. coli* bildet die GluTR einen Komplex von etwa 250 kDa, was ihrem nativen Zustand in den Chloroplasten entspricht (I-13). Dies zeigt, dass dieser Komplex auch bei heterologer Expression gebildet werden kann. Wesentlich interessanter ist die Tatsache, dass das Protein selbst eine Häm-Gruppe gebunden trägt (I-13). In einer durch Natriumdithionit erzeugten reduzierten Form zeigt das in heterolog exprimierte Protein drei charakteristische Absorptionsmaxima bei 424, 560 und 582 nm. Oxidation durch $K_3Fe(CN)_6$ hingegen führte zu einer fast vollständigen Reduzierung dieser Absorption. Die beobachteten Absorptionsmaxima entsprechen ziemlich genau der α -, β - und γ -Absorptionsbande von Cytochrom und legen nahe, dass die GluTR mit einer cytochrom-ähnlichen Hämgruppe assoziiert vorliegt. Diese Annahme wird dadurch unterstützt, dass die Überexpression von GluTR in Anwesenheit von ^{14}C -markierter 5-Aminolävulinsäure (Vorstufe von Häm und Chlorophyll) zu einer signifikanten radioaktiven Markierung des gereinigten Proteins führt (I-13).

Diese mit der GluTR assoziierte Hämgruppe steht nicht im direkten Zusammenhang zur Hemmbarkeit des Enzymes durch Häm, denn beide sind an unterschiedlichen Stellen im Protein lokalisiert. Wichtig für die Hemmung durch Häm ist eine etwa 30 Aminosäuren umfassende N-terminale Domäne (I-10). Exprimiert man GluTR von Gerste ohne diese Domäne, so bleibt die katalytische Aktivität des Proteins erhalten. Das Enzym ist nun jedoch nicht mehr durch Häm inhibierbar, was zeigt, dass diese Domäne zwar für die Hemmung essentiell ist, nicht aber an der katalytischen Aktivität des Proteins beteiligt ist. Interessanterweise ist diese N-terminale Domäne spezifisch für die GluTRs von Landpflanzen; in den GluTR der Bakterien und Cyanobakterien kommt sie nicht vor (I-10). Dies legt nahe, dass die Feedbackregulation eine spezifische Anpassung an die Verhältnisse in den Chloroplasten der Landpflanzen darstellt. Weder diese Regulation noch die Funktion der Hämgruppe im katalytisch aktiven Protein sind bis heute jedoch wirklich verstanden.

Ein weiteres Schlüsselenzym der Chlorophyllbiosynthese ist die Protoporphyrin-IX-Mg-Chelatase (Mg-Chelatase). Dieses Protein baut Magnesium in das Tetrapyrrolgerüst von Protoporphyrin IX ein und ist damit der erste spezifische Schritt der Chlorophyllbiosynthese. Untersuchungen in *Rhodobacter* haben gezeigt, dass ein aus drei Untereinheiten bestehendes

Holoenzym für die Synthese von Mg-Protoporphyrin-IX verantwortlich ist (Gibson et al., 1995). Untersuchungen an Gerste konnten zeigen, dass auch die Mg-Chelatase von Pflanzen eine ähnliche Komposition aufweist (I-14). Ausgangspunkt dieser Untersuchungen waren eine Reihe chemisch erzeugter Gerstemutanten; darunter Mutanten aller für die drei Untereinheiten der Mg-Chelatase kodierender Gene. In allen Mutanten ist keine Aktivität der Mg-Chelatase messbar und die Pflanzen bleiben auch im Licht gelb, da kein Chlorophyll jedoch Carotinoide gebildet werden. (I-14). Interessanterweise zeigen die Mutantpflanzen zusätzlich eine deutliche Reduzierung in der Aktivität der Mg-Protoporphyrin-Methyltransferase, dem nachfolgendem Enzym der Chlorophyllbiosynthese (I-14). Dies deutet darauf hin, dass die Aktivität dieser beiden Enzyme zumindest teilweise gekoppelt ist. Trotz der Unterbrechung der Mg-Chelatase läuft in keiner dieser Mutanten Protoporphyrin-IX auf. Erst nach Zugabe von 5-Aminolävulinsäure werden die Blätter durch akkumulierendes Protoporphyrin-IX rötlich gefärbt. Der Grund liegt in einer Feedbackhemmung akkumulierender Chlorophyllvorstufen auf die frühen Schritte der Chlorophyllbiosynthese, insbesondere der GluTR (siehe oben). Diese Feedbackhemmung verhindert, dass sich in den Chloroplasten potentiell gefährliche Intermediate der Chlorophyllsynthese anhäufen.

Untersuchungen in *Arabidopsis* haben Hinweise ergeben, dass Mg-Protoporphyrin IX auch als Signalmolekül für die Regulation der Chloroplastenbiogenese wichtig ist (Mochizuki et al., 2001). Es stellt sich allerdings die Frage, ob nicht auch die Mg-Chelatase selber eine direkte Rolle in diesem Prozess besitzt. Die drei Untereinheiten des Enzyms bilden keinen festen Komplex, sondern kommen nur zur Bildung von Mg-Protoporphyrin IX temporär zusammen. Ausserhalb dieses Komplexes liegen die beiden Untereinheiten Chl-H und Chl-I löslich im Stroma des Chloroplasten vor (I-12). Gänzlich anders hingegen verhält sich die Chl-D Untereinheit der Mg-Chelatase von Gerste. Sie zeigt während der Isolierung eine starke Assoziation mit den chloroplastidären Ribosomen und kann mit diesen zusammen isoliert werden (I-12). Darüber hinaus inhibieren sowohl Chloramphenicol als auch *p*-Aminosalicylsäure die Aktivität der Mg-Chelatase (I-12). Chloramphenicol inhibiert die Peptidyltransferaseaktivität der Ribosomen, während *p*-Aminosalicylsäure RNA-Protein Interaktionen unterbricht. Es ist möglich, dass die Assoziation von Mg-Chelatase mit den chloroplastidären Ribosomen dazu dient, die Chlorophyllsynthese mit der Proteinsynthese zu koordinieren.

2.2 Untersuchungen zu Komponenten der Thylakoidbiogenese

2.2.1 Vipp1 als ubiquitäre Komponente der Thylakoidbiogenese

Das Vipp1 (vesicle inducing protein in plastids 1) Protein wurde zuerst aufgrund seiner dualen Lokalisierung sowohl in der Hüllmembran als auch in den Thylakoiden von Erbsenchloroplasten beschrieben (Li et al., 1994). Erste Anhaltspunkte auf die Funktion von Vipp1 ergaben Untersuchungen an der *Arabidopsis thaliana* Mutante *hcf155* (Δ *vipp1*), welche eine tDNA Insertion im Promotor des *vipp1* Gens enthält (I-5). Da das Genom von *Arabidopsis* nur eine Genkopie für *vipp1* aufweist, führt die Mutation zu einer drastischen Reduzierung von Vipp1 in den Chloroplasten dieser Mutante. Die Mutante wächst nur heterotroph; bei einer Anzucht der Pflanzen auf Erde oder auf Medium ohne Zuckerzusatz erweist sich die Mutation als letal. Wächst die Mutante auf Medium mit Zuckerzusatz, so sind die ersten sich entwickelnden Blätter noch leicht grün gefärbt, zeigen aber bereits einen typischen High-Chlorophyll-Fluoreszenz Phänotyp, welcher darauf hinweist, dass die Photosynthese nicht optimal abläuft. Ältere Blätter sind zumeist vollständig weiß und die Mutante entwickelt einen albinotischen Phänotyp (I-5). Nur selten kann eine solche Pflanze bis zur Blüte gebracht werden und die sich entwickelnden Samen sind nicht keimungsfähig.

Elektronenmikroskopische Analysen von Mesophyllzellen ergaben, dass der Ausfall von Vipp1 mit einem Verlust des Thylakoidmembransystems einhergeht (I-5). Die jungen, noch leicht grünen Blätter besitzen noch einige wenige Thylakoide, die jedoch bereits nicht mehr zu einem zusammenhängenden Membransystem verbunden sind. In älteren Blättern liegen keine Thylakoidmembranen mehr vor (Fig. 3). Darüber hinaus zeigten weitere Untersuchungen der Mutante, dass es in dieser keinen chloroplastidären Vesikeltransport mehr gibt (siehe 2.2.2), was zu der Annahme führte, dass dem Vipp1 Protein eine essentielle Rolle in diesem Prozess zukommt. Da angenommen wird, dass der chloroplastidäre Vesikeltransport an der Thylakoidbiogenese beteiligt ist, würde dies die fehlende Thylakoidbildung erklären. Aufgrund weitergehender Untersuchungen ist jedoch nicht auszuschliessen, dass der Einfluss der *vipp1* Mutation auf den chloroplastidären Vesikeltransport indirekter Natur ist, und die Funktion von Vipp1 an einer anderen Stelle der Thylakoidbiogenese liegt (I-2; I-4). Nichtsdestotrotz liefern diese Befunde einen Hinweis

darauf, dass in den Chloroplasten der Landpflanzen die Thylakoidbiogenese und der Vesikeltransport korreliert sind (siehe unten).

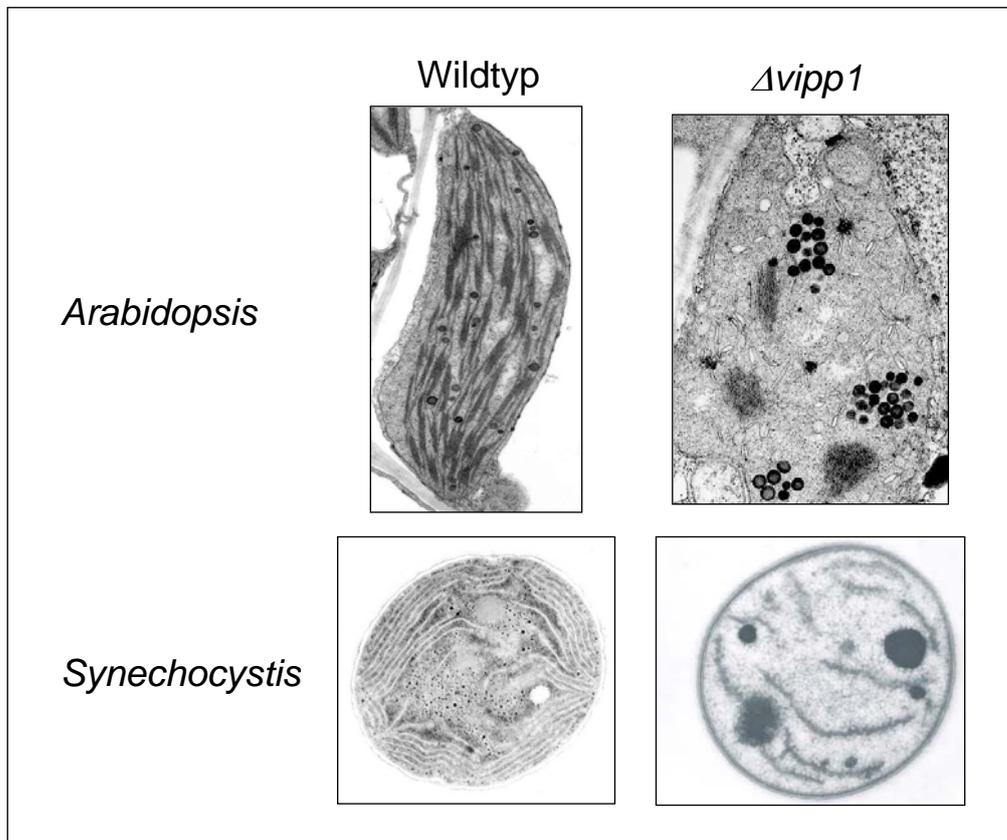


Fig. 3: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von typischen Chloroplasten aus *Arabidopsis* Wildtyp Pflanzen und der *hcf155* Mutante im Vergleich zu *Synechocystis* Zellen von Wildtyp und $\Delta vipp1$ Mutante. Sowohl in der Pflanze wie auch im Cyanobakterium führt die Mutation zu einem Verlust der Thylakoidmembranen. In *Arabidopsis* ist zusätzlich die Vesikelbildung im Chloroplasten gestört (nicht gezeigt).

Dass die Funktion von Vipp1 über den Vesikeltransport in Chloroplasten der Landpflanzen hinausgeht, zeigt sich unter anderem darin, dass dieses Protein auch in anderen Organismen vorhanden ist, welche oxygene Photosynthese betreiben und ein Thylakoidsystem besitzen (I-4). Da die meisten dieser Organismen nicht über ein Vesikeltransportsystem zu den Thylakoiden verfügen (I-2) (siehe 3.1.2), schließt sich eine auf den Vesikeltransport

beschränkte Funktion von Vipp1 aus. So zeigen Zellen des Cyanobakteriums *Synechocystis* nach der Unterbrechung des *vipp1* Gens durch die Insertion einer Kanamycinkassette einen Phänotyp vergleichbar der *hcf155* Mutante von *Arabidopsis* (Fig. 3). Die Mutantenzellen sind im Vergleich zum Wildtyp nur noch hellgrün gefärbt und auch hier kommt es zu einem fast vollständigen Verlust an Thylakoiden (I-4). Ein Totalverlust von photosynthetischen Membranen wird verhindert, da die Mutante nicht vollständig segregierbar ist. Dies spricht dafür, dass die Funktion von Vipp1 für *Synechocystis* essentiell ist. Diese Vermutung wird dadurch gestützt, dass es auch in *Arabidopsis* keinen vollständigen Knock-out des *vipp1* Genes gibt. *hcf155* ist eine Promotormutante, welche den Gehalt des Vipp1 Proteins auf unter 20 % der Wildtypmenge reduziert, die Expression des *vipp1* Genes jedoch nicht vollständig unterbindet. Der reduzierte Level an Vipp1 reicht jedoch in beiden Organismen nicht für die Ausbildung der Thylakoidmembran, und Untersuchungen an der $\Delta vipp1$ Mutante von *Synechocystis* ergaben, dass die verbleibenden Membranfragmente keine positive Nettphotosyntheseleistung ermöglichen (I-4).

Vipp1 zeigt eine große Ähnlichkeit zum sogenannten ‚Phage Shock Protein A‘ (PspA) aus Bakterien (I-1, I-4, I-5). In *E. coli* ist *pspA* Teil eines fünf Proteine umfassenden Operons, das bei Infektion des Bakteriums mit filamentösen Phagen oder unter anderen Stressbedingungen induziert wird (Brissette et al., 1991; Dworkin et al., 2000; Elderkin et al., 2002). PspA kommt in vielen Bakterien und fast allen Cyanobakterien vor, allerdings ist nicht überall das gesamte Operon erhalten. Interessanterweise wird *pspA* unter anderem durch eine Hemmung der Fettsäurebiosynthese (Bergler et al., 1994) und durch eine Blockierung des Sec- oder des Tat-Weges zur Insertion von Membranproteinen induziert (Kleerebezem et al., 1994; DeLisa et al., 2004). Phylogenetische Analysen haben gezeigt, dass *vipp1* aller Wahrscheinlichkeit nach in den Vorläufern heutiger Cyanobakterien aus einer Duplikation des *pspA* Gens entstanden ist (I-4). Die meisten der bis heute untersuchten Cyanobakteriengenome enthalten dabei sowohl ein *pspA* als auch ein *vipp1* Gen. Unsere Untersuchungen legen nahe, dass die Funktionen von PspA und Vipp1 nicht redundant sind. Ein *pspA* Gen wurde bisher im Genom eukaryotischer, photosynthetischer Organismen nicht gefunden. Es ist daher davon auszugehen, dass PspA seine Funktion in den Chloroplasten eingebüßt hat und im Laufe der Evolution der Pflanzen verlorengegangen ist.

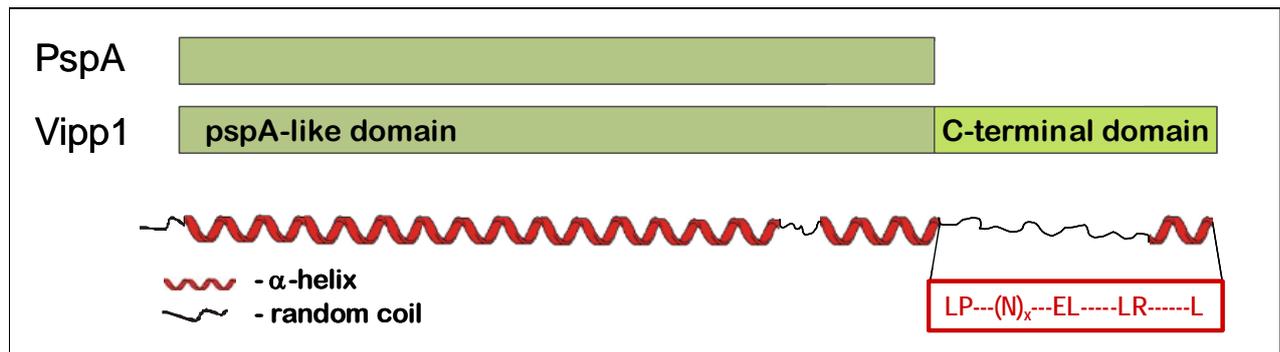


Fig. 4: Vergleich der Sekundärstruktur von PspA und Vipp1. Alle Vipp1 Proteine besitzen zusätzlich zu einer pspA-ähnlichen Domäne noch eine C-terminale Erweiterung, die innerhalb der Vipp1 Proteine strukturell und in einigen Positionen auch auf Ebene der Aminosäuresequenz konserviert ist.

Innerhalb eines Organismus, z.B. *Synechocystis*, weisen PspA und Vipp1 nur noch eine etwa 40 % Identität bzw. 60 % Ähnlichkeit der Aminosäuresequenz auf. Im Vergleich verschiedener Vipp1 und PspA Proteine, auch aus sehr unterschiedlichen Organismen, fällt jedoch auf, dass die Sekundärstruktur des Proteins weitestgehend erhalten geblieben ist (I-1, I-4). Sowohl PspA als auch Vipp1 sind im wesentlichen alpha-helikal. In Abhängigkeit vom verwendeten Programm können dabei 3 – 4 helikale Bereiche unterschieden werden, die durch kurze ungeordnete Bereiche unterbrochen werden. An mehreren Stellen besitzen diese Helices die Möglichkeit eine typische 'Coiled-Coil' Struktur auszubilden, welche unter anderem für Protein-Protein Wechselwirkungen Verwendung findet. Besonders interessant ist dabei, dass sich alle Vipp1 Proteine von den PspA Proteinen durch eine etwa 30 Aminosäuren lange, C-terminale Verlängerung unterscheiden (Fig. 4). Diese besitzt eine Reihe konservierter Aminosäuren, die ähnlich einem verkürzten Leucin-Zipper angeordnet sind. Diese C-terminale Domäne ist mit dem N-terminalen Teil des Proteins durch ein konserviertes Leucin-Prolin-Paar und einen Bereich von variabler Aminosäureanzahl und -sequenz verbunden. Untersuchungen an der $\Delta vipp1$ Mutante von *Synechocystis* weisen darauf hin, dass die C-terminale Domäne für die Funktion von Vipp1 in der Thylakoidbiogenese notwendig ist (I-4). Weder konnte das in der Mutante immer noch exprimierte PspA die Funktion von Vipp1 ersetzen, noch gelang dies durch die Expression von Vipp1, welches um die C-terminale Domäne verkürzt worden war.

Die Ähnlichkeit zwischen PspA und Vipp1 geht über die Sekundärstruktur hinaus. Beide Proteine sind in der Lage einen hochmolekularen homomultimeren Komplex zu bilden (I-1) (Hankamer et al., 2004). Erste Hinweise darauf hatten Quervernetzungsversuche von Vipp1 in angereicherten Hüllmembranen von Erbsenchloroplasten ergeben, die ein charakteristisches Bandenmuster aufwiesen, welches einem Dimer, Tetramer und Oktamer von Vipp1 entsprachen. Eine BN-PAGE Analyse von solubilisierten Chloroplastenproteinen zeigte darüber hinaus die überwiegende Menge des Vipp1 Proteins im hochmolekularen Bereich des Gels. Dies galt für alle untersuchten Organismen inklusive *Synechocystis* und der Grünalge *Chlamydomonas*, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Komplexbildung von Vipp1 universell ist (I-1). Weitergehende Untersuchungen mit in *E. coli* heterolog exprimiertem Vipp1 Protein von *Arabidopsis* zeigten, dass der Komplex allein durch Vipp1 gebildet werden kann. Gelfiltrationsanalysen nach hat er eine Größe von über 2000 kDa. Untersuchungen des aufgereinigten Komplexes durch negative Anfärbung und elektronenmikroskopische Analyse konnten dieses Ergebnis bestätigen. Sie zeigen, dass die Vipp1 Moleküle ringförmig angeordnet sind und der Komplex eine Dimension von 400 Å im Durchmesser und eine Höhe von etwa 120 Å besitzt (Fig. 5). Der Innendurchmesser des Ringes beträgt etwa 140 Å. Eine ähnliche strukturelle Anordnung wie für Vipp1 wurde fast zeitgleich auch für PspA von *E. coli* beschrieben (Hankamer et al., 2004), wobei der von PspA gebildete Komplex jedoch nur etwa halb so groß ist. Entsprechend kleiner sind auch die für PspA ermittelten Dimensionen. Dies ist eine indirekte Bestätigung dafür, dass die C-terminale Domäne von Vipp1 nicht für die Komplexbildung notwendig ist. Darüber hinaus legen diese Befunde nahe, dass die Komplexstruktur sowohl für die Funktion von Vipp1 als auch PspA von Bedeutung ist. Auch wenn die genaue Funktion weder von PspA noch von Vipp1 zu Zeit bekannt ist, kann man aufgrund dieser Ergebnisse annehmen, dass beide Proteine eine zumindest vergleichbare katalytische Aktivität haben. Umso interessanter ist es daher, warum im Zuge der Entwicklung der Thylakoidmembran ein weiteres Protein benötigt wurde, und was die spezifische Funktion der C-terminalen Domäne ist, welche diese beiden Proteine voneinander unterscheidet.

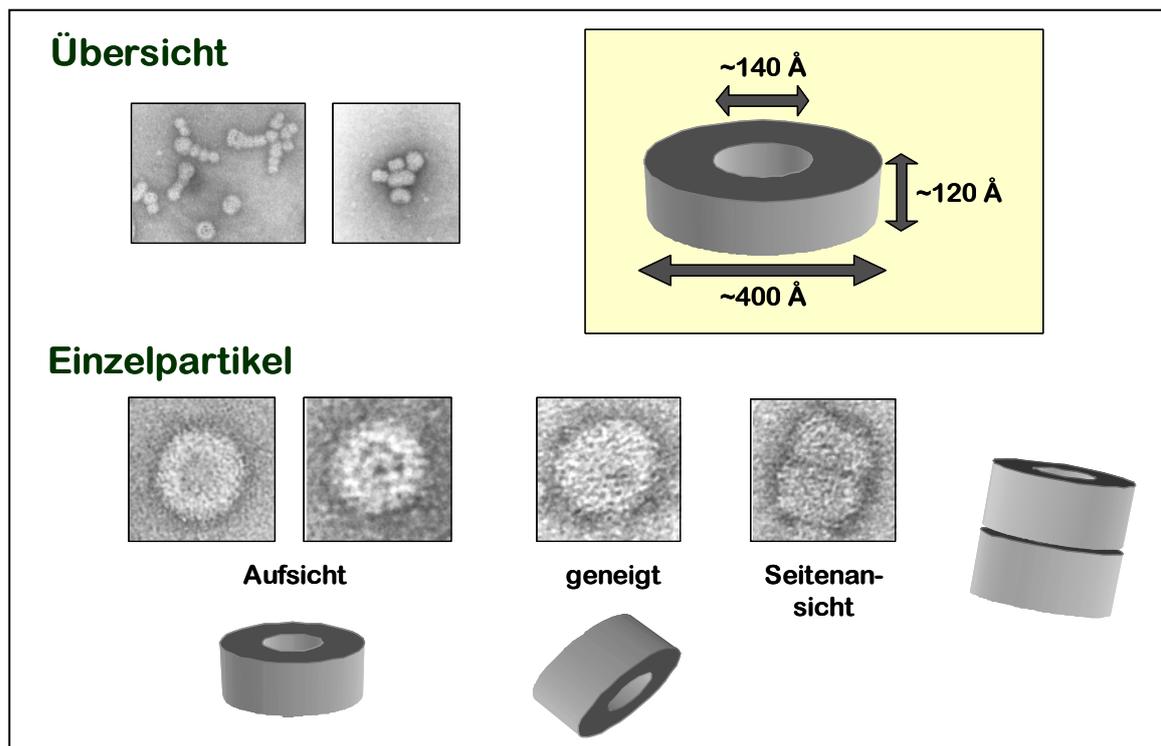


Fig. 5: Untersuchungen des heterolog in *E. coli* exprimierten Vipp1 Komplexes mittels Kontrastanfärbung und elektronenmikroskopischer Analyse ergaben eine ringförmige Struktur. Einzelpartikel hatten eine durchschnittliche Dimension von 400 Å in der Breite und etwa 120 Å in der Höhe. Der Innendurchmesser des Ringes beträgt etwa 140 Å.

Der Vipp1-Komplex ist sehr stabil. 4 M Guanidium-Thiocyanat ist notwendig, um ihn in seine monomeren Untereinheiten zu zerlegen. Im Vergleich dazu bleibt der Komplex in Guanidium-HCl teilweise erhalten, was dafür spricht, dass starke hydrophobe Wechselwirkungen an der Interaktion der Vipp1 Moleküle beteiligt sind. Auch schützt die Komplexbildung Vipp1 weitgehend vor proteolytischem Abbau durch Proteasen wie Trypsin (I-1). Während monomeres Vipp1 von Trypsin vollständig abgebaut wird, bleibt die pspA-ähnliche Domäne im Komplex vor der Proteolyse geschützt. Der Vipp1-spezifische C-Terminus wird jedoch abgedaut. BN-PAGE Analysen nach Trypsinverdau haben bestätigt, dass Vipp1 auch ohne den C-Terminus noch als Komplex vorliegt (I-1). Gelfiltrationsanalyse von in *E. coli* heterolog exprimiertem Vipp1 Δ -cterm (Vipp1 Protein ohne die C-terminale Domäne) konnten dieses Ergebnis bestätigen. Daraus läßt sich folgern, dass a) alleinig die pspA-ähnliche Domäne an der Komplexbildung beteiligt ist und b) die C-terminale Domäne

an der Oberfläche des Komplexes exponiert vorliegt und so der Protease zugänglich ist. Anbindungsversuche mit Chloroplastenlysaten an heterolog exprimiertem und dem C-terminus entsprechenden Peptiden zeigen darüber hinaus eine Anbindung des chloroplastidären Hsp70 Proteins an diese Domäne (Vothknecht, unveröffentlichte Daten). Inwieweit diese Interaktion für die Funktion von Vipp1 eine Rolle spielt, muss noch geklärt werden.

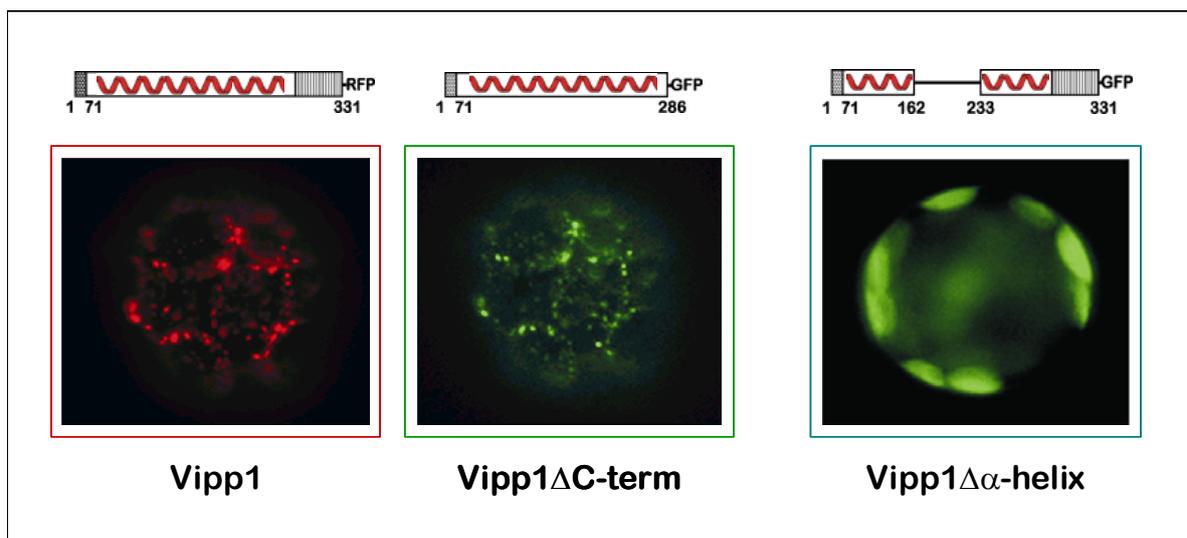


Fig. 6: Transiente Transformation von *Arabidopsis* Mesophyllprotoplasten mit verschiedenen Vipp1-GFP und -RFP Konstrukten. Vipp1-RFP und Vipp1 Δ C-term-GFP wurden in einer Doppeltransformation eingesetzt. Die Ko-Lokalisierung der beiden Proteine zeigt, dass der C-terminus von Vipp1 nicht für die Komplexbildung und Positionierung von Vipp1 im Chloroplasten notwendig ist. Eine Unterbrechung der alpha-helikalen PspA-ähnlichen Domäne hingegen unterbindet die Komplexbildung. Gleichzeitig liegt das Protein gleichmäßig im Stroma des Chloroplasten verteilt vor.

Erzeugt man ein Fusionsprotein von Vipp1 mit GFP (green fluorescence protein) und transformiert damit Mesophyllprotoplasten von Tabak oder *Arabidopsis*, so ist die Lokalisierung des Komplexes im Fluoreszenzmikroskop gut sichtbar (I-1). Der Großteil des Vipp1-Komplexes scheint dabei an der inneren Hüllmembran lokalisiert zu sein (Fig. 5). Ob sich ein Teil von Vipp1, eventuell im monomeren Zustand, auch an der Thylakoidmembran

befindet, läßt sich anhand dieser Versuche nicht ausschließen. Ko-Transformationen von Protoplasten mit Vipp1-RFP und Vipp1 Δ -cterm-GFP bestätigten, dass die C-terminale Domäne nicht für die Komplexbildung notwendig ist, denn beide Proteine sind im Chloroplasten co-lokalisiert. Dies wird auch durch anschließende BN-PAGE Analyse der transformierten Chloroplasten deutlich, die sowohl das GFP- als auch das RFP-Fusionsprotein als Komplex identifizieren. Unterbricht man jedoch die alpha-helikale pspA-ähnliche Domäne, so findet weder eine Komplexbildung noch die Anbindung an die Hüllmembran statt (Fig. 5). Dies ist ersichtlich, da einerseits die GFP-Fluoreszenz gleichmäßig im Stroma verteilt vorliegt und andererseits in der BN-PAGE Analyse nur monomeres Fusionsprotein nachweisbar ist. Aus diesen Versuchen läßt sich schließen, dass entweder die pspA-ähnliche Domäne oder aber die Komplexbildung für die Lokalisierung des Vipp1 Proteins im Chloroplasten verantwortlich ist (I-1).

2.2.2 Ein Vesikeltransportsystem cytosolischen Ursprungs in Chloroplasten

Vesikeltransport ist im Cytosol eukaryotischer Organismen weit verbreitet und liegt vielen Transportvorgängen der Zelle zu Grunde (Bonifacino and Glick, 2004). Wenn auch eine Reihe oftmals unterschiedlicher Faktoren an den verschiedenen Vesikeltransportsystemen in der Zelle beteiligt sind, so verläuft der Prozeß doch im wesentlichen nach einem einheitlichen Muster. Zuerst muss ein Vesikel von der Membran abgeschnürt und dabei sein Cargo in den Vesikel sortiert werden. Anschließend müssen die Vesikel innerhalb der Zellen an ihrem Bestimmungsort transportiert werden. Dabei muss sichergestellt sein, dass sie nur mit ihrer spezifischen Zielmembran fusionieren. Bei der abschließenden Fusion des Vesikels mit der Zielmembran wird dann das Cargo wieder freigesetzt oder im Falle von Membranproteine, werden diese durch die Fusion Bestandteil der Zielmembran.

Im Gegensatz zum Cytosol von Eukaryoten ist Vesikeltransport in Prokaryoten nicht beschrieben. Auch wurden bis dato keine Gene für typische Komponenten von Vesikeltransportsystemen in den vollständig sequenzierten bakteriellen Genomen gefunden. Es muss also zur Zeit davon ausgegangen werden, dass es sich um ein Transportsystem handelt, welches auf der Stufe der Eukaryoten entstanden ist. Da der Chloroplast aufgrund seiner Abstammung von den Cyanobakterien dem Grundsatz nach prokaryotischen Ursprungs

ist, ist das Vorkommen von Vesikeltransport in diesem Organell eigentlich nicht zu erwarten. Bereits frühe elektronenmikroskopische Untersuchungen haben jedoch gezeigt, dass vesikelähnliche Strukturen im Stroma von Chloroplasten Höherer Pflanzen zu beobachten sind (von Wettstein, 1959; Mühlethaler and Frey-Wyssling, 1959). Dass diese Strukturen Teil eines Vesikeltransportsystems innerhalb des Organells darstellen, konnte jedoch aufgrund dieser Befunde nur vermutet werden.

Behandelt man Blattstücke Höherer Pflanzen, wie Erbse oder *Arabidopsis*, mit niedrigen Temperaturen, so kommt es zu einem Auflaufen von Vesikeln im Stroma der Chloroplasten (Morre et al., 1991) (I-2; I-3). Diese Versuche ergaben die ersten biochemischen Hinweise, dass ein Vesikeltransportsystem im Chloroplasten existiert, an dem ähnliche Mechanismen beteiligt sind, wie sie aus der Exo- und Endocytose im Cytosol eukaryotischer Zellen bekannt sind (Bonifacino and Glick, 2004). Da es eine Reihe von Inhibitoren gibt, welche auf verschiedene Schritte des cytosolischen Vesikeltransportes einwirken, war die Frage, ob diese auch einen Effekt auf die Chloroplasten zeigen. In der Tat kommt es nach Behandlung von Blattstücken mit Microcystin LR zu einem Auflaufen von Vesikeln im Chloroplasten (I-2; I-3). Microcystin LR ist ein spezifischer Inhibitor für eukaryotische Protein Phosphatasen der Klasse 1 und 2a; darüber hinaus ist Protein Phosphatase 1 (PP1) als Komponente der Vesikelfusionsmaschinerie in Hefe beschrieben (Mayer, 2002).

Bei einer Behandlung intakter Blätter kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den in den Chloroplasten beobachteten Vesikelanhäufungen um einen indirekten Effekt eines im Cytosol betroffenen Prozesses handelt. Erst die Etablierung eines Systems, welches es erlaubt, die Bildung und Fusion von Vesikeln an isolierten Chloroplasten zu untersuchen, bot die Möglichkeit den chloroplastidären Vesikeltransport unabhängig von der umgebenden Zelle zu analysieren (I-3). Dabei zeigte sich, dass isolierte Chloroplasten tatsächlich zur Bildung von Vesikeln in der Lage sind, und diese bei Behandlung des Organelles mit Kälte oder Microcystin LR im Zwischenraum von innerer Hüllmembran und Thylakoiden auflaufen. Dabei kann man den Prozess der Vesikelabschnürung von der inneren Hüllmembran recht häufig beobachten. Die Fusion mit der Thylakoidmembran ist jedoch nur selten in den elektronenmikroskopischen Bildern sichtbar. Dies stimmt mit Befunden überein, die nahelegen, dass die Membranfusion ein sehr schneller Prozess ist, welcher vollständig abläuft, sobald er erst einmal initiiert ist. Entfernt man den Inhibitor, z.B. durch Anhebung der

Temperatur, so geht die Anhäufung von Vesikeln wieder zurück, ein Zeichen dafür, dass die Hemmung der Vesikelfusion durch Kälte reversibel ist (I-3). Chloroplasten verlieren allerdings recht bald nach der Isolierung die Kompetenz zur Vesikelbildung. Es ist noch zu klären, ob dies an einem Fehlen cytosolischer Komponenten liegt, oder ob proteolytischer Abbau notwendiger Membrankomponenten der chloroplastidären Hüllmembran die Vesikelbildung ähnlich dem Proteinimport mit der Zeit inhibiert.

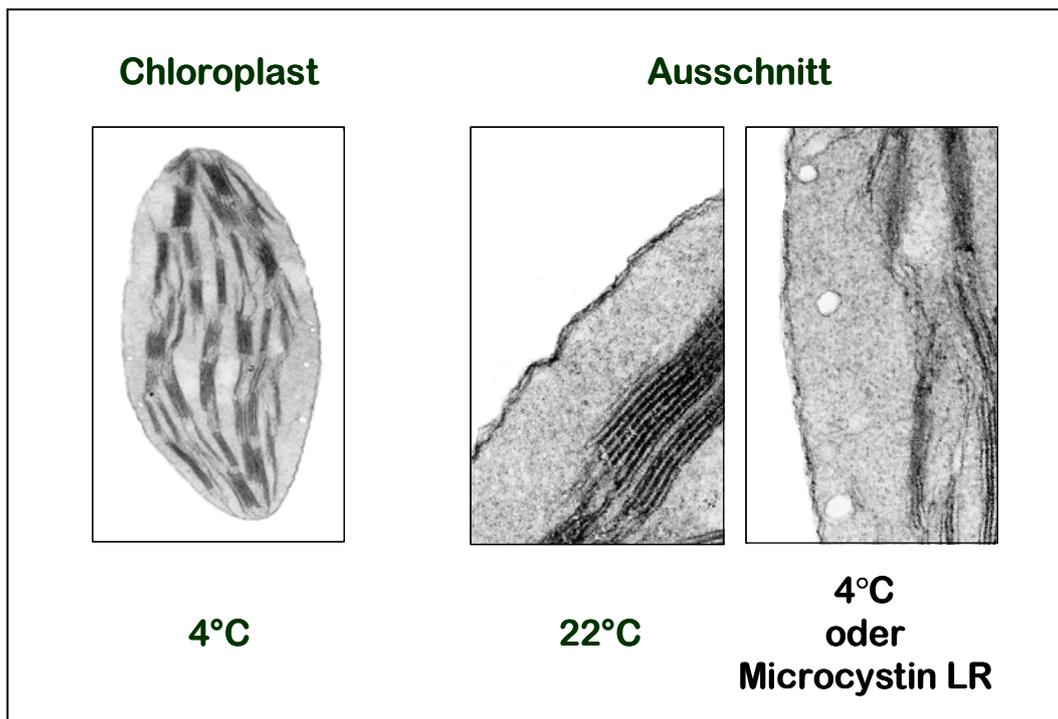


Fig. 6: Eine Behandlung von isolierten Chloroplasten mit Kälte oder Microcystin LR führt zu einem Auflaufen von Vesikeln zwischen der inneren Hüllmembran und den Thylakoiden. Sowohl Kälte als auch Microcystin LR sind als Inhibitoren der Vesikelfusion im cytosolischen System bekannt.

Es gibt eine ganze Reihe niedermolekularer Substanzen, welche den Vesikeltransport im Cytosol an verschiedenen Stellen inhibieren. Am System isolierter Chloroplasten konnte die Wirkung einer Reihe solcher Effektoren auf den chloroplastidären Vesikeltransport untersucht werden (I-3). Dabei zeigte sich, dass die Vesikelbildung durch verschiedene nicht-

hydrolysierbare GTP-Analoga, wie GTP- γ -S, o-GTP und GMP-PMP gehemmt wird (Fig. 7). Nicht-hydrolysierbare ATP-Analoga zeigten hingegen keinen Effekt. Dies weist darauf hin, dass eine GTPase an der Vesikelbildung im Chloroplasten beteiligt ist; die Versuche lassen jedoch keine eindeutige Aussage über die Natur der beteiligten GTPase zu. Die stärkste Inhibierung der Vesikelbildung konnte mit AlF_4^- beobachtet werden, welches Untersuchungen im cytosolischen Vesikeltransport nach ebenfalls spezifische auf GTPasen wirkt. Am cytosolischen Vesikeltransport sind eine ganze Reihe hoch- und niedermolekularer GTPasen beteiligt; neben kleinen Rab- und Ras-GTPasen, ist dies vor allem Dynamin, eine hochmolekulare GTPase, welche an der Vesikelabschnürung beteiligt ist. Ein zu Dynamin von Hefe homologes Protein konnte auch in den Chloroplasten identifiziert werden (Park et al., 1998), so dass hier ein möglicher Ansatzpunkt für die beobachtete Hemmung liegt. Untersuchungen mit spezifischen Inhibitoren für Dynamin, welche nicht auf die GTPase-Domäne wirken, sollen diese Frage zur Zeit klären.

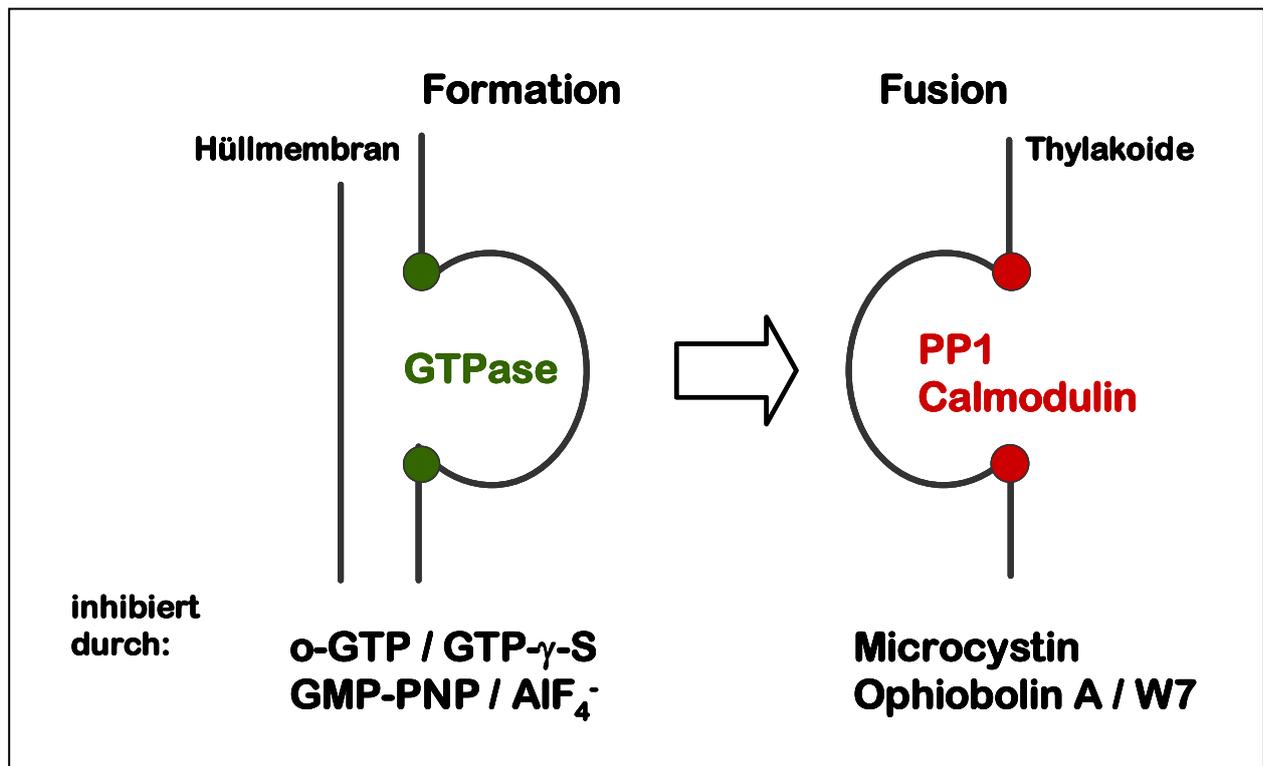


Fig. 7: Die Vesikelbildung im Chloroplasten Höherer Pflanzen wird vor allem durch nicht-hydrolysierbare GTP-Analoga, aber auch durch Aluminiumfluorid, inhibiert. Die

Vesikelfusion hingegen kann durch Inhibitoren von Protein Phosphatase 1 und Calmodulin inhibiert werden.

Eine Reihe von Substanzen, welche den Transport und die Verankerung von Vesikeln an der Zielmembran beeinflussen, zeigten in den Versuchen mit isolierten Chloroplasten keine Wirkung (I-3). Dafür gibt es verschiedene Erklärungen. Zum einen ist nicht auszuschließen, dass diese Substanzen nicht über die Hüllmembran der Chloroplasten gelangen. Eventuell weichen aber auch die im Chloroplasten an diesem Prozess beteiligten Proteine zu sehr von den im cytosolischen Vesikeltransport verwandten Proteinen ab, so dass sie von diesen Substanzen nicht inhibiert werden können. Darüber hinaus ist es durchaus vorstellbar, dass der Vesikeltransport im Chloroplasten ein stark minimiertes System darstellt. Der Abstand zwischen innerer Hüllmembran und den äußersten Thylakoiden ist nicht sehr groß, so dass keine weiten Transportwege notwendig sind. Darüber hinaus gibt es im Chloroplasten nur eine potentiell Zielmembran. Daher sind sicherlich wesentlich weniger Faktoren notwendig, um dem Vesikeltransport Spezifität zu verleihen.

Die eindeutigsten Ergebnisse ergaben sich bei der Verwendung von Inhibitoren der Vesikelfusion. Untersuchungen von Mayer und Mitarbeitern an Hefe haben gezeigt, dass homotypische Membranfusion in der Vakuolenbildung durch eine Protein Phosphatase 1 reguliert wird. Diese bildet dazu einen Komplex mit Calmodulin (Mayer, 2002). Die Versuche mit intakten Blättern hatten bereits ergeben, dass Microcystin LR in Chloroplasten zur Akkumulation von Vesikeln führt (I-5). Diese Wirkung von Microcystin LR konnte auch in den Versuchen mit isolierten Chloroplasten bestätigt werden (I-3). Darüber hinaus zeigten auch andere Inhibitoren von Protein Phosphatase 1 und 2A dasselbe Ergebnis. Da eine Beteiligung der Protein Phosphatase 1 am Vesikeltransport in Hefe bereits gezeigt ist, liegt es nahe, dass eine solche auch an der Membranfusion im Chloroplasten beteiligt ist. Die Ähnlichkeit zur Vesikelfusion in Hefe zeigt sich auch in der Wirkung Calmodulin-spezifischen Inhibitoren, wie z.B. Ophiobolin A und W7. Calmodulin ist ein in der Zelle weit verbreiteter Überträger von Calcium Signalen, welches an eine ganze Reihe verschiedener Zielproteine bindet. Dementsprechend wird die Vesikelfusion im Chloroplasten auch durch Ca^{2+} Antagonisten gehemmt (I-3). Biochemische Analysen haben erste Hinweise ergeben, dass in den Chloroplasten von Erbse in der Tat eine durch Microcystin LR inhibierbare Protein Phosphatase vorhanden ist, welche löslich im Stroma der Chloroplasten vorliegt (Vothknecht, unveröffentlichte Daten). Auch für das Vorkommen von Calmodulin im

Chloroplasten gibt es zumindest indirekte experimentelle Hinweise, da einige Calmodulin-bindende Proteine im Chloroplasten identifiziert werden konnten (Roberts et al., 1983; Buaboocha et al., 2001; Vothknecht, unveröffentlichte Daten).

Der chloroplastidäre Vesikeltransport ist das erste bekannte Vorkommen eines solchen Systems in einem endosymbiotischen Organell. Alle bisherigen Untersuchungen deuten auf einen cytosolischen, d.h. eukaryotischen, Ursprung dieses Systems. Diese Annahme wird dadurch gestärkt, dass Vesikeltransport für prokaryotische Organismen nicht beschrieben ist und die Genome von *Synechocystis* und *Nostoc* keine Gene enthalten, welche für typische Komponenten von Vesikeltransportsystemen kodieren. Cyanobakterien besitzen zwar eine Protein Phosphatase 1, diese ist jedoch nicht durch Microcystin LR inhibierbar und phylogenetische Untersuchungen legen darüber hinaus nahe, dass alle im Genom von *Arabidopsis* gefundenen Protein Phosphatasen 1 näher mit den eukaryotischen Proteinen verwandt sind. Es ist daher davon auszugehen, dass der Vesikeltransport im Chloroplasten erst nach der Endosymbiose im Zellorganell entstanden ist, indem Komponenten des cytosolischen Vesikeltransportes in den Chloroplasten übertragen wurden.

Um zu klären, wann im Laufe der Entwicklung photosynthetischer Eukaryoten dieses Ereignis stattgefunden hat, wurden über 40 Organismen untersucht, welche verschiedene Entwicklungsstufen chloroplasten-haltiger Organismen repräsentieren (I-2). Drei der vier Linien photosynthetischer Eukaryoten, die *Glaucocystophyten*, *Rhodophyten* und *Chlorophyten*, sind dabei nur durch im Wasser lebende Algen vertreten. Sie haben nie den Sprung zum Landleben gemacht. Die vierte Linie beinhaltet sowohl höherentwickelte Algen, die *Charophyten*, als auch sämtliche Landpflanzen. Mit Hilfe von elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurde nun in Vertretern aller dieser Linien nach dem Vorhandensein von vesikulären Strukturen in den Chloroplasten gesucht. In parallelen Ansätzen wurde jeweils mit Inhibitoren der Vesikelfusion vorinkubiert. Wie oben beschreiben führt eine solche Behandlung in den Chloroplasten von *Arabidopsis* und Erbse zu einem Auflaufen von Vesikeln, wodurch ihr Vorkommen leichter detektiert werden kann.

Die Untersuchungen ergaben, dass erst auf der Stufe der Landpflanzen, beginnend mit dem Moos *Marchantia polymorpha*, Vesikel im Chloroplastenstroma detektierbar waren (Fig. 8). In den Vertretern der *Glaucocystophyten*, *Rhodophyten* und *Chlorophyten* hingegen konnte kein Hinweis auf chloroplastidären Vesikeltransport gefunden werden. Auch in den

Charophyten, welche eine Linie mit den Landpflanzen bilden, wurden keine vesikulären Strukturen festgestellt. Von den Moosen aufwärts konnte chloroplastidärer Vesikeltransport in allen untersuchten Landpflanzen festgestellt werden und die Verwendung von Microcystin LR (PP1-Hemmung) und Ophiobolin A (Calmodulin-Hemmung) führte in allen diesen Pflanzen zu einer Hemmung der Vesikelfusion (I-2) und damit zu einer Akkumulation der Vesikel nach Inhibitorbehandlung. Daraus läßt sich schließen, dass alle diese Pflanzen über chloroplastidären Vesikeltransport verfügen und dass zumindest Teile der Vesikelfusionsmaschinerie konserviert sind. Es ist daher naheliegend, dass sich das Vesikeltransportsystem im Chloroplasten erst sehr spät in der Evolution auf der Stufe der Landpflanzen entwickelt hat. Die Entwicklung der Samenpflanzen stellt gleichzeitig den Schritt zu den Landpflanzen dar und es entwickelten sich erstmals komplexe Organstrukturen.

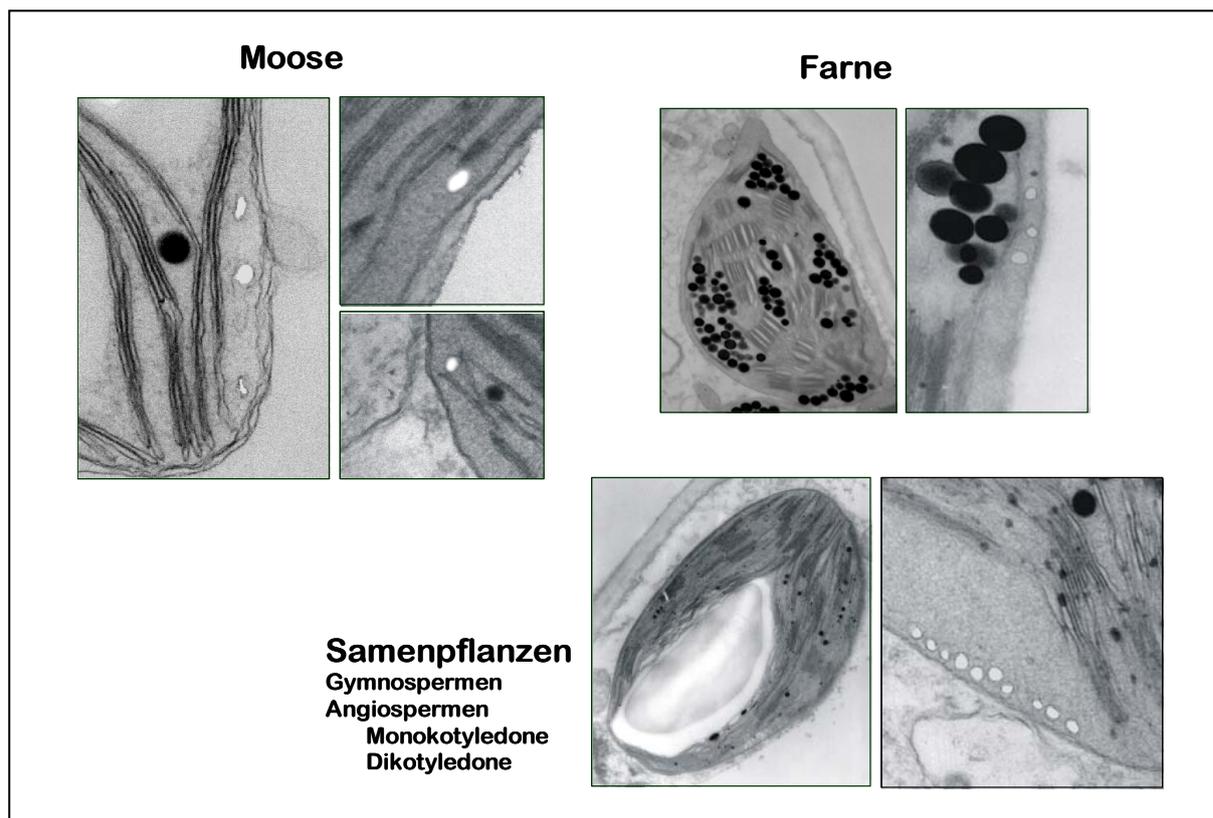


Fig. 8: Chloroplastidärer Vesikeltransport kann in Vertretern aller Landpflanzen beobachtet werden. In allen untersuchten Organismen zeigt sich dabei eine Inhibierung der Vesikelfusion durch Microcystin LR und Ophiobolin A. Dies läßt darauf schließen, dass

die an der Vesikelfusion im Chloroplasten beteiligten Komponenten evolutionär konserviert sind.

Grund für das Auftreten des chloroplastidären Vesikeltransportes an dieser Stelle der Entwicklung könnte in neueren Anforderungen liegen, welche des Landleben an die Adaptation und Regulierbarkeit der Photosynthese stellt. Allerdings blieb dieses Transportsystem auch in solchen Pflanzen erhalten, welche sekundär wieder ins Wasser zurückgekehrt sind (I-2). Weitere Untersuchungen müssen nun zeigen, welche Funktion der Vesikeltransport in den Chloroplasten speziell der Landpflanzen besitzt.

Die Beteiligung eines Vesikeltransportsystemes an der Thylakoidbiogenese wirft die Frage auf, wie diese in Organismen abläuft, in denen kein solches Transportsystem nachweisbar ist. Auch in diesen Organismen werden wesentliche Komponenten der Thylakoidmembran an der Hüllmembran der Chloroplasten synthetisiert oder über diese transportiert. Als Alternative zu einem Vesikeltransport könnten in diesen Organismen temporäre oder auch permanente Kontaktstellen zwischen Hüllmembran und den Thylakoiden existieren. Möglicherweise ist der chloroplastidäre Vesikeltransport allerdings auch in Algen vorhanden, die Vesikelfusion dort jedoch nicht über Microcystin LR und Ophiobolin A hemmbar. Ohne Hemmung der Fusionsmaschinerie ist die Detektion der Vesikel häufig sehr schwierig, so dass diese Möglichkeit nicht gänzlich ausgeschlossen werden kann. Zumindest für die Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gibt es Hinweise, dass Vesikeltransport in den Chloroplasten hier möglicherweise existiert (Hooper et al., 1991).

2.3. Untersuchungen zur Funktion verschiedener Aminoacyl-tRNA Synthetasen

Die Frage nach der evolutionären Entwicklung von Proteinen und Synthesewegen hat durch die Sequenzierung vieler verschiedener Genome inzwischen eine enorme Bedeutung erlangt und spielt auch in der Funktion und Entwicklung der oxygenen Photosynthese und der Chloroplastenbiogenese eine wichtige Rolle. Durch die Aufnahme von zwei Endosymbionten hat die pflanzliche Zelle ihre Genomausstattung stark vergrößert. Nicht alle von den Endosymbionten eingebrachten redundanten Gene wurden dabei im Zuge der Neuordnung der Zelle eliminiert. Oftmals kam es zu einem Austausch von Genen, so dass viele Synthesewege heute ein Patch-work von Proteinen verschiedenen genetischen Ursprungs sind. Andere Gene

wurden einer neuen Funktion zugeführt. Die Proteinfamilie der Aminoacyl-tRNA Synthetasen ist ein gutes Beispiel einer solchen evolutionären Entwicklung.

Ursprünglich galt das Dogma, dass jede tRNA von einer speziellen Aminoacyl-tRNA Synthetase mit ihrer spezifischen Aminosäure beladen wird (III-5). Als einzige Ausnahme war in Chloroplasten und einigen Bakterien die ‚Fehlbeladung‘ von tRNA^{Gln} mit Glutamat bekannt. Als weiteres Dogma galt, dass es zwei verschiedene Klassen von Aminoacyl-tRNA Synthetasen gibt, eine bestimmte AARS jedoch unabhängig vom Organismus immer zur selben Klasse gehört. Da diese Enzyme phylogenetisch sehr konserviert sind, sind sie im allgemeinen recht leicht in Genomsequenzen zu identifizieren. Um so überraschender war die Tatsache, dass in mehreren der ersten vollständigen Genomsequenzen, insbesondere von Archaeobakterien, einige Aminoacyl-tRNA Synthetasen nicht zu identifizieren waren. Durch diese Tatsache angestoßene molekularbiologische sowie biochemische Studien haben dann zeigen können, dass diese Organismen verschiedene Wege eingeschlagen haben, um das Fehlen solch essentieller Enzyme auszugleichen. So konnte die Lysyl-tRNA Synthetase von *Methanococcus maripaludis* biochemisch aufgereinigt und dadurch identifiziert werden (I-11). Dabei zeigte sich, dass dieses Protein die typischen Domänen der Klasse I AARS besitzt, obwohl die LysRS in allen bekannten Eubakterien, Eukaryoten, aber auch in Archaeobakterien wie *Sulfolobus*, zu den Klasse 2 Aminoacyl-tRNA Synthetasen gehört. Trotz vollständig unterschiedlicher aktiver Domänen in den zwei Klassen blieb dabei die Spezifität der tRNA-Beladung durch die LysRS erhalten. Eine solche Klasse 1 LysRS konnte ausser in *Methanococcus maripaludis* auch in weiteren Archaeaen wie *Methanobacterium thermoautotrophicum* oder *Archaeoglobus fulgidus* gefunden werden (I-11), was nahelegt, dass es sich dabei nicht um ein isoliertes phylogenetisches Ereignis in einem Organismus handelt. Ausserhalb der konservierten aktiven Domäne zeigen diese Klasse 1 LysRS Proteine nicht genug Ähnlichkeit zu anderen Klasse 1 Aminoacyl-tRNA Synthetasen, um ihren genauen evolutionären Ursprung klären zu können.

Als wesentlich komplexer erwies sich die Frage nach dem Fehlen der Cysteinyl-tRNA Synthetase in den Genomen von *Methanococcus jannaschii* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*. In den sehr nahe verwandten *Methanococcus maripaludis* und *Methanosarcina barkeri* konnten durch Komplementierung einer *E. coli* Δ -cysS Mutante die Gene für eine CysRS identifiziert werden. Diese entspräche den klassischen Klasse I CysRS, wie sie auch von Bakterien und Eukaryoten bekannt waren (I-8). In *Methanococcus*

jannaschii und *Methanobacterium thermoautotrophicum* hingegen konnte zwar die direkte Beladung von tRNA^{Cys} mit Cystein nachgewiesen werden, eine eigene CysRS wurde jedoch nicht gefunden (I-6). Statt dessen zeigte sich, dass die Prolyl-tRNA Synthetase in diesen Organismen mit hoher Spezifität sowohl tRNA^{Pro} mit Prolin als auch tRNA^{Cys} mit Cystein beladen kann. Dies ist der einzige bekannte Fall, dass eine AARS zwei unterschiedliche tRNAs auch mit unterschiedlichen Aminosäuren beladen kann. Auf diese Art kann das Fehlen einer CysteinyI-tRNA Synthetase kompensiert werden (I-6).

Untersuchungen zu weiteren Aminoacyl-tRNA Synthetasen von Archaeen ergaben, dass in einigen Fällen, z.B. Seryl-tRNA Synthetase, die Proteinsequenzen innerhalb der Archaeen bei weitem schlechter konserviert sind, als in den bis dahin bekannten Sequenzen aus Bakterien und Eukaryoten (I-9). Hier konnte die biochemische Aufreinigung des Enzyms die Annotierung des Gens eindeutig belegen. Im Fall der Phenylalanyl-tRNA Synthetase konnte erst die biochemische Aufreinigung die beiden Untereinheiten des Enzyms identifizieren. Darüber hinaus ergaben die Untersuchungen, dass wiederum die Annotierung einer der beiden kodierenden Gensequenzen fehlerhaft war (I-7).

4. Ausblick

Langfristiges Ziel meiner Arbeit ist es zu verstehen, wie die Biogenese der Thylakoidmembran in den Cyanobakterien und Chloroplasten vonstatten geht. Insbesondere in den Cyanobakterien weiss man sehr wenig über das ‚Wo‘ und ‚Wie‘ der Synthese dieser Membran. Einige Untersuchungen legen nahe, dass wesentliche Teile der Thylakoide in der Plasmamembran assembliert werden. Völlig offen ist jedoch, wie diese anschließend ihren Weg zur Thylakoidmembran finden. Dabei bleibt zu klären, welche Funktion Vipp1 dabei in der Biogenese der Thylakoide zukommt. Neuere Untersuchungen haben erste Hinweise darauf geliefert, dass Vipp1 sowohl mit Komponenten des Tat-Systems, aber auch mit chloroplastidären Chaperonen interagiert. Letzteres ist für Vipp1 von Cyanobakterien noch zu untersuchen. Vipp1 könnte daher an der Insertion essentieller Membrankomponenten beteiligt sein, denn nicht für alle membranständigen Proteine der Thylakoide ist der genaue Insertionsweg bisher bekannt.

In den Chloroplasten von Landpflanzen scheint es zwei Systeme zu geben, welche an der Thylakoidbiogenese beteiligt sind. Dazu gehört neben Vipp1 der phylogenetisch wohl jüngere Vesikeltransport. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, wie diese beiden Systeme parallel zueinander agieren und miteinander kommunizieren. Im Falle des chloroplastidären Vesikeltransportes bleibt auch zu klären, ob er wirklich auf die Landpflanzen beschränkt ist, oder ob er auch in den Chloroplasten der Algen existiert. Darüber hinaus sollen weitere an diesem Transportsystem beteiligte Komponenten identifiziert und charakterisiert werden. Daneben ist jedoch wiederum die Frage nach der Funktion des Vesikeltransportes in der Thylakoidbiogenese von essentieller Bedeutung. Ursprünglich ging man davon aus, dass die Vesikel im wesentlichen dem Lipid-Transport von der inneren Hüllmembran zu den Thylakoiden dienen. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass sie auch Proteine oder andere Komponenten der Thylakoidmembran transportieren. Eine Reihe von Proteinen der Thylakoidmembran und des Lumens sind kernkodiert. Diese werden im Cytosol synthetisiert und über die Hüllmembranen in den Chloroplasten importiert. Nicht für alle diese Proteine ist der Weg von der Hüllmembran zu und in die Thylakoide etabliert. Untersuchungen zur Inhibierung der Translokation einiger typischer Thylakoidproteine durch Microcystin LR bzw. Ophiobolin A ergaben das überraschende Ergebnis, dass Ophiobolin A bereits den Import dieser Proteine in den Chloroplasten hemmt (Vothknecht, unveröffentlichte Daten). Die Wirkung von Ophiobolin A scheint dabei bereits auf der Ebene der Translokation durch den chloroplastidären Importapparat zu liegen. Dies ist zwar kein Beleg für die Funktion des Vesikeltransportes an der Translokation dieser Proteine, es ist jedoch ein weiterer Hinweis darauf, dass Calmodulin in der Regulation chloroplastidärer Prozesse eine Rolle spielt.

5. Literatur

- Abdallah F., Salamini F. and Leister D. (2000) A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis*. **Trends Plant Sci.** **4**: 141-142
- Bergler H., Abraham D., Aschauer H. and Turnowsky F. (1994) Inhibition of lipid biosynthesis induces the expression of the *pspA* gene. **Microbiology** **140**: 1937-1944

- Bhattacharya D. and Medlin L. (1998) Algal Phylogeny and the Origin of Land Plants. **Plant Physiol.** **116**: 9-15
- Bonifacino J.S. and Glick B.S. (2004) The mechanisms of vesicle budding and fusion. **Cell** **116**: 153-66
- Buaboocha T., Liao B., Zielinski R.E. (2001) Isolation of cDNA and genomic DNA clones encoding a calmodulin-binding protein related to a family of ATPases involved in cell division and vesicle fusion. **Planta** **212**: 774-781
- Brissette J.L., Weiner L., Ripmaster T. L. and Model P. (1991) Characterization and sequence of the *Escherichia coli* stress-induced *psp* operon. **J. Mol. Biol.** **220**: 35-48
- DeLisa M.P., Lee .P, Palmer T. and Georgiou G. (2004) Phage shock protein PspA of *Escherichia coli* relieves saturation of protein export via the Tat pathway. **J. Bacteriol.** **186**: 366-373
- Dörnemann, D., Kotzabasis K., Richter P., Breu V. and Senger H. (1989) The regulation of chlorophyll biosynthesis by the action of protochlorophyllide on glutRNA-ligase. **Bot. Acta** **102**: 112-115
- Dworkin J., Jovanovic G. and Model P. (2000) The PspA protein of *Escherichia coli* is a negative regulator of sigma(54)-dependent transcription. **J. Bacteriol.** **182**: 311-319
- Elderkin S., Jones S., Schumacher J., Studholme D. and Buck M. (2002) Mechanism of action of the *Escherichia coli* phage shock protein PspA in repression of the AAA family transcription factor PspF. **J. Mol. Biol.** **320**: 23-37
- Gibson L.C., Willows R.D., Kannangara C.G., von Wettstein D. and Hunter C.N. (1995) Magnesium-protoporphyrin chelatase of *Rhodobacter sphaeroides*: reconstitution of activity by combining the products of the *bchH*, *-I*, and *-D* genes expressed in *Escherichia coli*. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **92**: 1941-1944
- Hankamer B.D., Elderkin S.L., Buck M., and Nield J. (2004) Organization of the AAA(+) adaptor protein PspA is an oligomeric ring. **J. Biol. Chem.** **279**: 8862-8866
- Hooper J.K., Boyd C.O. and Paavola, L.G. (1991) Origin of thylakoid membranes in *Chlamydomonas reinhardtii* y-1 at 38°C. **Plant Physiol.** **96**: 1321-1328

- Gray J.C., Sullivan J.A., Wang J.H., Jerome C.A. and MacLean D. (2003) Coordination of plastid and nuclear gene expression. **Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.** **358**: 135-144
- Jarvis P. (2003) Intracellular signalling: the language of the chloroplast. **Curr. Biol.** **13**: 314-316
- Joyard J., Teyssier E., Miege C., Berny-Seigneurin D. Marechal E., Block M.A., Dorne A.J., Rolland N. Ajalani G. and Douce, R. (1998) The biochemical machinery of plastid envelope membranes. **Plant Physiol.** **118**: 715-723
- Kleerebezem M. and Tommassen J. (1993) Expression of the *pspA* gene stimulates efficient protein export in *Escherichia coli*. **Mol. Microbiol.** **7**: 947-956
- Li H.M., Kaneko Y. and Keegstra K. (1994) Molecular cloning of a chloroplastic protein associated with both the envelope and thylakoid membranes. **Plant Mol. Biol.** **4**: 619-632
- Margulis L. (1970) Origin of Eukaryotic Cells. Yale University Press, New Haven
- Martin W. and Herrmann RG. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? **Plant Physiol.** **118**: 9-17
- Mayer A. (2002) Membrane fusion in eukaryotic cells. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.** **18**: 289-314
- Mereschkowsky C. (1905) Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. **Biol. Centralbl.** **25**: 593-604
- Mochizuki N., Brusslan J.A., Larkin R., Nagatani A. and Chory J. (2001) *Arabidopsis* genomes uncoupled 5 (GUN5) mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** **98**: 2053-2058
- Moreira D. and Philippe H. (2001) Sure facts and open questions about the origin and evolution of photosynthetic plastids. **Res. Microbiol.** **152**: 771-780
- Morre D.J., Sellden G., Sundquist C. and Sandelius A.S. (1991) Stromal low temperature compartments derived from the inner membrane of the chloroplast envelope. **Plant Physiol.** **97**:1558-1564
- Mühlethaler K. and Frey-Wyssling A. (1959) Entwicklung und Struktur der Propastiden. **J. Biophys. Biochem. Cytol.** **6**: 507-512.

- Ort DR and Yocum CR eds. (1996) Oxygenic Photosynthesis: The Light Reaction, Kluwer
- Palmer J.D. (2000) A single birth of all plastids? **Nature** **405**: 32-33
- Papenbrock J. and Grimm B. (2001) Regulatory network of tetrapyrrole biosynthesis--studies of intracellular signalling involved in metabolic and developmental control of plastids. **Planta** **213**: 667-681
- Park J.M., Cho J.H., Kang S.G., Jang H.J., Pih K.T., Piao H.L., Cho M.J. and Hwang I. (1998) A dynamin-like protein in *Arabidopsis thaliana* is involved in biogenesis of thylakoid membranes. **EMBO J.** **17**: 859-867
- Pontoppidan B. and Kannangara C.G. (1994) Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA(Glu) reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. **Eur. J. Biochem.** **225**: 529-537
- Roberts D.M., Zielinski R.E., Schleicher M., Watterson D.M. (1983) Analysis of suborganellar fractions from spinach and pea chloroplasts for calmodulin-binding proteins. **J. Cell Biol.** **97**: 1644-1647
- Stefansson H., Andreasson E., Weibull C. and Albertsson P.-A. (1997) Fractionation of the thylakoid membrane from *Dunaliella salina* – heterogeneity is found in Photosystem I over a broad range of growth irradiance. **Biochim. Biophys. Acta** **1320**: 235-246
- Strand A., Asami T., Alonso J., Ecker J.R. and Chory J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrinIX. **Nature** **421**: 79-83
- von Wettstein D (1959) The effect of genetic factors on the submicroscopic structures of the chloroplast. **J. Ultrastruct. Research** **3**: 234-240
- Xiong J. and Bauer C.E. (2002) Complex evolution of photosynthesis. **Annu. Rev. Plant Biol.** **53**: 503-521