

Die Cytochrom c Reduktase Höherer Pflanzen

Charakterisierung des bifunktionalen
Cytochrom c Reduktase / Processing Peptidase - Komplexes
aus den Mitochondrien von
Solanum tuberosum und *Triticum aestivum*

Dissertation

zur

Erlangung des Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften

von

Hans Peter Braun

eingereicht am Fachbereich Biologie
der Freien Universität Berlin
im Juni 1993

Tag der letzten Prüfung :

13.07.1953

1. Gutachter: Prof. Dr. Axel Brennicke
2. Gutachter: Prof. Dr. Lothar Willmitzer

VORWORT

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Dr. Udo Schmitz und Prof. Dr. Axel Brennicke am Institut für Genbiologische Forschung in Berlin-Dahlem angefertigt. Teile der Experimente wurden am Institut für Biochemie der Universität Düsseldorf, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Hanns Weiss, am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem und am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch, Arbeitsgruppe Dr. Volker Krufft, durchgeführt.

Mein aufrichtiger Dank gilt Dr. Udo Schmitz für seine wissenschaftliche und menschliche Unterstützung, mit der er diese Arbeit stets begleitet hat. Prof. Dr. Axel Brennicke sei für das angenehme Arbeitsklima in seiner Abteilung gedankt und den Mitarbeitern der Arbeitsgruppen Schmitz und Brennicke für die gute Zusammenarbeit. Michael Emmermann untersuchte die Prozessierungsaktivität der isolierten Cytochrom c Reduktase und Helga Mentzel und Andrea Leibe halfen mir mit großer Ausdauer bei den mühsamen Präparationen von Mitochondrien aus Weizenkeimlingen. Zu Dank verpflichtet bin ich ebenso Martin Bödicker und Prof. Dr. Hanns Weiss, die mir die Grundlagen der Cytochrom c-Affinitätschromatographie vermittelten. Markus Peters gab mir Anleitung bei der Messung der Ubiquinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Aktivität und Udo Herz bei der Herstellung von Antikörpern. Auch ihnen sei an dieser Stelle sehr gedankt. Die Aminosäuresequenzierungen der vorliegenden Arbeit wurden von Dr. Volker Krufft durchgeführt. Ein herzliches Dankeschön an ihn und seine Assistentin Helga Gaenge!

Das Institut für Genbiologische Forschung habe ich als eine wissenschaftliche Einrichtung erlebt, die hervorragende Arbeitsmöglichkeiten bietet. Die Schließung des Instituts im Dezember 1996 halte ich daher für sehr bedauerlich.

Claudia weiß, wieviel ich ihr verdanke.

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Braun, H.P., Emmermann, M., Krufft, V. and Schmitz, U.K. (1992) Cytochrome c_1 from potato: a protein with a presequence for targeting to the intermembrane space. *Mol. Gen. Genet.* 231, 217-225.

Braun, H.P., Emmermann, M., Krufft, V. and Schmitz, U.K. (1992) The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J.* 11, 3219-3227.

Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1992) Affinity purification of cytochrome c reductase from plant mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 208, 761-767.

Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1993) Purification and sequencing of cytochrome b from potato reveals methionine cleavage of a mitochondrially encoded protein. *FEBS Lett.* 316, 128-132.

Braun, H.P., Emmermann, M. and Schmitz, U.K. (1993) Cytochrome c reductase from potato mitochondria: A protein complex involved in respiration and protein import. In: *Plant Mitochondria*, Brennicke, A. and Kück, U. (eds), VCH Publishers, Weinheim, FRG (in press).

Emmermann, M., Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1991) The ADP/ATP translocator from potato has a long amino-terminal extension. *Curr. Genet.* 20, 405-410.

Emmermann, M., Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1992) The processing protease from plant mitochondria. In: *Molecular, biochemical and physiological aspects of plant respiration*, pp 373-376, Lambers, H. and van der Plas, L.H.W. (eds), SPB Academic Publishing bv, The Hague, The Netherlands.

Emmermann, M., Braun H.P. and Schmitz, U.K. (1993) The two high molecular weight subunits of cytochrome c reductase from potato are immunologically related to the mitochondrial processing enhancing protein. *Biochim. Biophys. Acta* 1142, 306-310.

Emmermann, M., Braun, H.P., Arretz, M. and Schmitz, U.K. (1993) Characterization of the bifunctional cytochrome c reductase / processing peptidase complex from potato mitochondria. *J. Biol. Chem.* (in press).

INHALT

1.	EINLEITUNG	1
1.1.	Der Cytochrom c Reduktase-Komplex und seine Rolle in der Atmungskette	2
1.2.	Der mitochondriale Protein-Import-Apparat	7
1.3.	Die Atmungskette und der Protein-Import-Apparat in den Mitochondrien höherer Pflanzen	10
1.4.	Zielsetzung der Arbeit	12
2.	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1.	Material	13
2.1.1.	Chemikalien und Lösungsmittel	13
2.1.2.	Versuchsorganismen	13
2.2.	Grundmethoden der Proteinanalyse	13
2.2.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	13
2.2.2.	Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese	14
2.2.3.	Elektroelution	14
2.2.4.	Western Blotting	15
2.2.5.	Herstellung von Antikörpern	15
2.2.6.	Immunfärbung	16
2.2.7.	Antikörperfällung	18
2.2.8.	Enzymatische Proteinspaltung und HPLC-Auftrennung generierter Peptide	19
2.2.9.	Sequenzierung von Proteinen und Peptiden	20
2.3.	Präparation von Mitochondrien	20
2.3.1.	Isolierung von Mitochondrien aus Knolle, Sproß und Wurzel der Kartoffel	20
2.3.2.	Isolierung von Mitochondrien aus Weizen	22
2.3.3.	Isolierung von Mitochondrien aus Hefe und <i>Neurospora</i>	23
2.3.4.	Subfraktionierung isolierter Mitochondrien	23

2.4.	Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus den Mitochondrien höherer Pflanzen	24
2.4.1.	Solubilisierung von mitochondrialen Membranproteinen mit Triton X-100	24
2.4.2.	Affinitätschromatographie	25
2.4.3.	Druckfiltration	26
2.4.4.	Gelfiltration	26
2.4.5.	Saccharose-Gradientenzentrifugation	27
2.5.	Analyse der isolierten Cytochrom c Reduktase	27
2.5.1.	Spektrophotometrische Vermessung der Cytochrome	27
2.5.2.	Aktivitätsmessungen	28
2.5.3.	Spaltung des isolierten Enzymkomplexes	29
2.6.	Grundtechniken der Analyse von DNA	29
2.6.1.	Screening einer cDNA-Bank der Kartoffel	30
2.6.2.	Klonierung von DNA in <i>Escherichia coli</i>	30
2.6.3.	Sequenzierung von DNA	30
2.6.4.	Computeranalysen	30
3.	ERGEBNISSE	32
3.1.	Immunologische Charakterisierung der Cytochrom c Reduktase und der Prozessierungsprotease aus Kartoffel	32
3.1.1.	Identifizierung und submitochondriale Lokalisierung von PEP, MPP und der Core-Proteine	32
3.1.2.	Copräzipitation der Cytochrom c Reduktase und der Prozessierungsprotease	35
3.2.	Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel	36
3.2.1.	Affinitätschromatographie	36
3.2.2.	Gelfiltrationschromatographie und Größenbestimmung	40
3.2.3.	Spektrophotometrische Vermessung der Cytochrome	42
3.2.4.	Oxidoreduktase- und Transhydrogenase-Aktivitäten des Proteinkomplexes	43
3.2.5.	Zusammenfassung des Reinigungsprotokolls	43

3.3.	Analyse der Komposition der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel	45
3.3.1.	Immunologische Identifizierung der respiratorischen Untereinheiten und der Core-Proteine	46
3.3.2.	Analyse der Cytochrom c Reduktase mit verschiedenen Gelsystemen	46
3.3.3.	Cytochrom c Reduktase aus verschiedenen Sorten der Kartoffel	50
3.3.4.	Cytochrom c Reduktase aus verschiedenen Geweben der Kartoffel	51
3.4.	Molekulare Charakterisierung von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel	52
3.4.1.	Cytochrom b: Abtrennung des N-terminalen Methionins bei einem mitochondrial kodierten Protein	56
3.4.2.	Cytochrom c ₁ : Eine zweigeteilte Leitsequenz für den Transport in den mitochondrialen Intermembranraum	60
3.4.3.	Bestimmung der Schnittstelle für das Eisen-Schwefel-Protein	64
3.4.4.	Bestimmung von N-terminalen und internen Aminosäuresequenzen der kleinen Untereinheiten	65
3.5.	MPP und PEP sind integrale Bestandteile der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel	71
3.5.1.	Immunologische Identifizierung der Prozessierungsprotease als Bestandteil der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel	71
3.5.2.	Die drei Core-Proteine aus Kartoffel sind immunologisch unterscheidbar	72
3.5.3.	Das 51 kd-Protein der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ist homolog zu MPP	72
3.5.4.	Die 53 und 55 kd-Proteine der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel sind homolog zu PEP	74
3.5.5.	Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ist eine Prozessierungsprotease	76
3.5.6.	Destabilisierungen der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel: Abspaltung der MPP-Untereinheit	78
3.6.	Die Cytochrom c Reduktase aus Weizen	81
3.6.1.	Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus Weizenkeimlingen	81
3.6.2.	Charakterisierung der isolierten Cytochrom c Reduktase	83
3.6.3.	Die Cytochrom c Reduktase aus Weizen ist eine Prozessierungsprotease	90

4.	DISKUSSION	92
4.1.	Reinigung der Cytochrom c Reduktase höherer Pflanzen über Affinitätschromatographie und Gelfiltrationschromatographie	92
4.2.	Die Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase höherer Pflanzen	93
4.2.1.	Die proteolytischen Untereinheiten	95
4.2.2.	Die respiratorischen Untereinheiten	97
4.2.3.	Die kleinen Untereinheiten	99
4.2.4.	Substöchiometrische Proteine in Cytochrom c Reduktase-Präparationen	100
4.3.	Die Stabilität der Cytochrom c Reduktase aus höheren Pflanzen	101
4.4.	Die pflanzliche Prozessierungsprotease	102
5.	ZUSAMMENFASSUNG	107
6.	LITERATUR	109
7.	ANHANG	128

1. EINLEITUNG

Alle chemischen Reaktionen im Zellstoffwechsel sind mit einer Energieumwandlung verknüpft. Dabei sind endergonische Reaktionen aus thermodynamischen Gründen nur durch Kopplung mit exergonischen Prozessen möglich. Die Gesamtvorgänge gehen mit einer Abnahme der freien Enthalpie einher. Energetische Kopplungen werden vor allem durch Umsetzungen von Phosphatbindungen realisiert. Die wichtigste energieliefernde Reaktion der Zelle ist die hydrolytische Spaltung des Adenosintriphosphat (ATP). ATP ist ein universeller Überträger chemischer Energie zwischen exergonischen und endergonischen Reaktionen im Stoffwechsel, und wird daher auch als "Energiewährung" bezeichnet.

Mitochondrien sind auf die Herstellung von ATP spezialisierte Zellorganellen. In ihrem Innenraum, der mitochondrialen "Matrix", werden Pyruvat, Fettsäuren und Aminosäuren abgebaut und dabei freiwerdende Energien zur Herstellung von Verbindungen mit hohem Redoxpotential ($\text{NADH}+\text{H}^+$ oder FADH_2) genutzt. In der inneren Membran der Mitochondrien befinden sich die Enzyme der Atmungskette. Hier werden $\text{NADH}+\text{H}^+$ und FADH_2 reoxidiert und Elektronen über eine Kette von Redoxreaktionen auf molekularen Sauerstoff übertragen. Damit gekoppelt kommt es zwischen Matrix und Intermembranraum der Mitochondrien zur Ausbildung eines Protonengradienten, der zur Generierung von ATP aus $\text{ADP}+\text{P}_i$ verwendet wird (Mitchell 1961).

Die Enzyme der Elektronentransportkette sind Bestandteile von physiologisch distinkten Segmenten, deren strukturelle Grundlage vier oligomere Proteinkomplexe darstellen (Rieske 1976, Hatefi 1985, Abb. 1). Die Komplexe I und II sind $\text{NADH}+\text{H}^+$ - bzw. FADH_2 -Dehydrogenasen und führen zur Reduktion eines Ubiquinon-Pools in der inneren mitochondrialen Membran. Der Komplex IV ist eine Cytochrom c: O_2 -Oxidoreduktase. Das mittlere Segment der Atmungskette überträgt Elektronen von Ubiquinol auf Cytochrom c und wird als Komplex III, bc_1 -Komplex oder Cytochrom c Reduktase bezeichnet.

Mitochondrien stammen vermutlich von Bakterien ab, die mit urkaryontischen Zellen eine Endosymbiose eingegangen sind (Schwartz und Dayhoff 1978). Sie weisen folglich ein eigenes Genom auf, das jedoch stark degeneriert ist, da - der Endosymbiontentheorie zufolge - die meisten mitochondrialen Gene im Verlauf der Evolution in den Nukleus transloziert wurden.

Fast alle Enzyme der Atmungskette und des Stoffwechsels der Mitochondrien sind daher kernkodiert, werden an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert und posttranslational in die Organellen importiert (Haller Mayer et al. 1977). Dafür werden die entsprechenden Proteine bei ihrer Synthese mit spezifischen "Leitsequenzen" ausgestattet, die von Elementen eines "Protein-Import-Apparates" der Mitochondrien erkannt werden.

Die vorliegende Dissertation will belegen, daß Bestandteile des respiratorischen Cytochrom c Reduktase-Komplexes höherer Pflanzen bifunktional sind, indem sie gleichzeitig Elemente des Protein-Import-Apparates darstellen. Dazu soll an dieser Stelle zunächst der aktuelle Kenntnisstand über den Cytochrom c Reduktase-Komplex bzw. den mitochondrialen Protein-Import-Apparat umrissen werden.

1.1. Der Cytochrom c Reduktase-Komplex und seine Rolle in der Atmungskette

Die enzymatische Funktion der Cytochrom c Reduktase (EC 1.10.2.2.) beruht auf dem Zusammenwirken der Cytochrome b und c_1 mit einem Eisen-Schwefel-Protein (daher die Bezeichnung "bc₁-Komplex"; dieser Begriff schließt entsprechende Proteinkomplexe aus Bakterien mit ein). Der Proteinkomplex spielt nicht nur bei der mitochondrialen Respiration eine zentrale Rolle, sondern ist in analoger Weise auch an vielen anderen biologischen Elektronentransportprozessen beteiligt. In der chloroplastidären Thylakoid-Membran stellt er als "b₆f-Komplex" das Bindeglied zwischen den beiden Photosystemen dar. Und auch für diverse und phylogenetisch weit voneinander entfernte Bakterien sind bc₁-Komplexe charakterisiert worden (Übersicht in Trumpower 1990a). In allen Fällen ist die Oxidoreduktase-Aktivität des Proteinkomplexes mit einer Translokation von Protonen über eine biologische Membran gekoppelt. Den genauen Mechanismus beschreibt der sogenannte "Q-Zyklus" (Übersicht in Trumpower 1990b): Der bc₁-Komplex oxidiert ein Quinol-(QH₂) Molekül, indem jeweils ein Elektron auf externes Cytochrom c bzw. internes Cytochrom b übertragen wird. Dabei werden zwei Protonen des Quinols an der positiv geladenen Seite der Membran deponiert. Ist dieser Vorgang ein weiteres Mal durchlaufen, erfolgt mit Hilfe der beiden internen Elektronen am Cytochrom b unter Aufnahme von zwei Protonen an der negativ geladenen Seite der Membran eine Reduktion eines Quinon-(Q) Moleküls (siehe Abb. 1). Da im Resultat Wasserstoffatome

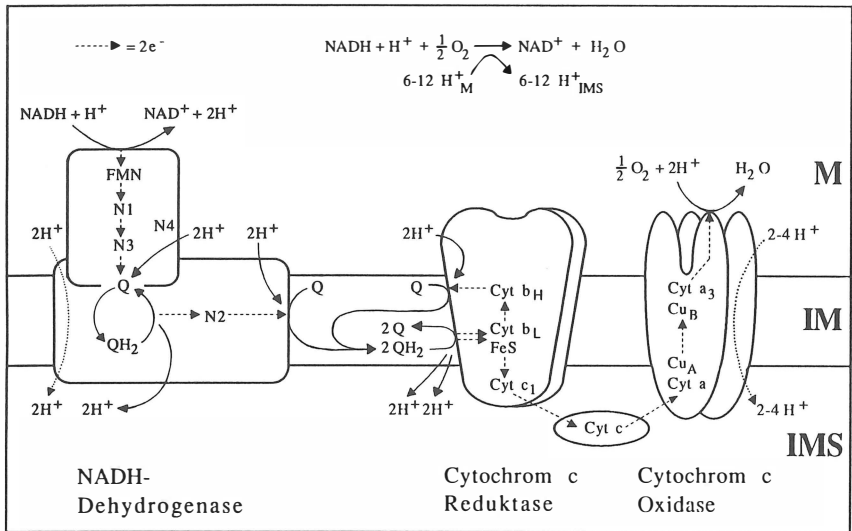


Abb. 1: Die Atmungskette. Das Schema basiert auf Darstellungen aus Weiss et al. 1991 (NADH-Dehydrogenase), Bechmann et al. 1992 (Cytochrom c Reduktase) und Kadenbach et al. 1991 (Cytochrom c Oxidase).*

von Quinol auf Quinon übertragen werden, ist der bc_1 -Komplex enzymatisch nicht nur eine Oxidoreduktase, sondern auch eine Transhydrogenase.

Die Cytochrom c Reduktase wurde vor allem für Säuger und Pilze charakterisiert (Übersicht in Rieske 1986, Weiss 1987, Bechmann et al. 1992). Die ursprünglichen Präparationsmethoden basierten auf einer Solubilisierung der mitochondrialen Membranproteine mit Deoxycholat und Cholat und einer anschließenden Aufreinigung des Enzymkomplexes über differentielle Ammoniumsulfat-Fällungen (Hatefi et al. 1962, Rieske et al. 1967, Siedow et al. 1978). Neuere Verfahren gehen von nichtionischen Detergenzien aus und verwenden Säulenchromatographie für die Reinigungsschritte (Linke und Weiss 1986, Schägger et al. 1986, Ljungdahl et al. 1986). Der Proteinkomplex liegt als Dimer vor und weist ein Molekulargewicht um 500 kd auf. Eine Analyse seiner Topographie erfolgte über elektronenmikroskopische Vermessung von 2D-Kristallen (Wingfield et al. 1979). Demnach durchspannt die Cytochrom c Reduktase die innere mitochondriale Membran (Dicke ca. 5

* Abkürzungen sind in einem Verzeichnis im Anhang erklärt

nm) und erstreckt sich etwa 7 nm in die Matrix bzw. 3 nm in den Inter-membranraum (Hovmöller et al. 1981, Karlsson et al. 1983).

Die mitochondriale Cytochrom c Reduktase besteht aus 10-11 verschiedenen Protein-Komponenten. Lediglich drei Untereinheiten tragen prosthetische Gruppen und sind direkt am Elektronentransport beteiligt: Cytochrom b (2 Häm b-Gruppen), Cytochrom c_1 (1 Häm c_1) und ein Eisen-Schwefel-Protein (1 Fe_2S_2 -Cluster). Die Sequenzen dieser Proteine sind für viele Organismen bekannt (Tabelle 1). Die Gene für Cytochrom c_1 und das Eisen-Schwefel-Protein sind im Kern lokalisiert, wohingegen Cytochrom b als einzige Untereinheit des Proteinkomplexes mitochondrial kodiert ist.

Während in bakteriellen und chloroplastidären bc_1 - bzw. b_6f -Komplexen neben den Redox-Zentren tragenden Untereinheiten maximal eine weitere kleine Untereinheit vorkommt, setzt sich die Cytochrom c Reduktase aus Säugern und Pilzen aus 7-8 zusätzlichen Protein-Komponenten zusammen, deren Funktionen jedoch noch weitgehend unklar sind. Dazu gehören zwei Matrix-zugewandte Untereinheiten im 50 kd-Bereich, von denen man aufgrund ihrer Größe ursprünglich annahm, daß sie den Kern des Proteinkomplexes darstellen (Silman et al. 1967). Obwohl ihre periphere Anordnung inzwischen erwiesen ist, werden sie noch traditionell als "Core"-Proteine bezeichnet. Genetische Deletionen der Core-Proteine I oder II in Hefe verhindern die Befestigung der Häm-Gruppen an Cytochrom b und einen Zusammenbau der Cytochrom c Reduktase (Tzagoloff et al. 1986, Oudshoorn et al. 1987, Crivellone et al. 1988). Darüber hinaus deuten Untersuchungen an temperatursensitiven Hefe-Mutanten auf eine vermeintliche Rolle der Core-Untereinheit I für die bc_1 -Aktivität hin (Gatti und Tzagoloff 1990). Die

Tabelle 1 (folgende Seite): Die Untereinheiten des Cytochrom c Reduktase-Komplexes. Für die kleinen Komponenten liegt bislang keine allgemein anerkannte Nomenklatur vor (die verwendeten Bezeichnungen sind aus Maarse und Grivell 1987). Die apparenten (app.) Molekulargewichte der Untereinheiten von Rind sind aus v. Jagow et al. 1985, die der entsprechenden Komponenten von Hefe aus Maarse und Grivell 1987. Den kalkulierten (calc.) Molekulargewichten liegen die Sequenzen der reifen Proteine zugrunde (Ausnahme: Für das Core-Protein I aus Hefe ist die molekulare Größe des Precursors angegeben, da der N-Terminus des reifen Proteins nicht bekannt ist). Sequenzdaten liegen für die Untereinheiten aus diversen Organismen vor (rechte Spalte). Sie basieren in den meisten Fällen auf den Sequenzen der korrespondierenden Gene. Für Rind wurden die Aminosäuresequenzen von 8 Untereinheiten direkt bestimmt (Rind).

Referenzen: kleine Proteine siehe Abb. 26, Eisen-Schwefel-Protein siehe Abb. 25, Cytochrom c_1 siehe Braun et al 1992a, Cytochrom b siehe Hauska et al. 1988, Core-Proteine siehe Bechmann et al. 1992.

Untereinheiten	Molekulargewicht				Sequenzen
	Rind		Hefe		
	App.	Calc.	App.	Calc.	
Core-Protein I	49	35,8	44	50,2	Rind, Hefe, <i>Neurospora</i>
Core-Protein II	47	46,5	40	38,7	Rind, Mensch, Ratte, Hefe
Cytochrom b	33	43,7	32	44,0	Rind, Mensch, Ratte, Maus, Kröte, <i>Drosophila</i> , Hefe, <i>Schizosaccharom. pombe</i> , <i>Neurospora</i> , <i>Aspergillus</i> , Mais, Weizen, <i>Oenothera</i> , Kartoffel, <i>Chlamydomonas</i> , <i>Trypanosoma brucei</i> , <i>Leishmania tarantolae</i>
Cytochrom c ₁	31	27,9	32	27,4	<u>Rind</u> , Mensch, Hefe, <i>Neurospora</i>
Eisen-Schwefel-Protein	25	21,5	22	20,1	<u>Rind</u> , Mensch, Ratte, Hefe, <i>Neurospora</i> , Mais
"Q-binding"-Protein	13	13,4	14	14,4	<u>Rind</u> , Mensch, Hefe
"Hinge"-Protein	9	9,2	17	14,5	<u>Rind</u> , Mensch, Hefe
"Core-linked"-Protein	11	9,5	11	12,3	<u>Rind</u> , Hefe
"DCCD-binding"-Protein	8	8,0	-	-	<u>Rind</u>
"Cytochrom c ₁ -linked"-P.	7	7,2	7	7,4	<u>Rind</u> , Hefe
"FeS-linked"-Protein	6	6,5	8,5	?	<u>Rind</u>

Core-Proteine sind kernkodiert, und ihre Aminosäuresequenzen gleichen sich zu etwa 20 % (siehe Tabellen 1 und 2).

Neben den drei respiratorischen und den zwei Core-Untereinheiten konstituiert sich der mitochondriale Cytochrom c Reduktase-Komplex noch aus 5-6 "kleinen" Komponenten (MW < 20 kd, siehe Tabelle 1). Deletionen dieser Proteine in Hefe führen ebenfalls zu einer Störung der Assemblierung des Proteinkomplexes und zu vollkommener bzw. teilweiser Suppression der bc₁-Aktivität (Übersicht in Trumpower 1990a). Die Untersuchung der strukturellen Anordnung der kleinen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase erfolgte über chemische Kreuzvernetzungen, partielle Protease-Verdauungen und gezielte Destabilisierungen des Enzymkomplexes (Sidhu und Beattie et al. 1982, Schägger et al. 1986, Gonzalez-Halphen et al. 1988, Cocco et al. 1991). Ein sogenanntes "Q-binding"-Protein (Rind: 13,4 kd, Hefe: 14,4 kd) läßt sich mit einem Ubiquinon-Analog photoaffinitätsmarkieren (Yu und Yu 1982). Das "Hinge"-Protein (Rind: 9,2 kd, Hefe: 14,5) spielt eine Rolle bei der Bindung von Cytochrom c an die Cytochrom c Reduktase und ist äußerst hydrophil (Wakabayashi et al. 1982, Kim und King 1983). Weitere der kleinen Komponenten wurden über ihre Position in bezug auf die großen Untereinheiten des Proteinkomplexes definiert. Ein sogenanntes "Core-linked"-Protein (Rind: 9,5 kd, Hefe: 12,3 kd) läßt sich zusammen mit den Core-Proteinen vom Enzymkomplex aus Rind abspalten (Schägger et al. 1986). Das "Cytochrome c₁-linked"-Protein (Rind: 7,2 kd, Hefe: 7,4 kd) bildet mit dem "Hinge"-Protein und der Cytochrom c₁-Untereinheit einen Subkomplex. Schließlich kommt als kleinste Komponente der Cytochrom c Reduktase aus Rind ein "FeS-linked"-Protein (6,5 kd) vor (Schägger et al. 1985, Terzi et al. 1991). Es dissoziiert sehr leicht vom Proteinkomplex und scheint als einzige Untereinheit für die bc₁-Aktivität entbehrlich zu sein (Schägger et al. 1990). Auch für Hefe wurde kürzlich eine analoge Untereinheit (8,5 kd) identifiziert (Geier et al. 1992).

Die Cytochrom c Reduktase aus Rind zeichnet sich noch durch eine sechste kleine Untereinheit aus, die ursprünglich als "DCCD-binding"-Protein (8,0 kd) bezeichnet wurde (Borchart et al. 1985). Inzwischen konnte diese Komponente als Leitsequenz des Eisen-Schwefel-Proteins identifiziert werden (Brandt et al. 1993).

Die Primärstrukturen der kleinen Untereinheiten des Cytochrom c Reduktase-Komplexes sind für Rind, Hefe und z.T. für Mensch bekannt (siehe Tabelle 1). Die Proteine sind kernkodiert und werden posttranslational in die Mitochondrien transportiert. Der Import-Weg ist dabei unklar, da Leit-

sequenzen entweder fehlen, oder aber eine sehr untypische Aminosäurekomposition aufweisen (siehe unten).

1.2. Der mitochondriale Protein-Import-Apparat

Die meisten kernkodierte mitochondrialen Proteine werden im Cytoplasma als Vorläufer-Proteine ("Precursor"*) synthetisiert, die an ihrem N-Terminus eine Leitsequenz tragen. Diese Zusatzstruktur ermöglicht einen zielgerichteten Transport von Proteinen in das Mitochondrium und wird nach erfolgreichem Import abgetrennt. Leitsequenzen umfassen gewöhnlich 20-80 Aminosäuren. Sie sind von ihrer Primärstruktur her verschieden, weisen jedoch ähnliche Aminosäurekompositionen auf. Positiv geladene und hydroxylierte Reste kommen überdurchschnittlich häufig vor, während Glutaminsäure und Asparaginsäure selten sind. Als Sekundärstruktur werden für Leitsequenzen α -Helices postuliert, die positive Ladungen auf der einen und hydrophobe Aminosäuren auf der anderen Seite tragen, also amphiphil sind (v. Heijne 1986).

Die Leitsequenzen interagieren spezifisch mit Komponenten des Protein-Import-Apparates der Mitochondrien (Abb. 2). Dabei spielen Hitzeschockproteine, Rezeptoren und Prozessierungsproteasen eine Rolle (Übersicht in Hartl et al. 1989, Pfanner und Neupert 1990, Glick und Schatz 1991). Viele Precursor werden zunächst im Cytoplasma mit Hilfe von Hitzeschockproteinen in eine Import-kompetente Konformation überführt. Sie werden anschließend von spezifischen Rezeptoren erkannt und in die äußere mitochondriale Membran eingefügt. Der eigentliche Translokationsschritt findet an sogenannten Adhäsionsstellen statt und erfordert ein elektrisches Potential an der inneren mitochondrialen Membran. Die Leitsequenzen der importierten Precursor werden von Prozessierungsproteasen abgetrennt. An der letzten Phase des Imports, der Beendigung der Translokation und der Faltung der Proteine, sind wiederum Hitzeschockproteine beteiligt (HSP 70 und HSP 60).

Die Haupt-Prozessierungsaktivität der Mitochondrien ist in der Matrix lokalisiert und wurde für Hefe, *Neurospora* und Ratte charakterisiert (Hawlitschek et al. 1988, Yang et al. 1988, Ou et al. 1989). Sie beruht auf dem

* Molekularbiologische Fachbegriffe aus dem Englischen sind in einem Glossar im Anhang erklärt.

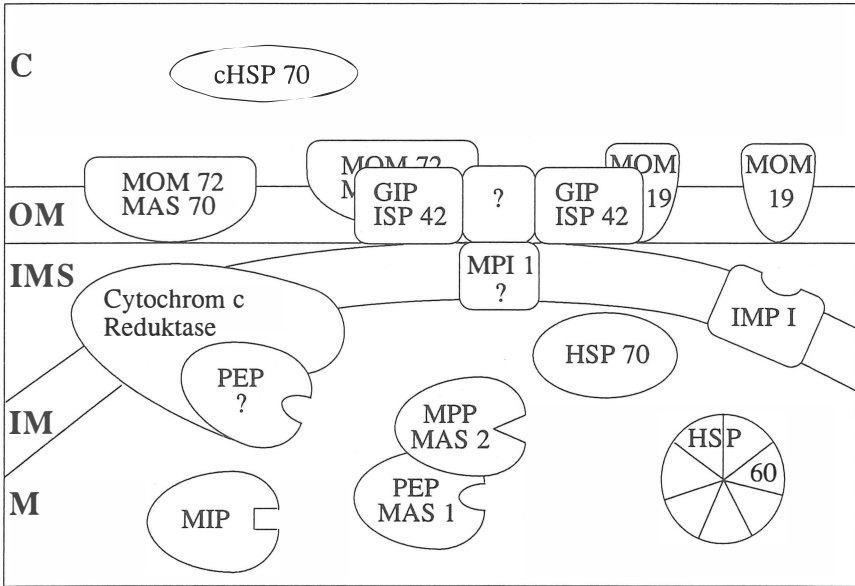


Abb. 2: Der Protein-Import-Apparat. Das Schema basiert auf einer Darstellung aus Pfanner et al. 1991. Die "Intermediate Processing Peptidase" (MIP), die "Inner Membrane Protease I" (IMP I) und ein potentielles Protein des Translokations-Komplexes (MPI 1) sind hinzugefügt (Kalousek et al. 1992, Schneider et al. 1991, Maarse et al. 1992). Für Abkürzungen siehe Verzeichnis im Anhang.

Zusammenwirken von zwei Komponenten, der "Matrix Processing Protease" (MPP) und dem "Processing Enhancing Protein" (PEP). In den Mitochondrien von Hefe liegen MPP und PEP assoziiert vor, wohingegen sie aus *Neurospora* nicht als Komplex isolierbar sind. MPP alleine hat nur geringe Aktivität für die Prozessierung mitochondrialer Precursor und wird durch PEP stimuliert. PEP könnte importierte Vorläufer-Proteine in eine Prozessierungs-bereite Konformation überführen, die genaue Funktion dieser Komponente ist jedoch noch unklar. Die Prozessierungsprotease benötigt divalente Ionen als Cofaktor und wird folglich durch EDTA gehemmt. Sie ist eine hochspezifische Endoprotease für mitochondriale Precursor. Ihre Substratspezifität ist nicht durch eine Konservierung der Primärsequenz der Vorläufer-Proteine an der Schnittstelle bedingt, jedoch befindet sich oftmals ein Arginin an der Position -2 (Gavel und v. Heijne 1990).

MPP und PEP sind kernkodiert, tragen selbst Leitsequenzen und werden post-

translational in die Mitochondrien importiert. Die reifen Proteine haben eine molekulare Größe um 50 kd und sind strukturell verwandt: MPP und PEP aus *Neurospora* gleichen sich zu 27 %, die entsprechenden Proteine aus Hefe zu 28 % (siehe Tabelle 2). Darüber hinaus weisen die Komponenten der Prozessierungsprotease aus Pilzen und Säugern eine begrenzte Homologie mit den Core-Proteinen der Cytochrom c Reduktase auf und werden daher derselben Proteinfamilie zugeordnet (Jensen und Yaffe 1988). Für den Proteinkomplex aus *Neurospora* ergab sich der überraschende Befund, daß das Core-Protein I und das "Processing Enhancing Protein" von ihren Sequenzen her identisch sind (Schulte et al. 1989). Auch physiologisch erwies sich das Core-Protein I *in vitro* als effektiver "Enhancer" für die endoproteolytische Aktivität von MPP. *In vivo* wird jedoch eine andere Situation angenommen, da ein Teil des PEP als lösliches Protein in der Matrix der Mitochondrien aus *Neurospora* vorkommt (Arretz et al. 1991). In Hefe sind PEP und das Core-Protein I verschieden; weitere Organismen wurden in bezug auf den Zusammenhang zwischen Cytochrom c Reduktase und Prozessierungsprotease bisher nicht untersucht.

	R.n.	S.c.	N.c.	S.c.	N.c.	B.t.	S.c.	B.t.	
	MPP	MPP	MPP	PEP	PEP/ SUI	SU I	SU I	SU II	
R.n.	MPP	•							
S.c.	MPP	37	•						
N.c.	MPP	35	47	•					
S.c.	PEP	29	28	26	•				
N.c.	PEP/SU I	30	28	27	56	•			
B.t.	SU I	27	22	22	37	43	•		
S.c.	SU I	22	24	21	25	32	26	•	
B.t.	SU II	27	28	23	27	27	21	23	•
S.c.	SU II	17	16	13	20	22	17	17	21

Tabelle 2: Homologien zwischen PEP, MPP und den Core-Proteinen der Cytochrom c Reduktase (aus Bechmann et al. 1992). Die Berechnungen erfolgten auf der Basis paarweiser Alignments von Sequenzen aus Ratte (R.n.), Rind (B.t.), Hefe (S.c.) bzw. *Neurospora* (N.c.).

Einige mitochondriale Precursor-Proteine weisen eine zweigeteilte Leitsequenz auf, von der lediglich der vordere Bereich, der als "Matrix targeting"-Domäne bezeichnet wird, von MPP und PEP entfernt wird. Der verbleibende Anteil der

Leitsequenz enthält Informationen für die innermitochondriale Verteilung von importierten Proteinen. Bei kernkodierten Komponenten des mitochondrialen Intermembranraums (z.B. Cytochrom c_1 der Cytochrom c Reduktase aus Pilzen und Säugern) ist dieser Abschnitt in der Regel ungeladen/hydrophob und wird "intramitochondrial sorting"-Domäne genannt. Nach dem "Stop transfer"-Modell bleiben Precursor mit dieser Domäne während ihres Imports an den Adhäsionsstellen in der Membran stecken und erreichen den Intermembranraum durch laterale Diffusion (v. Loon und Schatz 1987, Glick et al. 1992a, Glick et al. 1992b). Einem anderen Modell zufolge werden die kernkodierten Proteine dieses mitochondrialen Subkompartiments zunächst vollständig in die Matrix transportiert und anschließend über die innere Membran reexportiert (Hartl et al. 1987, Hartl und Neupert 1990, Koll et al. 1992). Da der Mechanismus des Rücktransports in den Intermembranraum mit bakteriellen Exportvorgängen homologisiert werden kann, ist dieses Modell unter dem Schlagwort "conservativ sorting" in die wissenschaftliche Literatur eingegangen.

Die "intramitochondrial sorting"-Domäne wird von einer "Inner membrane protease I" (IMP I) prozessiert, die in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert ist (Schneider et al. 1991, Behrens et al. 1991). Es gibt genetische Hinweise auf eine weitere Protease in der inneren Membran, die ebenfalls "sorting"-Signale prozessiert (Pratje und Guiard 1986).

Einige mitochondriale Proteine haben eine zweigeteilte Leitsequenz, deren hinterer Bereich aus einem charakteristischen Oktapeptid besteht (z.B. das Eisen-Schwefel-Protein der Cytochrom c Reduktase aus Pilzen). Die genaue Funktion dieses Sequenzmotivs ist bisher unklar. Es wird von einer sogenannten "Mitochondrial Intermediate Protease" (MIP), die sich in der Matrix befindet, abgetrennt (Kalousek et al. 1992, Isaya et al. 1992).

1.3. Die Atmungskette und der Protein-Import-Apparat in den Mitochondrien höherer Pflanzen

Über die Proteinkomplexe der Atmungskette und die Komponenten des Protein-Import-Apparates aus höheren Pflanzen ist vergleichsweise wenig bekannt. Die DNA-Sequenzen von einigen kernkodierten mitochondrialen Proteinen liegen inzwischen jedoch vor. Pflanzliche Precursor zeichnen sich demnach wie ihre Counterparts aus Pilzen und Säugern durch N-terminale Leitsequenzen aus, die von vergleichbarer Länge sind und eine ähnliche

Aminosäurekomposition aufweisen (Boutry und Chua 1985, White und Scandalios 1988, Gietl et al. 1990). Wie die Rezeptoren beschaffen sind, mit denen sie interagieren, ist gegenwärtig noch unklar. Als erstes potentiell Element des Protein-Import-Apparates höherer Pflanzen gelang die Identifizierung eines HSP 60 (Prasad und Hallberg 1989, Prasad und Stewart 1992). Zwischenzeitlich liegen auch Veröffentlichungen über ein 68 kD Hitzeschockprotein vor, das ein Analogon zu HSP 70 aus den Mitochondrien von Pilzen und Säugern darstellt (Watts et al. 1992, Neumann et al. 1993, Vidal et al. 1993). Eine pflanzliche Prozessierungsaktivität wurde erstmals von Böhni et al. (1980) nachgewiesen. Die Spezifität der putativen Protease gleicht derjenigen aus Pilzen, da Vorläufer-Proteine mit einer Leitsequenz aus Hefe oder *Neurospora* in pflanzliche Mitochondrien importiert und zur korrekten Größe prozessiert werden (Whelan et al. 1988, Schmitz und Lonsdale 1989, Chaumont et al. 1990). Ein Antiserum gegen PEP aus *Neurospora* ist in der Lage, die Prozessierungsaktivität aus mitochondrialen Lysaten von *Vicia faba* zu eliminieren (Whelan et al. 1990). Weitere Erkenntnisse über die pflanzliche Prozessierungsprotease lagen zu Beginn dieser Arbeit noch nicht vor.

Die Cytochrom c Reduktase und andere Enzymkomplexe der Atmungskette sind auch aus den Mitochondrien höherer Pflanzen gereinigt bzw. angereinigt worden (Maeshima und Asahi 1978, Maeshima et al. 1987, Hawkesford und Leaver 1987), Erkenntnisse über ihre Struktur und Physiologie sind jedoch fragmentarisch. Nakajima et al. (1984) isolierten den bc₁-Komplex aus Batate über ein Protokoll in Anlehnung an Hatefi et al. (1962). Der aus 8 Untereinheiten bestehende Proteinkomplex zeigte jedoch keinerlei Ubiquinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Aktivität. Eine modifizierte Methode erlaubte Degli Esposti et al. (1985) die Präparation einer aktiven, jedoch lediglich angereinigten Cytochrom c Reduktase aus Jerusalem Artischocke. Mit Hilfe chromatographischer Verfahren isolierten Hawkesford et al. (1989) und Pfeiffer et al. (1990) Cytochrom c Reduktase aus Mais bzw. Weizen und identifizierten einzelne Untereinheiten des Proteinkomplexes. Während das in der vorliegenden Arbeit beschriebene Isolationsprotokoll entwickelt wurde, berichteten Berry et al. (1991) erstmalig von einer gereinigten und aktiven Cytochrom c Reduktase aus pflanzlichen Mitochondrien. Es wurde Dodecyl-Maltosid für die Solubilisierung der Membranproteine und Anionenaustausch-Chromatographie für die Enzymisolierung verwendet. Der Proteinkomplex setzt sich aus 10 Untereinheiten zusammen, die teilweise den analogen Komponenten der Cytochrom c Reduktasen aus Pilzen und Säugern zugeordnet werden können.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation soll eine Methode zur sauberen und effizienten Isolierung der Cytochrom c Reduktase höherer Pflanzen vorgestellt werden. Das Verfahren basiert auf Cytochrom c Affinitätschromatographie und wurde von Weiss und Juchs (1978) für die Präparation dieses Proteinkomplexes aus den Mitochondrien von *Neurospora* entwickelt. Die gereinigten und monodispersen Cytochrom c Reduktasen aus Kartoffel und Weizen werden hinsichtlich ihrer Physiologie, ihrer Struktur und ihrer Zusammensetzung eingehend untersucht. Einzelne Untereinheiten der Proteinkomplexe werden identifiziert und charakterisiert. Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Frage nach einer möglichen Beteiligung der Cytochrom c Reduktase höherer Pflanzen an der Prozessierung importierter Vorläufer-Proteine.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Material

2.1.1. Chemikalien und Lösungsmittel

Die verwendeten Chemikalien und Lösungsmittel wurden - sofern nicht anders vermerkt - von den Firmen Merck, Darmstadt (pro analysi grade), Serva, Heidelberg (research grade), Biorad, USA (Electrophoresis purity grade), Boehringer, Mannheim und Sigma, USA bezogen. Die Hersteller von Enzymen, Säulenmaterialien, Filtern und Apparaturen sind unter Methoden aufgeführt.

2.1.2. Versuchsorganismen

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurden mit folgenden Organismen durchgeführt: *Solanum tuberosum* (Kartoffel), Varietäten 'Hansa', 'Désirée', 'Bintje', 'Marfona', 'Jaerla' und 'Ukama', *Triticum aestivum* (Weizen) Varietät 'Nandu', *Brassica oleracea* (Kohl), Varietät 'Botrytis', *Oenothera berteriana* (Nachtkerze), *Saccharomyces cerevisiae* Stamm AH 216 und *Neurospora crassa* Stamm R2.

2.2. Grundmethoden der Proteinanalyse

2.2.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

(nach Laemmli 1970)

Über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine im elektrischen Feld verhält sich annähernd umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichts.

Die genauen Trenneigenschaften dieser Methode hängen von vielen Parametern ab (Polyacrylamidkonzentration, Stromstärke, Temperatur, Reinheit der eingesetzten Chemikalien etc.). Um möglichst reproduzierbare Ergebnisse zu erzielen, wird folgendes System verwendet: Gellösungen nach Laemmli (diskontinuierliche Gelelektrophorese); Gellinien 20 x 16 x 0,15 cm mit 15 "Slots" (Geltaschen); Gelapparatur: Protean II-Modell (Biorad, USA); Gel-

lauf bei 40 mA und 4°C für 6-7 Stunden. Proteinkonzentrationen werden vor dem Gellauf über den Biorad Protein-Assay (nach Bradford 1976) abgeschätzt. Pro Slot werden 0,1-2 µg je Protein aufgetragen. Als Proteinstandard wird der "Rainbow-Marker" RPN756 (Amersham, England) verwendet.

Hydrophobe Proteine können durch Erwärmen vor dem Auftrag irreversibel verklumpen und sollten daher kühl gehalten werden. Für die Auftrennung von Proteinen ≤ 12 kd gilt es, Detergens- und Salzkonzentrationen in den Probenansätzen so klein wie möglich zu halten.

Die Gele werden nach der Elektrophorese für 1 Stunde mit 0,25% (w/v) Coomassie (Merck, Darmstadt)/45 % Methanol/10 % Essigsäure inkubiert, anschließend in 35 % Methanol/7,5 % Essigsäure entfärbt und getrocknet. Zum Trocknen der Gele eignet sich Cellophan (im Handel unter der Bezeichnung "Einmachfolie" [Alba, Bielefeld] zu erwerben).

Die Auftrennung von Proteinen in präparativem Maßstab für die automatische Aminosäuresequenzierung (siehe 2.2.9.) oder die Herstellung von Antikörpern (2.2.5.) erfolgt im selben Gelsystem, jedoch mittels ün auspolymerisierten Gelen mit lediglich einem Slot.

2.2.2. Zweidimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Noch gesteigerte Auftrennungen ermöglichen zweidimensionale Gelsysteme, mit denen komplexe Proteingemische durch Kombination von isoelektrischer Fokussierung in Anwesenheit von Harnstoff in der ersten Dimension und einer SDS-PAGE (siehe oben) in der zweiten Dimension analysierbar sind. Es wird die von Geyl et al. (1981) beschriebene Methode angewendet.

2.2.3. Elektroelution

In Gelsystemen aufgetrennte Proteine lassen sich für weitere Untersuchungen elektrisch wieder aus Gelmaterialien eluieren. Dazu werden entsprechende Proteinbanden aus präparativen Proteingelen ausgeschnitten, die Gelstückchen in Elektrophorese-Puffer (150 mM Glycin/20 mM Tris-HCl [pH 8,5]/0,1 % SDS) inkubiert und in eine Elektroelutionskammer (Elektro Eluter Modell 422, Biorad, USA) überführt. Die Elution erfolgt bei 60 V für 15 Stunden in Elektrophorese-Puffer. Die eluierten Proteine werden anschließend gegen 100 mM Tris (pH 7,6)/0,1 % Triton X-100 /0,2 mM PMSF (Sigma, USA) dialysiert.

2.2.4. Western Blotting

(nach Towbin et al. 1979)

Mit Hilfe von "Western Blots" werden Proteine von Gelsystemen auf Filterträger transferiert und sind damit für weitere Untersuchungen zugänglich (Immunfärbung, siehe 2.2.6. und Sequenzierung von Proteinen, siehe 2.2.9.). Nach Abschluß einer Gelelektrophorese werden Gel und Filter (Nitrozellulosefilter BA 83, Schleicher und Schuell, Dassel) zwischen Whatman-Filtern und Schwämmen "sandwich-artig" eingebettet und in einen Puffertank (Trans Blot Cell, 18 x 24 x 9,5 cm, Elektrodenabstand 8 cm, Biorad, USA) mit 20 mM Tris-HCl (pH 8,8)/150 mM Glycin/20 % Methanol eingeführt. Das Blotten erfolgt bei 200 mA für 6 Stunden. Transferierte Proteine können über 0,5 % (w/v) Ponceau-S (Sigma, USA) in 1 % Essigsäure (entfärben mit destilliertem Wasser) oder 0,1 % (w/v) Amidoschwarz (Merck, Darmstadt) in 50 % Methanol (entfärben mit 30 % Methanol) visualisiert werden. Alternativ sind Banden selektiv über Immunfärbungen identifizierbar (siehe 2.2.6.).

Für das Blotten von Proteinen aus präparativen Gelen zur anschließenden Aminosäuresequenzierung werden Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membranfilter (Millipore, USA) verwendet, die sich durch eine besonders hohe Bindungskapazität für Proteine auszeichnen. Als Blotpuffer wird 20 mM Tris-HCl (pH 8,8)/0,05 % SDS/1 mM DTT/20 % Methanol verwendet. Die Membranfilter werden für jeweils eine Minute in Methanol und Blotpuffer vorinkubiert. Auch die Gele werden vor dem Transfer für dreimal 10 Minuten mit Blotpuffer behandelt. Das Blotten erfolgt bei 500 mA für 15 Stunden im Kalten (4°C). Anschließend werden die Membranfilter in destilliertem Wasser gespült (dreimal 10 Minuten), mit Ponceau-S angefärbt (siehe oben) und die Proteinbanden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Filterstreifen werden direkt weiterverarbeitet (siehe 2.2.5., 2.2.8. und 2.2.9.) oder eingefroren und bei -20 °C gelagert.

2.2.5. Herstellung von Antikörpern

Immunisierung von Kaninchen mit SDS-PAGE separierten Proteinen

Proteingemische, in denen die für eine Immunisierung vorgesehenen Proteine mit jeweils $\geq 50 \mu\text{g}$ vertreten sind, werden über präparative Proteingele aufgetrennt, die entsprechenden Coomassie-gefärbten Banden aus den Gelen aus-

geschnitten und in Dialyseschläuche überführt. Zunächst wird für 12 Stunden gegen Entfärber (siehe 2.2.1.) dialysiert, anschließend für 24 Stunden gegen Tris-HCl (pH 7,6). Die Gelstreifen werden in einer Vakuum-Zentrifuge eingengt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und zermörsert. Das für 12 Stunden in 1-2 ml 50 mM Tris-HCl (pH 7,6) aufgequollene Pulver dient für die Immunisierungen (Erst- und Zweitimmunisierung mit jeweils 0,5 ml im Abstand von ca. 6 Wochen).

Alternativ zu Proteinen aus SDS-Polyacrylamidgelen können auch gebloottete Proteine für Immunisierungen verwendet werden. Die Proteine werden dazu mit 80 % Ameisensäure von den PVDF-Membranen abgelöst (siehe auch 2.1.8.), auf ca. 1-2 ml eingengt und wie oben beschrieben für die Injektionen eingesetzt.

Aufarbeitung des Kaninchenblutes

Blutabnahmen erfolgen vor der Erstimmunisierung (Präimmunserum) und 11, 19 bzw. 27 Tage nach der Zweitimmunisierung (Antiseren). Das Blut wird jeweils für 12 Stunden bei 4°C belassen und der Blutkuchen in zwei Zentrifugationsschritten für 10 Minuten bei 150 xg pelletiert. Die Überstände werden vereinigt, mittels einer abschließenden Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 xg von verbliebenen zellulären und verklumpten Komponenten gereinigt, eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Spezifität und der Titer der Antiseren läßt sich über Immunfärbungen (siehe folgendes Kapitel) oder schneller noch über Ouchterlony-Geldiffusionstests (Ouchterlony 1958, 1962) bestimmen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Antiseren gegen die 55, 53, 51, 14 und 12 kd-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel hergestellt, außerdem ein Antiserum gegen natives Gesamtprotein der Cytochrom c Reduktase. Die Immunisierungen für die drei letztgenannten Seren erfolgten über die Firma Eurogentec, Belgien. Die Abbildungen 3 und 28 dokumentieren die Spezifität der Antikörper.

2.2.6. Immunfärbung

(nach Hsu et al. 1981)

Über Immunfärbungen können einzelne Proteine zuvor aufgetrennter und geblootteter Proteingemische mit Hilfe von spezifischen Antikörperlösungen identifiziert werden ("Immunoblotting"). Eine besonders sensitive Methode

basiert auf einer über das Biotin-Avidin-System verstärkten Farbreaktion: Primäre Antikörper werden dabei von biotinylierten sekundären Antikörpern erkannt, an die Avidin bindet. An jedes Avidin-Molekül können mehrere Peroxidasen binden. Die Peroxidasen oxidieren DAB mit H₂O₂ als Oxidationsmittel, wobei ein dunkler Niederschlag entsteht.

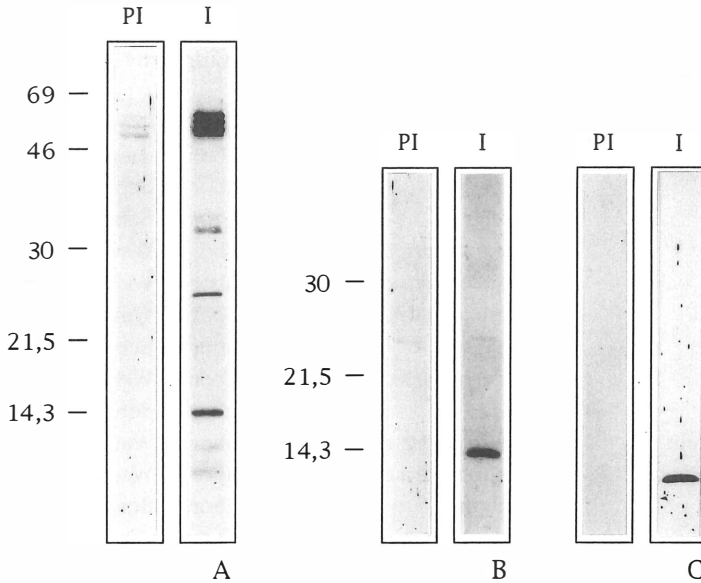


Abb. 3: Immunoblot der gereinigten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel nach Inkubation mit Antikörpern, die (A) gegen Gesamtprotein des Proteinkomplexes gerichtet sind, (B) gegen die 14 kd-Untereinheit und (C) gegen die 12 kd-Untereinheit. Die Präimmunsere (PI) zeigen keine Reaktion mit den aufgetrennten Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase, wohingegen die Immunsere (I) jeweils das für die Immunisierung verwendete Protein erkennen. Die Zahlen links geben die Molekulargewichte von Standardproteinen an.

Bei Immunfärbungen wird wie folgt verfahren (Vectastain-ABC-Kit, Vector Inc., USA): Western Blots werden nacheinander für jeweils 2 Stunden in Inkubationspuffer (0,1 M Tris-HCl [pH 7,4]/0,1 % Tween 20/0,15 M NaCl) mit a) primärem Antikörper (Serum 1:1000 verdünnt), b) sekundärem Antikörper (1 Tropfen/20 ml) und c) Avidin-Peroxidase-Komplex (je 1 Tropfen/20 ml) inkubiert. Nach jedem Inkubationsschritt wird für dreimal 10 Minuten

mit obigem Puffer gewaschen, um unspezifische Bindungen zu lösen. Mit der Peroxidase-Entwicklung in 0,1 M Tris-HCl (pH 7,4)/0,3 mM NiCl₂/0,03 % H₂O₂/1,5 mM DAB (Sigma, USA) werden die vom Serum erkannten Antigene sichtbar gemacht.

Tabelle 3: Antikörper, die für die Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung standen (Abkürzungen siehe Verzeichnis im Anhang):

Antigen	Organismus	Bezugsquelle
PEP	<i>Neurospora crassa</i>	Labor W. Neupert, München
MPP	<i>Neurospora crassa</i>	Labor W. Neupert, München
MAS 1	Hefe	Labor G. Schatz, Basel
MAS 2	Hefe	Labor G. Schatz, Basel
Core 1	<i>Neurospora crassa</i>	Labor H. Weiss, Düsseldorf
Core 2	<i>Neurospora crassa</i>	Labor H. Weiss, Düsseldorf
Cyt. b	<i>Neurospora crassa</i>	Labor H. Weiss, Düsseldorf
	Hefe	Labor G. Schatz, Basel
Cyt. c1	<i>Neurospora crassa</i>	Labor H. Weiss, Düsseldorf
	Hefe	Labor G. Schatz, Basel
FeS-Protein	<i>Neurospora crassa</i>	Labor H. Weiss, Düsseldorf
kleine SUs der CR	<i>Neurospora crassa</i>	Labor H. Weiss, Düsseldorf
SOD	Tabak	Labor C. Bowler, Gent
ANT	<i>Neurospora crassa</i>	Labor W. Neupert, München
HSP 60	Kartoffel	Labor D. Neumann, Halle

2.2.7. Antikörperfällung

Mittels Antikörperfällungen ist es möglich, selektiv die von einem Antiserum erkannten Antigene aus einem Proteingemisch herauszufällen. Dabei findet ein Antikörper-bindendes Protein aus Staphylococceen Verwendung, das kovalent an eine Matrix aus Kohlenhydraten gebunden ist (Protein A-Sepharose CL-4B, Pharmacia, Schweden). Es wird im wesentlichen wie von Friedrich et al. (1989) beschrieben vorgegangen: Proteingemische (250 µl-Aliquots) werden mit 750 µl Kopplungspuffer (50 mM MOPS [pH 7,3]/150 mM NaCl/0,5 % Triton X-100) und jeweils 25 µl Antiserum gemischt und für 30 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wird 2,5 mg Protein A-Sepharose CL-4B (als 50 mg/ml-Lösung in Kopplungspuffer) zugegeben und für weitere 15 Stunden

bei 4°C inkubiert. Die Protein A-Sepharose-Fraktion wird dreimal mit Kopplungspuffer (siehe oben) und einmal mit Kopplungspuffer ohne Triton X-100 gewaschen. Die gefällten Proteine werden direkt über SDS-PAGE analysiert. Dabei wird ein Probenpuffer ohne Mercaptoethanol verwendet, um die Immunglobuline nicht zu monomerisieren.

2.2.8. Enzymatische Proteinspaltung und HPLC-Auftrennung generierter Peptide

(nach Graack et al. 1991, Grohmann et al. 1991)

Die Analyse von internen Aminosäuresequenzen (2.2.9.) erfordert eine definierte Fragmentierung isolierter Proteine. Dabei finden sequenzspezifische Endoproteinasen Verwendung. Die generierten Peptide werden im Anschluß über HPLC aufgetrennt. Es wird nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Etwa 0,5-1 nmol isoliertes Protein auf Filterstreifen (siehe 2.2.4.) wird für 30 Minuten mit 3 ml einer PVP 40-Lösung (0,2 %ig in Methanol) inkubiert, um freie Membranoberfläche abzusättigen. Die Lösung wird abgenommen, und die Filterstreifen werden viermal mit jeweils 4 ml destilliertem Wasser sowie einmal mit Reaktionspuffer (0,1 M Tris-HCl, pH 8,0) gewaschen. Es folgt die Verdauung des Proteins mit 0,5 U Endoproteinase Lys C (Boehringer, Mannheim) oder Trypsin (Boehringer, Mannheim) in 1,5 ml Reaktionspuffer für 15 Stunden bei 37°C. Der Überstand wird dekantiert und die Filterstreifen werden anschließend zweimal mit 1 ml 80 %iger Ameisensäure (Inkubation für jeweils 15 Minuten) und einmal mit 1 ml destilliertem Wasser gewaschen. Überstand, Ameisensäure-Fractionen und Washwasser werden vereinigt, in einer Vakuum-Zentrifuge auf ca. 0,5 ml eingengt und über Umkehrphasen-HPLC aufgetrennt.

[Die HPLC-Auftrennungen der vorliegenden Arbeit wurden von Dr. Volker Kruft am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlem bzw. am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch durchgeführt:] Enzymatisch fragmentierte Proteine werden auf eine C18 Säule (4,6 x 250 mm, EnCaPharm RP18-TS, Molnar, Berlin) aufgetragen und die Peptide über einen Gradienten aus Wasser und Acetonitril mit jeweils 0,1 % Trifluoressigsäure bei einer Flußrate von 0,5 ml/Minute aufgetrennt (nach Kruft 1992 und Kruft et al. 1991). Protein-Detektion erfolgt mit einem Durchflußphotometer bei 220 nm. Das Eluat wird in 60 Sekunden-Fractionen unterteilt.

2.2.9. Sequenzierung von Proteinen und Peptiden

(nach Lottspeich 1985)

N-terminale Aminosäuresequenzen von Proteinen (gebunden an PVDF-Filtestreifen, siehe 2.2.4.) bzw. von Peptiden (eingeeingte und in 30 μ l Trifluoressigsäure neu aufgenommene HPLC-Fractionen, siehe 2.2.8.) werden mit einem automatischen Proteinsequenzierer (Modell 477A, Applied Biosystems, USA) nach dem Prinzip der zyklischen Protein-Degradierung (Edman 1950) bestimmt. Phenylthiohydantoin-Aminosäuren werden gekoppelt über eine HPLC analysiert (Modell 120A, Applied Biosystems, USA) und mittels manueller Datenauswertung identifiziert. [Die Aminosäuresequenzierungen für diese Arbeit wurden von Dr. Volker Krufft am Max-Planck-Institut für Molekulare Genetik in Berlin-Dahlen bzw. am Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin in Berlin-Buch durchgeführt.]

2.3. Präparation von Mitochondrien

2.3.1. Isolierung von Mitochondrien aus Knolle, Sproß und Wurzel der Kartoffel

(nach Douce 1985 und Boutry et al. 1984, modifiziert)

Reinigung von Mitochondrien aus Kartoffelknolle

Alle Arbeitsschritte werden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt; die verwendeten Lösungen und Gefäße sind auf 4°C vorgekühlt. Kartoffelknollen werden geschält, zerkleinert, im Verhältnis 1:1 mit Aufschlußpuffer (0,4 M Mannitol/1 mM EGTA/25 mM MOPS [pH 7,8]/0,1 % BSA/5 mM Mercaptoethanol) versetzt und mit einem "Waring-Blender" in drei 3-Sekunden-Intervallen aufgeschlossen. Das Lysat wird durch vier Lagen Mullbinde und eine Lage Miracloth filtriert und anschließend differentiell in zwei Stufen zentrifugiert: Zellbruchstücke, Zellkerne und Amyloplasten pelletieren nach einer 5-minütigen Behandlung bei 3500 xg, woraufhin sich die Fraktion der Mitochondrien aus dem Überstand durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 18000 xg sedimentieren läßt. Das Pellet wird mit einem Pinsel resuspendiert und mit einem "Dounce-Homogenisator" dispergiert. Eine weitere Aufreinigung der Mitochondrien erfolgt über Percoll-(Pharmacia, Schweden) Gradientenzentrifugation (Neuburger et al. 1982). Es wird ein Stufengradient mit 14%-, 28%- und 45%-Phasen verwendet und für 45 Minuten bei 70000 xg zentrifugiert.

Die Mitochondrien-Bande an der 28%/45%-Interphase wird entnommen, mit Waschpuffer (0,4 M Mannitol/1 mM EGTA/5 mM MOPS [pH 7,5]/0,1 % BSA) verdünnt und für 10 Minuten bei 18000 xg zentrifugiert. Nach ein bis zwei weiteren Waschschrritten werden die Mitochondrien in Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol/10 mM Tricine [pH 7,2]/1 mM EGTA/1 mM PMSF) aufgenommen - die Konzentration für mitochondriales Protein sollte ca. 20 mg/ml betragen - und entweder direkt weiterverarbeitet (siehe 2.3.4.) oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Mit der geschilderten Methode lassen sich aus 4 kg Kartoffeln ca. 1 g Mitochondrien gewinnen. Der Gewichtsanteil des mitochondrialen Proteins beträgt bezogen auf das Feuchtgewicht von isolierten Mitochondrien ca. 10% (siehe auch Douce 1985).

Anreinigung von Mitochondrien aus Kartoffelknolle

Für die Affinitätsreinigung der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel (siehe 2.4.2.) sind angereinigte Mitochondrien vollkommen ausreichend, so daß auf Percoll-Gradienten verzichtet werden kann. Korrespondierend zu den Fraktionen, die normalerweise im Percoll-Gradienten sichtbar sind, wird das Pellet nach der differentiellen Zentrifugation (siehe oben) mit einem weichen Pinsel in drei Teile separiert: ein weißes Pellet aus Amyloplasten, eine braune Fraktion, die vorwiegend Mitochondrien enthält und eine gelbe Fraktion, in der sich aufgebrochene Organellen, Proteine und Pigmente befinden. Die braune Fraktion wird resuspendiert und durch zwei bis drei Zentrifugations-schritte gewaschen. Die aus dieser Fraktion isolierte Cytochrom c Reduktase (siehe 2.4.) hat dieselbe Komposition und identische spektroskopische Eigenschaften wie der Enzymkomplex, der aus Percoll-gereinigten Mitochondrien gewonnen wird. Mit der geschilderten Methode lassen sich aus 8-10 kg Kartoffeln ca. 3 g Mitochondrien gewinnen.

Reinigung von Mitochondrien aus Kartoffelsproß und -wurzel

Zur Isolierung von Mitochondrien aus Kartoffelsprossen und -wurzeln werden Pflanzen im Dunkeln bei Raumtemperatur für ca. sechs Wochen in Plastiktöpfen (Ø 16 cm) angezogen. Bei einer Pflanzengröße von 10 bis 15 cm werden Sprosse und Wurzeln separat geerntet, gewaschen und zerkleinert. Die Gewebe werden im Verhältnis 3:1 mit Aufschlußpuffer (siehe oben) versetzt. Die weitere Aufreinigung erfolgt analog zum Protoll für die Mitochondrien-Isolierung aus Kartoffelknollen.

2.3.2. Isolierung von Mitochondrien aus Weizen

(nach Breiman 1987, modifiziert)

Reinigung von Mitochondrien aus Weizenkeimlingen

Für die Isolierung von Mitochondrien aus Weizen sind 3-5 Tage alte Keimlinge besonders geeignet, da sich ihre noch dünnen Zellwände leicht aufbrechen lassen. Die Keimlinge werden im Dunkeln in Pikierkästen (50 x 32 x 6 cm) angezogen, bei einer Länge von 3-5 cm geerntet, gewaschen und in kaltem Puffer (0,4 M Mannitol/1 mM EGTA/25 mM MOPS [pH 7,8]/0,1 % BSA/5 mM Mercaptoethanol), der im Verhältnis 5:1 zugegeben wird, aufgeschlossen. Die Aufreinigung der Mitochondrien erfolgt wie für die Mitochondrienisolierung aus Kartoffelknollen beschrieben. Bei der Percoll-Gradientenzentrifugation werden jedoch 13,5 %, 21,0 % und 45 %-Phasen verwendet, und es wird bei 80000 xg für 45 Minuten zentrifugiert.

Reinigung von mitochondrialen Membranen aus Weizenkeimextrakt

Alternativ können mitochondriale Membranen aus Weizen auch aus Weizenkeimextrakt (Sigma, USA) isoliert werden (Pfeiffer et al. 1990). Dazu wird Weizenkeimextrakt im Verhältnis 7:1 in kaltem Aufschlußpuffer (hier: 0,4 M Mannitol/1 mM EGTA/25 mM MOPS [pH 7,8]/0,1 % BSA/2 mM PMSF/1 % PVP) aufgenommen und mit einem "Waring-Blender" für 15 Sekunden homogenisiert. Das Homogenisat wird für 15 Minuten bei 13000 xg zentrifugiert und der Überstand anschließend durch vier Lagen Mullbinde und eine Lage Miracloth filtriert, um agglomeriertes Fett zu entfernen. Durch Zentrifugation für 40 Minuten bei 28000 xg pelletiert eine Fraktion mit mitochondrialen Membranen, die in 0,4 M Mannitol/1 mM EDTA/5 mM MOPS (pH 7,2)/0,1 % BSA/2 mM PMSF aufgenommen und mit einem "Dounce-Homogenisator" dispergiert wird. Es folgt eine abschließende differentielle Zentrifugation: verbliebene Verunreinigungen werden durch eine 15minütige Behandlung bei 3000 xg pelletiert und verworfen, woraufhin sich eine Fraktion mit gereinigten mitochondrialen Membranen aus dem Überstand durch Zentrifugation für 30 Minuten bei 48000 xg sedimentieren läßt. Sie wird in Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol/10 mM Tricine [pH 7,2]/1 mM EGTA/1 mM PMSF) aufgenommen - die Konzentration für mitochondriales Protein sollte ca. 20 mg/ml betragen - und entweder direkt weiterverarbeitet (siehe 2.4.1.) oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.3. Isolierung von Mitochondrien aus Hefe und *Neurospora*

Hefezellen werden für die Mitochondrien-Isolierung in einem Lactat-Medium angezogen und enzymatisch mit Zymolyase (Seikagaku Kogjo, Tokio) aufgeschlossen. Das Verfahren für die Präparation der Mitochondrien ist in Daum et al. (1982) beschrieben. Eine Methode zur Isolierung von Mitochondrien aus *Neurospora crassa* ist in Zimmermann und Neupert (1980) und in Schleyer et al. (1982) angegeben.

2.3.4. Subfraktionierung isolierter Mitochondrien

(nach Linke und Weiss 1986)

Mitochondrien lassen sich durch Behandlung mit Ultraschall effektiv aufbrechen. Dazu werden isolierte Mitochondrien abzentrifugiert und in hypotonischem 0,2 M Na-Phosphat-Puffer (pH 7,3) neu aufgenommen. Es werden vier Impulse Ultraschall à 10 Sekunden appliziert. Die Mitochondrien-Suspension sollte dabei auf Eis gehalten werden und 1 mM PMSF enthalten. Eine Subfraktionierung der Mitochondrien kann durch einfache Ultrazentrifugation für 90 Minuten bei 150000 xg erreicht werden. Dabei pelletieren mitochondriale Membranfragmente, wohingegen Matrix- und Intermembranraum-Komponenten im Überstand verbleiben. Das Pellet wird in destilliertem Wasser aufgenommen - die Proteinkonzentration sollte ca. 40 mg/ml betragen - und mit Hilfe von zwei kurzen Ultraschall-Impulsen in Gegenwart von 1-2 μ l Silicon Antischaum-Emulsion (Serva, Heidelberg) resuspendiert. 3 g Mitochondrien ergeben ca. 150 mg mitochondriales Membranprotein.

Für die Isolation des Cytochrom c Reduktase-Komplexes aus der inneren mitochondrialen Membran über Cytochrom c-Affinitätschromatographie (siehe 2.4.) ist es von besonderer Bedeutung, Verunreinigungen durch internes Cytochrom c im Membran-Pellet der Ultrazentrifugation möglichst klein zu halten. Mitochondrien, die bei der Ultraschall-Behandlung unzerstört geblieben sind, sollten daher in einem vorgeschalteten Zentrifugationsschritt für 7 Minuten bei 5000 xg sedimentiert und verworfen werden.

Eine alternative Subfraktionierungsmethode basiert auf der Inkubation von isolierten Mitochondrien mit 0,5 % Octyl-Polyoxyethylen (OPOE), einem milden Detergens. Das Verfahren ist in Vestweber und Schatz (1988) beschrieben und erlaubt ein besonders schonendes Aufbrechen der Mitochondrien. Über

Variationen der Detergens-Konzentration (0,2-0,7 %) ist die Identifizierung von assoziierten Membranproteinen möglich. Die Analyse der subfraktionierten Proteine erfolgt über SDS-PAGE und Immunoblotting (2.2.1., 2.2.4. und 2.2.6.). OPOE-behandelte Fraktionen werden nicht als Ausgangsmaterial für die Isolation der Cytochrom c Reduktase verwendet.

2.4. Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus den Mitochondrien höherer Pflanzen

Natürlicher Elektronenakzeptor der reduzierten Cytochrom c Reduktase in der Atmungskette ist das lösliche Intermembranraum-Protein Cytochrom c. Da die Cytochrom c Reduktase - Cytochrom c - Interaktion von entscheidender Bedeutung für den respiratorischen Elektronenfluß ist, kann von einer hohen Bindungsspezifität ausgegangen werden. Vor diesem Hintergrund wurde Cytochrom c-Affinitätschromatographie als Methode für die Isolation des Cytochrom c Reduktase-Komplexes entwickelt (Weiss und Juchs 1978, Weiss und Kolb 1979, Linke und Weiss 1986). Mit Hilfe nachgeschalteter Druckfiltration und Gelfiltrationschromatographie bzw. Saccharose-Gradientenzentrifugation kann ein hochgradig reiner Enzymkomplex aus den Mitochondrien von *Neurospora crassa* isoliert werden. Im folgenden ist die Übertragung dieser Methode für die Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus pflanzlichen Mitochondrien beschrieben.

2.4.1. Solubilisierung von mitochondrialen Membranproteinen mit Triton X-100

Mitochondriale Membranproteine (ca. 150 mg mit 40 mg/ml; alle weiteren Angaben im Reinigungsprotokoll für die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel beziehen sich auf diese Menge als Ausgangsmaterial) werden durch Zugabe einer eiskalten Triton X-100- (Sigma, USA) Lösung (Endkonzentration 3,3 %) solubilisiert. Triton X-100 ist ein mildes, nichtionisches Detergens mit Polyoxyethylen als polarer Kopfgruppe. Es ist für die Solubilisierung und Charakterisierung von Membranproteinen besonders geeignet, da es normalerweise nicht zur Denaturierung von Proteinen führt. Lipid-Lipid- und Lipid-Protein-Wechselwirkungen werden spezifisch gelöst, wohingegen Protein-Protein-Interaktionen weitgehend unberührt bleiben. Etwa 140 Monomere (0,625 kd) formen eine Detergensmizelle, deren Molekulargewicht bei ca. 90

kd liegt. Die kritische Mizellarkonzentration (=höchstmögliche Konzentration der monomeren Form eines Detergens) liegt bei 0,24 mM (0.021 %).

2.4.2. Affinitätschromatographie

Kovalente Kopplung von Cytochrom c an CNBr-aktivierte Sepharose

5 g CNBr-aktivierte Sepharose 4 B (Pharmacia, Schweden) werden für 5 Minuten in 50 ml 1 mmol HCl vorgequollen und durch fünfmaliges Waschen in einem Glasfilter mit 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3) von Additiven befreit. Um eine zu feste Bindung von Cytochrom c an das Säulenmaterial zu verhindern, wird ein Teil der Kopplungsgruppen inaktiviert (Cytochrom c hat viele Lysin-Reste, über die das Protein an die aktivierte Sepharose gebunden wird). Dazu wird für 3 Stunden in 50 ml 0,1 M NaHCO₃ bei Zimmertemperatur auf einem Schüttler inkubiert. Nach fünfmaligem Waschen mit 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl erfolgt die Kopplungsreaktion. 27 mg Cytochrom c (Sigma, USA) werden in 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl gelöst und mit der vorbehandelten Sepharose vereint. Drei Stunden Inkubation bei Zimmertemperatur führen zu annähernd vollständiger Bindung des Proteins an das Säulenmaterial. Anschließend wird erneut mit 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl gewaschen. Verbliebene freie Kopplungsgruppen werden für 30 Minuten bei 0°C mit 1 M Ethanolamin (pH 8,0) abgesättigt und nicht kovalent gebundenes Protein durch alternierendes Waschen mit 0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl (pH 8,0) und 0,1 M NaAc/0,5 M NaCl (pH 4,5) entfernt. Das Säulenmaterial wird mit 20 mM Tris-Ac (pH 7,0)/0,04 % Triton X-100 /5 % Saccharose/0,2 mM PMSF in eine Säule (1cm x 10 cm) gepackt und äquilibriert.

Die derart hergestellte Cytochrom c-Sepharose kann für mehrere chromatographische Auftrennungen verwendet werden. Das Säulenmaterial wird dabei nach jedem Lauf durch Inkubation mit 5 mM K₃[Fe(CN)₆]/0,5 % Triton X-100 /0,1 M NaHCO₃/0,5 M NaCl (pH 8,0) reoxidiert und mit 20 mM Tris-Ac/0,05 % Triton X-100 /5 % Saccharose/0,2 mM PMSF (pH 7,0) gewaschen, erneut in die Säule gepackt und äquilibriert.

Chromatographische Auftrennung

Die mit Triton X-100 solubilisierten Membranproteine werden für 10 Minuten bei 60000 xg zentrifugiert, um Membranlipide und mit ihnen assoziiert verbliebene Membranproteine zu pelletieren. Der rotbraune Überstand wird

auf die Cytochrom c-Sepharose-Säule mit einer Flußrate von 10 ml/Stunde aufgetragen. Die Säule wird mit unveränderter Flußrate für 60 Minuten mit 20 mM Tris-Ac (pH 7,0)/0,04 % Triton X-100 /5 % Saccharose/0,2 mM PMSF gespült und gebundene Proteine im Anschluß über einen linearen Salzgradienten mit 50 ml 20-200 mM Tris-Ac (pH 7,0) in Elutionspuffer bei einer Flußrate von 5 ml/Stunde abgelöst. Dem Gradienten werden 2 mM NaAscorbat (Sigma, USA) zugegeben, um durch Reduktion des Cytochrom c die Affinitätsbindung der Cytochrom c Reduktase zu lockern.

2.4.3. Druckfiltration

Von der Affinitätssäule eluierte Fraktionen, die Cytochrom b und c₁ enthalten (siehe 2.5.1.), werden vereint und unter Verwendung eines Diaflo XM 300 Filters (Amicon, USA) in einer 10 ml Druckfiltrationskammer eingeeengt (Druck \leq 2 bar). Das Ausschlußvolumen von ca. 300 kd führt zu einer selektiven Aufkonzentrierung von großen Proteinkomplexen bei etwa gleichbleibender Konzentration von verunreinigenden Einzelproteinen. Es werden ca. 10 ml Eluat der Affinitätssäule auf ein Volumen von 0,5 ml eingeeengt, so daß die Druckfiltration einen wichtigen Reinigungsschritt für den Cytochrom c Reduktase-Komplex darstellt. (Eine weitere Aufkonzentrierung kann mit Centricon-Röhrchen [Amicon, USA] erreicht werden.)

2.4.4. Gelfiltration

Über Druckfiltration eingeeengte affinitätsgereinigte Cytochrom c Reduktase wird über eine AcA 34 (Serva, Heidelberg) Gelfiltrationssäule (1 cm x 50 cm) weiter aufgereinigt. Bei diesem Säulenmaterial eluieren größere Proteine zuerst, wohingegen kleinere Proteine in die kugelförmigen Säulenpartikel aus 3 % Acrylamid und 4 % Agarose hineindiffundieren und länger festgehalten werden. AcA 34 hat einen linearen Trennungsbereich zwischen 20 und 350 kd und ein Ausschlußvolumen von 1200 kd. Die Cytochrom c Reduktase wird mit 40 mM Tris-Ac (pH 7,0)/0,04 % Triton X-100 /0,2 mM PMSF und einer Flußrate von 3 ml/Stunde eluiert. Der Enzymkomplex eluiert vor Proteinen des linearen Bereichs, jedoch klar getrennt von agglomeriertem Material der Lauffront. Die Reinheit der Fraktionen wird spektrophotometrisch und mit SDS-PAGE analysiert (siehe 2.2.1. und 2.5.1.). Fraktionen, die Cyto-

chrom b und c₁ enthalten, werden vereint, eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.5. Saccharose-Gradientenzentrifugation

Alternativ zur Gelfiltrationschromatographie kann die Cytochrom c Reduktase über Saccharose-Gradientenzentrifugation weiter aufgereinigt werden. Dabei werden 0,5 ml angereinigter Enzymkomplex auf einen linearen Saccharosegradienten von 5-20 % in 40 mM Tris-Ac (pH 7,0)/0,05 % Triton X-100 /0,2 mM PMSF gegeben und für 8 Stunden bei 250000 xg zentrifugiert. Es werden Fraktionen à 0,5 ml abgenommen und spektrophotometrisch sowie mit SDS-PAGE analysiert.

Saccharose-Gradientenzentrifugation kann auch verwendet werden, um den isolierten Proteinkomplex von Triton X-100 in ein anderes Detergens zu überführen. Dazu wird dem Gradienten das gewünschte Detergens, z.B. 1 % N-octyl Glucopyranosid (Sigma, USA), anstelle von Triton X-100 zugefügt. Bei Eintritt der Cytochrom c Reduktase in den Gradienten verbleiben die Triton X-100-Mizellen an der Oberfläche.

2.5. Analyse der isolierten Cytochrom c Reduktase

2.5.1. Spektrophotometrische Vermessung der Cytochrome

Triton X-100-solubilisiertes Gesamtprotein aus Mitochondrien, Triton X-100-solubilisiertes Gesamtprotein aus mitochondrialen Membranen sowie Fraktionen angereinigter bzw. gereinigter Cytochrom c Reduktase werden bei Raumtemperatur spektrophotometrisch von 500 bis 650 nm vermessen. In diesem Wellenlängenbereich lassen sich Cytochrome der Klassen a, b und c über die verschiedene Position ihrer α -Banden unterscheiden. Von trüben Lösungen werden "Dithionit-reduziert-minus-Luft-oxidiert"-Spektren aufgenommen und der Cytochrom b-Gehalt mit $k_{560-575} = 20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet, von gereinigten Fraktionen "Dithionit-reduziert"-Spektren und Cytochrom b über $k_{560-575} = 27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ quantifiziert (nach Weiss und Ziganke 1974, Weiss und Kolb 1979). 5-10 aufgenommene Kurven werden gemittelt und über die zweite Ableitung die Maxima einzelner Banden bestimmt (Butler und Hopkins 1970a, 1970b).

2.5.2. Aktivitätsmessungen

Rekonstitution der Cytochrom c Reduktase in Phospholipid-Vesikel
(nach Zweck et al. 1989)

Zur Durchführung von Aktivitätsmessungen wird die Cytochrom c Reduktase in Phospholipid-Membranen rekonstituiert. Unter Verwendung von Ultraschall wird eine Lösung aus 17 % L- α -Phosphatidylcholin (Typ II-S, Sigma, USA) in 21 mM MOPS (pH 6,8)/42 mM K₂SO₄/145 mM Li-Cholat hergestellt. Gleiche Volumina dieser Lösung sowie gereinigter Cytochrom c Reduktase (ca. 2 μ M) werden vereinigt und im Verhältnis 1:100 mit Testpuffer (50 mM MOPS [pH 6,8]/100 mM K₂SO₄) verdünnt. Dabei diffundieren Triton X-100 und Cholat in die wässrige Phase. Es bilden sich spontan enzymhaltige Phospholipid-Membranen und zu einem gewissen Anteil auch enzymhaltige Vesikel.

Messung der Oxidoreduktase-Aktivität (nach Linke und Weiss 1986)

Die initiale Reaktionsrate der rekonstituierten Ubiquinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase wird in Testpuffer unter Zugabe von 40 μ M KCN, 40 μ M Cytochrom c³⁺ (Typ III, Pferdeherz, Sigma, USA), 2 μ M Valinomycin (Fluka, Schweiz) sowie 100 μ M Decylchinol (synthetisiert nach Wan & Folkers 1978) bestimmt. Es wird die zeitliche Änderung der Cytochrom c-Konzentration bei 550 minus 580 nm mit einem Zweiwellenlängen-Spektralphotometer bei 25°C gemessen und mit einem molaren Extinktionskoeffizienten von $k = 20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet. Inhibitoren wie Antimycin (Boehringer, Mannheim) oder Myxothiazol (Boehringer, Mannheim) werden in einer Endkonzentration von 2 μ M zugegeben.

Messung der Transhydrogenase-Aktivität (nach Zweck et al. 1989)

Die initiale Reaktionsrate der Transhydrogenase-Aktivität der rekonstituierten Cytochrom c Reduktase wird in Testpuffer unter Zugabe von 2 μ M Myxothiazol, 100 μ M Durochinol (Sigma, USA) und 5 μ M Decylchinon bestimmt. Die Reduktion von Decylchinon wird spektrophotometrisch bei 285 minus 320 nm (25 °C) verfolgt und die Konzentrationsänderung über $k = 9,1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Zweck et al. 1989) berechnet. (Dieses Wellenlängenpaar ist isobestisch für das Redoxpaar Durochinol/Durochinon [Boveris et al. 1971], so daß eine Änderung der Extinktionsdifferenz ausschließlich durch die Reduk-

tion des Decylchinon erfolgt). Die nichtenzymatische Reaktionsrate wird in Gegenwart von 2 μM Antimycin (Boehringer, Mannheim) bestimmt und von der enzymatischen Reaktionsrate subtrahiert.

Messung der Protease-Aktivität

Die proteolytische Aktivität der isolierten Cytochrom c Reduktase wurde von M. Emmermann vermessen; die Methode ist in Braun et al. 1992b beschrieben.

2.5.3. Spaltung des isolierten Enzymkomplexes

Cytochrom c Reduktase wird über Druckfiltration bis zu einer Proteinkonzentration von 15 mg/ml eingengt und 100 μl -Aliquots werden für jede Spaltungsreaktion verwendet. Spaltungen werden durch Zugabe verschiedener Mengen Detergens, EDTA und Salz induziert: eine 10 %ige Triton X-100 - Lösung wird bis zu einer Endkonzentration von 0,5, 1, 1,5 bzw. 2,0 % zugegeben; eine 0,5 %ige EDTA-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 3 mM, 5 mM oder 50 mM; 5 M Stammlösungen von NaCl, NaBr, NaI, Guanidiniumhydrochlorid und Urea bis zu Endkonzentrationen von 0,5, 0,8, 1,0 bzw. 2,0 M. Die Ansätze werden für 10 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend über eine kleine AcA 34 (Pharmacia, Schweden) Gelfiltrationssäule (0,7 cm x 30 cm) bei einer Flußrate von 1,2 ml/Stunde in 50 mM Tris-Ac (pH 7,0)/0,05 % Triton X-100 /0,2 mM PMSF aufgetrennt. Das Eluat wird in 200 μl -Aliquots fraktioniert und über SDS-PAGE analysiert (2.2.1.).

2.6. Grundtechniken der Analyse von DNA

Alle hier aufgeführten Grundtechniken werden - sofern nicht anders vermerkt - nach Protokollen von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Zur Untersuchung kernkodierter mitochondrialer Proteine der Kartoffel wird Gesamt-DNA, Gesamt-RNA bzw. poly A⁺-RNA aus Kartoffelgewebe isoliert. Über Restriktionsendonukleasen zerstückelte DNA oder revers transkribierte RNA wird in geeignete Vektorsysteme eingebaut und läßt sich fortan als "Genbank" in vereinfachter Form analysieren. Die verwendete Genbank für Kartoffel (Varietät Désirée) wurde von Dr. Udo Schmitz hergestellt. Es handelt sich um eine knollenspezifische cDNA-Bank im Phagen λ -gt11.

2.6.1. Screening einer cDNA-Bank der Kartoffel

(nach Huynh et al. 1985)

Die Genbank wird in geeigneter Verdünnung ausplattiert und die Phagen-DNA bzw. das Phagenprotein auf Nitrozellulose-Membranen (Schleicher und Schuell, Dassel) transferiert. Als Sonden dienen DNA-Fragmente oder Antikörper. Die DNA positiv reagierender Plaques wird für Sequenzanalysen in *Escherichia coli* Plasmide (pBluescript, Stratagene, USA) übertragen. Es werden *Escherichia coli* K12 DH5 α , *Escherichia coli* K12 Y1089 und *Escherichia coli* K12 Y1090 verwendet.

2.6.2. Klonierung von DNA in *Escherichia coli*

Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wird nach der Methode von Birnboim und Doly (1979) oder über Anionenaustausch-Chromatographie (Qiagen-Säulen) nach Vorschrift des Herstellers (Diagen, Düsseldorf) isoliert. Schneiden von Plasmid-DNA mit Endonukleasen, Analysen von Plasmid-DNA in Agarosegelen, Ligationen von DNA-Fragmenten, Transformationen von *Escherichia coli*-Zellen und weitere Grundtechniken des "Klonierens" erfolgen nach Sambrook et al. (1989).

2.6.3. Sequenzierung von DNA

Das Sequenzieren von Plasmid-DNA erfolgt nach dem Didesoxy-Kettenabbruchverfahren (Sanger et al. 1977). Dabei wird der T7-Sequenzierkit (Pharmacia, Schweden) nach Herstellerangaben verwendet. Subklonierungen werden über Exonuklease III-Verdauungen (nach Dale et al. 1985) mit dem "Double-Stranded Nested Deletion Kit" (Pharmacia, Schweden) durchgeführt.

2.6.4. Computeranalysen

Sequenzvergleiche und andere Analysen von Sequenzdaten werden auf einer VAX/VMS 8600 mit den PCGene- (IntelliGenetics, USA) und GCG- (Devereux et al. 1984) Software-Paketen durchgeführt. Die Suche nach homologen DNA-Sequenzen erfolgt in den GenBank- und EMBL-Datenbanken und die Suche nach verwandten Proteinensequenzen in den SWISS-Prot.- und NBRF-Prot.-

Datenbanken. Für Alignments werden die Programme FASTA (Pearson und Lipman 1988) und GAP (Needleman and Wunsch 1970) verwendet.

3. ERGEBNISSE

3.1. Immunologische Charakterisierung der Cytochrom c Reduktase und der Prozessierungsprotease aus Kartoffel

Zu Beginn der Untersuchungen für diese Dissertation lagen weder Erkenntnisse über mögliche Komponenten einer pflanzlichen Prozessierungsprotease vor, noch war jemals ein aktiver bc₁-Komplex aus Pflanzen isoliert worden. Um der Frage einer möglichen Beteiligung der Cytochrom c Reduktase höherer Pflanzen an der Prozessierung importierter Vorläufer-Proteine nachzugehen, erfolgte daher zunächst eine Charakterisierung von Bestandteilen der gesuchten Enzyme mit Hilfe von heterologen Antikörpern. Als Modellorganismus wurde die Kartoffel (*Solanum tuberosum*) gewählt, da ihre Knollen ganzjährig verfügbar sind, das etiolierte Gewebe leicht zugänglich ist und präparationsbedingte Verunreinigungen durch Chloroplasten entfallen.

3.1.1. Identifizierung und submitochondriale Lokalisierung von PEP, MPP und der Core-Proteine

Gesamtprotein isolierter Mitochondrien aus Kartoffelknolle wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit Antiseren analysiert. Antikörper, die gegen das "Processing Enhancing Protein" (PEP) aus *Neurospora* oder Hefe gerichtet sind, erkennen zwei mitochondriale Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von 53 bzw. 55 kd, zeigen dagegen keine Kreuzreaktion mit cytosolischen Proteinen (Abb. 4). Unter denselben Bedingungen führen Antikörper, die gegen die "Matrix Processing Protease" (MPP) aus *Neurospora* bzw. Hefe gerichtet sind, zu keinem positiven Signal (Ergebnis nicht gezeigt).

Um die innermitochondriale Lokalisierung von PEP und MPP festzustellen, wurden isolierte Mitochondrien aus Kartoffel über Ultraschall und einen nachfolgenden Ultrazentrifugationsschritt in eine Membran- und eine Matrixfraktion unterteilt. Die Qualität der Subfraktionierung wurde mit Immunoblotting über Markerenzyme kontrolliert: Antikörper, die gegen den Adenosin-Nukleotid-Translokator (ANT) aus *Neurospora* gerichtet sind, reagieren mit einem 30 kd-Membranprotein, Antikörper gegen die Mangan-abhängige Superoxiddismutase (SOD) aus Tabak mit einem 25 kd-Protein der Matrixfraktion (Abb. 5).

Abb. 4: Immunoblot von mitochondrialem Protein (Spur 1) bzw. Gesamtprotein (Spuren 2-5) der Kartoffelknolle nach Inkubation mit einem Antiserum, das gegen PEP aus *Neurospora* gerichtet ist. Die Proteine wurden über Elektrophorese in einem 7 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblotet. Die Zahlen oben geben die Menge des aufgetragenen Proteins an (in μg), die Zahlen links die molekularen Größen eines Proteinstandards (in kd). Da mitochondriales Protein nur einen sehr kleinen Teil des Gesamtproteins der Kartoffelknolle ausmacht, ist die Kreuzreaktion ausschließlich in der Fraktion sichtbar, die aufgereinigtes mitochondriales Protein enthält. Es treten keine unspezifischen Kreuzreaktionen mit nicht-mitochondrialen Proteinen auf.

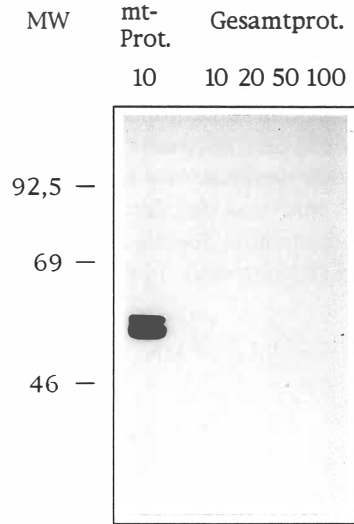
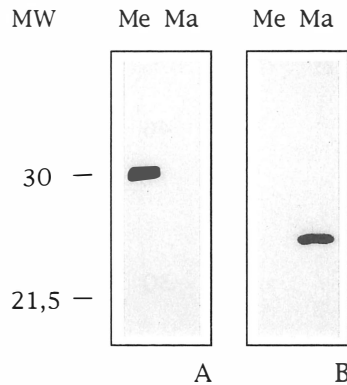


Abb. 5: Immunoblot subfraktionierter mitochondrialer Proteine aus Kartoffel nach Inkubation mit Antikörpern gegen ANT aus *Neurospora* (A) und SOD aus Tabak (B). Me: Proteine der Membran-Fraktion; Ma: Proteine der Matrix. Es wurden ca. 50 μg Protein pro Spur geladen. Die Zahlen auf der linken Seite geben die molekularen Größen eines Proteinstandards an.



Die mitochondrialen Subfraktionen wurden mit Antiseren gegen PEP aus Hefe und *Neurospora* analysiert. Dabei sind die 53 und 55 kd-Proteine der Kartoffel klar als Membrankomponenten identifizierbar (Abb. 6 und 7). In Kontrollexperimenten mit gereinigten und subfraktionierten Mitochondrien aus

Hefe und *Neurospora* reagieren die gleichen Seren erwartungsgemäß mit einem 48 kd-Protein der Hefe-Matrix bzw. mit einem 52 kd-Protein, das überwiegend in der mitochondrialen Membranfraktion von *Neurospora* lokalisiert ist (Abb. 7, Yang et al. 1988, Hawlitschek et al. 1988).

Die beiden immunopositiven Banden aus Kartoffel könnten zwei Isoformen des PEP und/oder des Core-Proteins I darstellen, andere Interpretationen sind jedoch denkbar. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, handelt es sich bei PEP, MPP und den Core-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase um eine Proteinfamilie, für die auch immunologische Kreuzreaktionen berichtet wurden (Schulte et al. 1989).

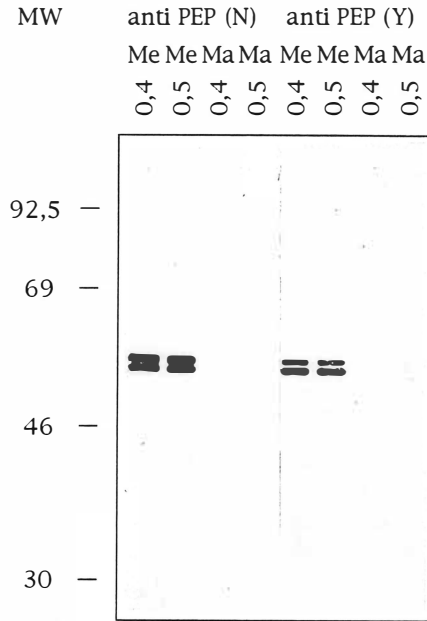
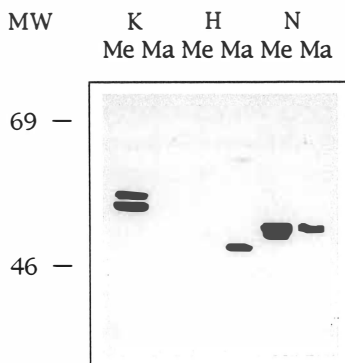


Abb. 6: Immunoblot von Proteinen der Membran-(Me) bzw. Matrixfraktion (Ma) der Mitochondrien aus Kartoffel nach Inkubation mit Antikörpern gegen PEP aus Hefe (Y) und *Neurospora* (N). Die Auftrennung der Proteingemische erfolgte über Elektrophorese in einem 7 %igen Acrylamidgel. Es wurden ca. 50 µg Protein pro Spur geladen. Die Zahlen oben geben die für die Subfraktionierung verwendete OPOE-Konzentration an, die Zahlen links die molekularen Größen eines Proteinstandards.

Abb. 7: Immunoblot von subfraktionierten mitochondrialen Proteinen aus Kartoffel (K), Hefe (H) und *Neurospora* (N) nach Inkubation mit einem Antiserum, das gegen PEP aus Hefe gerichtet ist. Die Gelelektrophorese erfolgte in einem 7 %igen Polyacrylamidgel. Pro Spur wurden etwa 50 µg Protein der Membran- (Me) bzw. Matrixfraktionen (Ma) geladen. Auf der linken Seite sind die molekularen Größen eines Protein-standards angegeben.



Gegen MPP aus Pilzen gerichtete Seren zeigen dagegen wiederum keine Kreuzreaktion mit den mitochondrialen Proteinen der Kartoffel (nicht gezeigt).

Auch die Identifizierung von Komponenten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel erfolgte mit Hilfe heterologer Antikörper. Seren, die gegen die respiratorischen Untereinheiten Cytochrom c_1 (31 kd), Cytochrom b (35 kd) und gegen das Eisen-Schwefel-Protein (25 kd) aus Pilzen gerichtet sind, erkennen Proteine ähnlicher Größe in der mitochondrialen Membranfraktion aus Kartoffel (nicht gezeigt). Erwartungsgemäß ergibt ein Antiserum gegen das Core-Protein I aus *Neurospora* (das identisch mit PEP aus *Neurospora* ist, siehe Einleitung) mit den 53 und 55 kd-Proteinen der Kartoffel ein positives Signal.

3.1.2. Copräzipitation der Cytochrom c Reduktase und der Prozessierungsprotease

Kommt auch in Kartoffel ein bifunktionales PEP/Core I-Protein vor? Zur Beantwortung dieser Frage wurde versucht, die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel mit heterologen Antikörpern gerichtet gegen Cytochrom c_1 aus *Neurospora* zu fällen. Im Präzipitat sind über Immunoblotting neben Cytochrom c_1 auch die 53 und 55 kd-Proteine spezifisch nachweisbar (nicht gezeigt), was jedoch nicht zweifelsfrei auf das Vorhandensein einer bifunktionalen PEP/Core I-Untereinheit zurückgeführt werden kann, vielmehr auch dadurch erklärbar ist, daß die Antikörper gegen PEP aus Pilzen mit dem

verwandten Core-Protein I der Kartoffel kreuzreagieren. Auf Polyacrylamidgelen wies die Fraktion der immunpräzipitierten Cytochrom c Reduktase außerdem noch eine Vielzahl von Banden auf, so daß lediglich von einer Anreicherung des Enzymkomplexes ausgegangen werden konnte (nicht gezeigt). Es wurde daher versucht, ein biochemisches Reinigungsprotokoll für die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel zu etablieren.

3.2. Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel

Die Präparation der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel erfolgte auf der Basis der spezifischen Bindung des Proteinkomplexes an Cytochrom c. Die Cytochrom c-Affinitätschromatographie wurde von Weiss und Juchs (1978) entwickelt und führt in Kombination mit Gelfiltrationschromatographie zur Isolierung eines hochgradig reinen und monodispersen bc_1 -Komplexes aus den Mitochondrien von *Neurospora* (Weiss und Kolb 1979). Im folgenden ist die Anwendung dieser Methode für die Aufreinigung der Cytochrom c Reduktase aus den Mitochondrien der Kartoffel beschrieben.

3.2.1. Affinitätschromatographie

Voraussetzung für die Isolierung der Cytochrom c Reduktase aus den Mitochondrien der Kartoffel über Affinitätschromatographie ist eine weitgehende Eliminierung des internen Cytochrom c (Cytochrom c der Kartoffel würde mit dem externen Cytochrom c der Säule um die Bindung des respiratorischen Proteinkomplexes konkurrieren). Der Cytochrom c- (Häm c-) Gehalt von Proteingemischen kann spektrophotometrisch bestimmt werden; mit Hilfe von "Dithionit-reduziert-minus-Luft-oxidiert"-Spektren ist es möglich, die Signale von Cytochromen aus trüben Lösungen spezifisch "herauszufiltern" (siehe Material und Methoden, 2.5.1.).

Cytochrome der Gesamtproteinfraktion aus Mitochondrien weisen ein Haupt- α -Maximum bei 550 nm auf (Abb. 8, Teil A). Es besteht aus den überlagerten α -Signalen der Cytochrome b und c_1 (Komponenten der Cytochrom c Reduktase, 552 und \approx 560 nm) und einem dominanten Signal für Cytochrom c (550 nm). In der Fraktion der mitochondrialen Membranproteine, die als Ausgangsmaterial für die Präparation der Cytochrom c Reduktase dient, ist die resultierende α -Bande auf \approx 560 nm verlagert (Abb. 8, Teil B), Cytochrom c also erfolgreich entfernt.

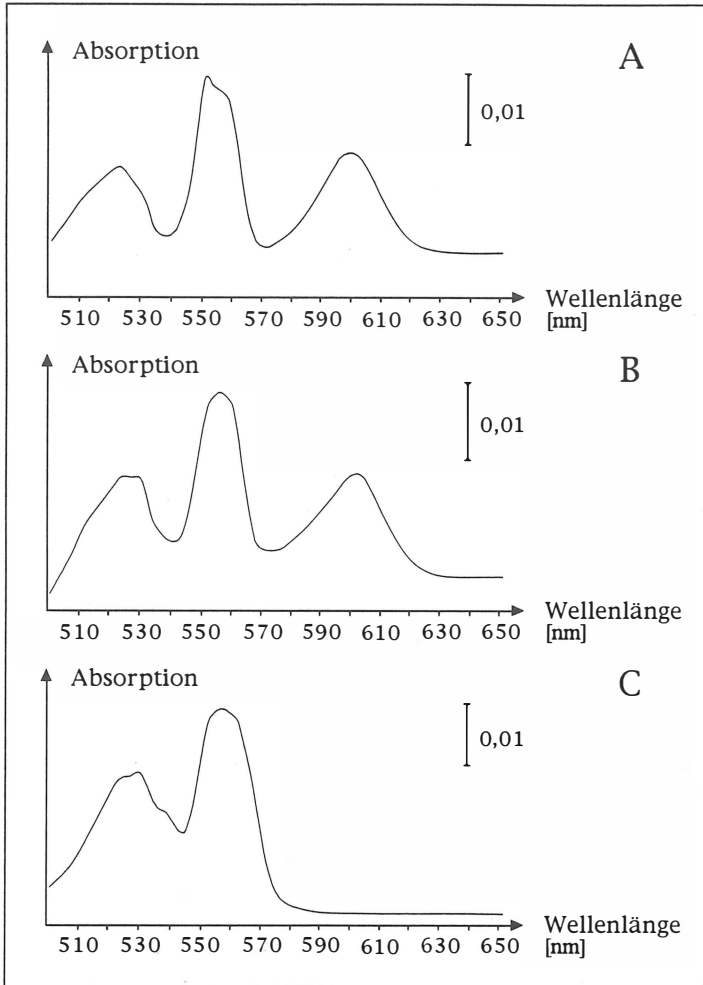


Abb. 8: "Dithionit-reduziert-minus-Luft-oxidiert"-Spektren der Cytochrome während der Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus den Mitochondrien der Kartoffel. A: mitochondriales Gesamtprotein, B: mitochondriales Membranprotein, C: gereinigte Cytochrom c Reduktase. Alle Spektren wurden bei Zimmertemperatur und in Gegenwart von Triton X-100 aufgenommen.

Die Anwendung unterschiedlicher Solubilisierungsbedingungen ergab, daß die optimale Triton X-100-Konzentration für das Herauslösen der Cytochrom c Reduktase aus den mitochondrialen Membranen der Kartoffel bei 3,3 % (*Neurospora*: 5 %) liegt. Die solubilisierten Membranproteine (ca. 150 mg) wurden auf eine kleine Cytochrom c-Sepharose-Säule aufgetragen (siehe Material und Methoden, 2.4.2.) und gebundene Proteine über einen Salzgradienten aus 20 bis 200 mM Tris-Acetat eluiert. Zugabe von 2 mM Vitamin C zum Gradienten führt über eine Reduktion des Cytochrom c zu einer Verminderung der Bindung der Cytochrom c Reduktase an die Säule. Dadurch ist eine schonende Elution des Proteinkomplexes bei einer niedrigen Salzkonzentration möglich.

Die Fraktionen der Affinitätssäule wurden gelelektrophoretisch analysiert und Häm b spektrophotometrisch vermessen. Cytochrom b bindet spezifisch an die Säule und eluiert als scharfer Peak bei einer Tris-Acetat-Konzentration von 100 mM (Abb. 9, Fraktionen 14-17). Synchron zum spektroskopisch meßbaren Häm b-Peak eluieren 10 Proteine, die den Untereinheiten der angereinigten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel entsprechen (siehe 3.3.). Ein Teil des Cytochrom b bindet nicht an die Säule und eluiert zusammen mit dem "Flow-through" (Abb. 9, Fraktionen 1-6). Vermutlich führt die Triton X-100-Solubilisierung der mitochondrialen Membranproteine partiell zu einer Denaturierung der dreidimensionalen Struktur der Cytochrom c Reduktase. Dadurch könnte eine Affinitätsbindung des Proteinkomplexes verhindert werden. Die Relation gebundenes/ungebundenes Cytochrom b liegt reproduzierbar bei etwa 2:1.

Ein Großteil der mitochondrialen Membranproteine hat keinerlei Affinität zur Cytochrom c-Säule (Abb. 9, Fraktionen 1-6). Einige Proteine binden, eluieren jedoch bereits bei sehr geringen Salzkonzentrationen (Abb. 9, Fraktionen 7-13). Dabei handelt es sich um Proteine, die entweder aus "zufälligen" Gründen festgehalten werden (Cytochrom c weist einen positiven Ladungsüberschuß auf und fungiert daher als schwacher Anionenaustauscher) oder aber Cytochrom c aus biologischen Gründen erkennen (wie z.B. Proteine der Cytochrom c-Assemblierung). Darüber hinaus können Proteine binden, die mit der Cytochrom c Reduktase assoziiert vorkommen, sich jedoch leichter wieder von ihr ablösen als der Proteinkomplex selbst von der Cytochrom c-Säule. Tatsächlich konnte ein Protein, das sich bei etwa 70 mM Tris-Acetat von der Affinitätssäule ablöst, immunologisch als HSP 60 identifiziert werden (nicht gezeigt, siehe Diskussion). Auch die Cytochrom c Oxidase hat potentiell eine Bindungsaffinität zur Cytochrom c-Säule. Das Signal der α -Banden der Cytochrome a und a₃ (Maximum bei 600 nm, siehe Abb. 8) war jedoch

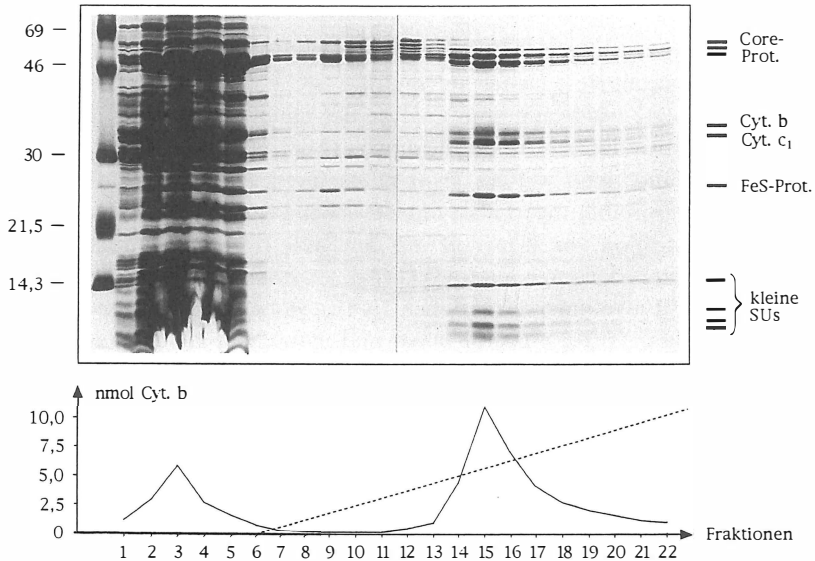


Abb. 9: Gelelektrophoretische und spektrophotometrische Analyse der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel nach Cytochrom c-Affinitätschromatographie. Oberer Teil: Auftrennung der Proteine aus den Fraktionen 1-22 über SDS-PAGE. Es wurde ein 13 %iges Gel verwendet und die Anfärbung der Banden erfolgte mit Coomassie. Die Zahlen auf der linken Seite des Gels geben die molekularen Größen eines Proteinstandards an, die Bezeichnungen rechts die Identität der Untereinheiten des Proteinkomplexes (siehe 3.3.). Die Schlieren im unteren Bereich der Fraktionen 2-6 sind auf Interaktionen zwischen Triton X-100 und SDS zurückzuführen. Unterer Teil: Spektrophotometrische Quantifizierung von Häm b in den Fraktionen 1-22. Als Extinktionskoeffizient wurde $27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ verwendet (siehe Material und Methoden, 2.5.1.). Die gestrichelte Linie stellt den Tris-Acetat-Gradienten dar.

lediglich im "Flow-through" nachweisbar (nicht gezeigt).

Die Häm b-Peak-Fractionen der Affinitätsäule (Abb. 9 Fraktionen 14-17) wurden gepoolt und über Druckfiltration aufkonzentriert. Mit Hilfe der verwendeten Filter, die ein Ausschlußvolumen von 300 kd aufweisen, können selektiv große Proteinkomplexe angereichert werden, wohingegen monomere Proteine, Detergensenizellen oder Salze ihre Konzentration beibehalten (siehe Material und Methoden, 2.4.3.). Damit stellt die Druckfiltration einen weiteren Reinigungsschritt für die Cytochrom c Reduktase dar.

3.2.2. Gelfiltrationschromatographie und Größenbestimmung

Das Konzentrat der angereinigten Cytochrom c Reduktase wurde über eine ACA34 Gelfiltrationssäule weiter aufgereinigt (siehe Material und Methoden, 2.4.4.). Es erfolgte wiederum eine Analyse der eluierten Proteine über SDS-PAGE und spektrophotometrische Messungen (Abb. 10).

Cytochrom b und neun weitere Proteine eluieren zeitgleich und frei von sichtbaren Verunreinigungen als symmetrischer Peak mit einer maximalen Proteinkonzentration von 2 mg/ml von der Säule (Abb. 10, Fraktionen 21-28). Agglomerate, darunter auch verklumpte Cytochrom c Reduktase, eluieren im Ausschlußvolumen (Fraktionen 13-18), wohingegen Bruchstücke des Enzymkomplexes, Triton X-100-Mizellen und monomere Proteine später aus der Säule treten (Fraktionen 30-50, nicht gezeigt).

Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel besteht aus 10 Untereinheiten. Auf 14 %igen Acrylamidgelen weisen sie apparente Molekulargewichte von 55, 53, 51, 35, 33, 25, 14, 12, 11 und 10 kd auf (Abb. 12). Darüber hinaus sind auf Gelen noch drei substöchiometrische Polypeptidbanden sichtbar (50, 42 und 8 kd).

Über Gelfiltrationschromatographie läßt sich die apparente molekulare Größe von Proteinen bzw. Proteinkomplexen bestimmen. Dazu werden Proteine bekannter Größe über die Säule geschickt und ihre Elutionszeiten gemessen. Für eine Größenbestimmung der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel wurde die Säule mit Thyroglobulin (669 kd), Ferritin (440 kd) und Katalase (232 kd) geeicht.

Die molekulare Größe des monodispersen Proteinkomplexes aus Kartoffel liegt bei etwa 650 kd (Abb. 11). Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora*, aufgereinigt über das gleiche Isolationsverfahren, hat lediglich ein Molekulargewicht von 550 kd. Da jedoch einige verbliebene Phospholipide und Triton X-100-Moleküle zum Gewicht des Proteinkomplexes beitragen, wurde als Molekulargewicht für die Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora* 450 kd ermittelt (Weiss und Kolb 1979, Weiss 1987). Unter Berücksichtigung dieses Korrekturfaktors ergibt sich für die apparente molekulare Größe des Enzymkomplexes aus Kartoffel ein Wert, der um den Faktor 2 über dem Molekulargewicht der Summe seiner 10 Untereinheiten liegt. Isostöchiometrisches Vorkommen der Komponenten vorausgesetzt, liegt die Cytochrom c Reduktase der Kartoffel - ebenso wie der Proteinkomplex bei Säugern und Pilzen - als Dimer vor.

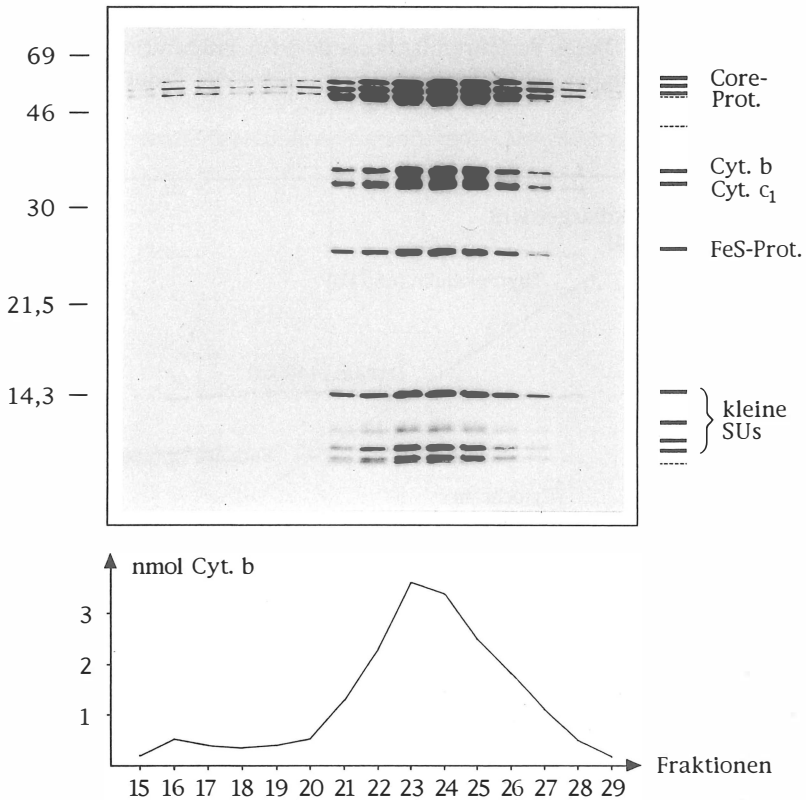


Abb. 10: Analyse der gereinigten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel nach der Gelfiltrationschromatographie. Oberer Teil: Auftrennung der Proteine aus Fraktionen 15-29 über SDS-PAGE (13 % Polyacrylamid). Die Zahlen auf der linken Seite des Gels geben die molekularen Größen eines Proteinstandards an. Rechts stehen Bezeichnungen für die 10 Untereinheiten des Proteinkomplexes (siehe 3.3.2.). Die gestrichelten Linien markieren drei substöchiometrische Banden (siehe 3.3.2.). Unterer Teil: Graphische Darstellung des Häm b-Gehalts der Fraktionen 15-29.

Alternativ zur Gelfiltrationschromatographie wurde die affinitätsgereinigte und über Druckfiltration aufkonzentrierte Cytochrom c Reduktase auch mit Saccharose-Gradientenzentrifugation weiter aufgereinigt (siehe Material und Methoden, 2.4.5.). Dieses Verfahren ist besonders für Präparationen im kleineren Maßstab geeignet, da geringere Verdünnungen des Proteinkomplexes auftreten.

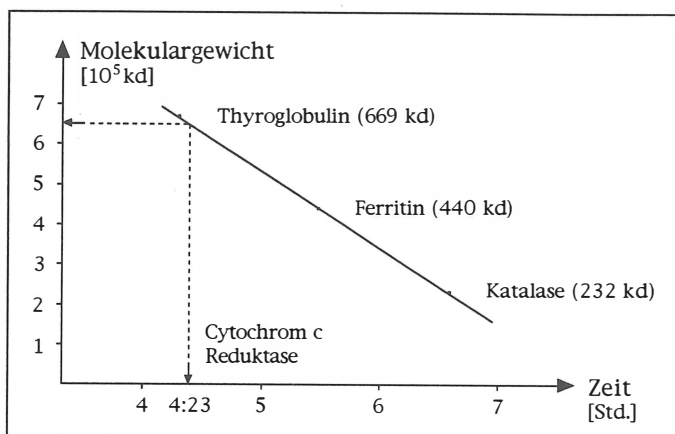


Abb. 11: Bestimmung der molekularen Größe der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel. Der isolierte Proteinkomplex eluiert von einer AcA 34 Gelfiltrations-säule kurz nach Thyroglobulin.

3.2.3. Spektrophotometrische Vermessung der Cytochrome

Reduktionsspektren mitochondrialer bc₁-Komplexe weisen typische Absorptionsmaxima auf (Weiss und Juchs 1978, Siedow et al. 1978). Das Spektrum der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel wurde zwischen 500 und 650 nm vermessen und zeigte den charakteristischen Verlauf (Abb. 8, Teil C). Die α -Bande des isolierten Proteinkomplexes, die sich aus den überlagerten α -Banden der Cytochrome b und c₁ zusammensetzt, hat eine breite und symmetrische Form mit einem Maximum bei 557 nm. Absorptionsmaxima der α -Banden einzelner Cytochrome wurden, wie unter Material und Methoden (2.5.1.) angegeben, über die zweite Ableitung von gemittelten Mehrfachspektren bestimmt. Das α -Signal für Cytochrom c₁, das aufgrund der kova-

lent gebundenen Häm-Gruppe bei Zimmertemperatur stabil ist, weist ein Maximum bei 552 nm auf. Für Cytochrom b mit seinen beiden Häm-Gruppen ("high-" und "low-potential" Häm, b_H und b_L, siehe Abb. 1) wurden 562 bzw. 557 nm berechnet (ein weiteres Signal bei 565 nm geht ebenfalls auf b_L zurück). Messungen der β-Banden ergeben zwei Maxima bei 525 nm (Cytochrom c₁) und 530 nm (Cytochrom b) und eine Schulter bei 537 nm. Reduktionsspektren von Fraktionen der gereinigten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel weisen keinerlei Absorption bei 600 nm auf, d.h. es liegt keine spektroskopisch meßbare Verunreinigung durch Cytochrom a der Cytochrom c Oxidase vor (siehe Abb. 8, Teil C).

3.2.4. Oxidoreduktase- und Transhydrogenase-Aktivitäten des Proteinkomplexes

Um die Integrität der gereinigten Cytochrom c Reduktase zu überprüfen, wurde der Enzymkomplex in Phospholipid-Vesikel rekonstituiert und die Ubiquinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase-Aktivität bestimmt (siehe Material und Methoden, 2.5.2.). Das Cytochrom c Reduktase-Dimer aus Kartoffel katalysiert 50 Umsätze pro Sekunde und weist damit eine etwas geringere Aktivität als der Enzymkomplex aus *Neurospora* auf (Linke und Weiss 1986). Myxothiazol oder Antimycin fungieren als effektive Inhibitoren der gemessenen enzymatischen Reaktion.

Es wurde auch die Quinol/Quinone-Transhydrogenase-Aktivität des isolierten Proteinkomplexes vermessen, die einen wichtigen Reaktionsschritt im "Q-Zyklus" darstellt (siehe Abb. 1). Zur Analyse dieser Reaktion wurde für *Neurospora* ein artifizielles Reaktionssystem etabliert, das in Zweck et al. (1989) beschrieben ist (siehe auch Material und Methoden, 2.5.2.). Isolierte und in Phospholipid-Vesikel rekonstituierte Dimere der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel katalysieren 16 Umsätze pro Sekunde. Die enzymatische Reaktion wird durch Zugabe von Antimycin effektiv gehemmt, ist dagegen insensitive gegenüber Myxothiazol.

3.2.5. Zusammenfassung des Reinigungsprotokolls

Die Cytochrom c Reduktase wurde 15 mal unabhängig voneinander aus Kartoffelknolle isoliert. Tabelle 4 faßt die spezifische Aufreinigung und die Ausbeute einer durchschnittlichen Enzympräparation (ausgehend von ca. 300

mg mitochondrialem Protein) zusammen. Die Quantifizierung der Cytochrom c Reduktase erfolgte dabei über spektrophotometrische Vermessung von Häm b, die Bestimmung des Gesamtproteins über den Bradford-Protein-Assay (siehe Material und Methoden, 2.5.1.).

Der Proteinkomplex wird bezogen auf mitochondriales Protein 38 fach aufgereinigt. Da mitochondriales Protein jedoch nur einen sehr geringen Anteil am Gesamtprotein der Kartoffelknolle darstellt (siehe Abb. 4), ist der Aufreinigungsfaktor erheblich größer. Die Ausbeute der Präparationen beträgt durchschnittlich 24 %, das sind 60 nmol Cytochrom b / g mitochondriales Protein.

Cytochrom c Reduktase-Präparationen, die mit deutlich kleineren Mengen Ausgangsmaterial durchgeführt werden, führen trotz proportionaler Verringerung der Säulenvolumina zu verschlechterten Ergebnissen. Der Enzymkomplex ist stärker verunreinigt und die 25 kd-Untereinheit neigt zur Dissoziation. Die Aufreinigung der Cytochrom c Reduktase aus größeren Ausgangsmengen führt dagegen zu besonders guten Resultaten. Enzympräparationen aus 1-2 g mitochondrialem Protein sind bereits nach der Affinitätschromatographie, d.h. in einem Ein-Säulen-Verfahren, hochgradig sauber. Somit erweisen sich die 300 mg Ausgangsmaterial der "Standardpräparation" als eine Untergrenze. Abb. 12 faßt das in diesem Kapitel vorgestellte Reinigungsprotokoll zusammen.

Präparation	Volumen [ml]	Protein [mg]	Cyt b [nmol]	Cyt b/Prot. [nmol/mg]	Ausbeute [%]
Mitochondrien	16	300	67	0,2	100
Mitochondriale Membranen	4	*	*	*	*
Triton X100-solubilierte Membranen	7	110	58	0,5	89
Proteinkomplex nach Affinitätschromatographie	10	5,1	30	5,9	45
Proteinkomplex nach Ultrafiltration	0,5	*	*	*	*
Proteinkomplex nach Gelfiltration	4	2,1	16	7,6	24

Tabelle 4: Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel. Der Cytochrom b-Gehalt wurde spektrophotometrisch gemessen und mit $k = 27 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ berechnet (siehe Material und Methoden, 2.5.1.). * = nicht bestimmt.

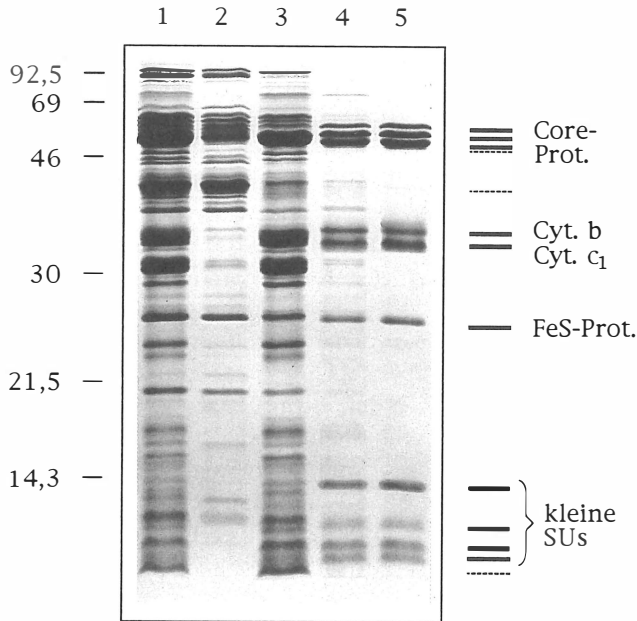


Abb. 12: Dokumentation der Reinigungsschritte für die Isolation der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel mit SDS-PAGE. Es wurde ein 14 %iges Gel verwendet und die Anfärbung der Banden erfolgte mit Coomassie. Spur 1: mitochondriales Gesamtprotein (100 μg), Spur 2: Proteine der Matrix (100 μg), Spur 3: mitochondriale Membranproteine (100 μg), Spur 4: affinitätsgereinigte Cytochrom c Reduktase (15 μg), Spur 5: Cytochrom c Reduktase nach Gelfiltrationschromatographie (15 μg). Die Zahlen links entsprechen den molekularen Größen eines Proteinstandards, die Bezeichnungen rechts geben die Identität der Untereinheiten an. Die gestrichelten Linien weisen auf drei substöchiometrischen Banden hin (siehe 3.3.2.).

3.3. Analyse der Komposition der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel

Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel setzt sich aus 10 Untereinheiten zusammen (siehe 3.2.2.). Auch bei Pilzen und Säugern besteht der Proteinkomplex aus 10-11 Komponenten, und zwar 2 großen Core-Proteinen im 50 kd-Bereich, 3 respiratorischen Untereinheiten und 5-6 kleineren Proteinen

mit weitgehend unbekannter Funktion (siehe Einleitung). Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel weist eine vergleichbare Komposition auf, hat jedoch auffälligerweise mit den 55, 53 und 51 kd-Proteinen drei Untereinheiten im Größenbereich der Core-Proteine. In den folgenden Kapiteln (3.3.1.-3.3.4.) werden Untersuchungen zur Zusammensetzung des Enzymkomplexes und zur Identifizierung seiner Untereinheiten dargestellt.

3.3.1. Immunologische Identifizierung der respiratorischen Untereinheiten und der Core-Proteine

Gereinigte Cytochrom c Reduktase der Kartoffel wurde über SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose übertragen und mit Antikörpern, die gegen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Pilzen gerichtet sind, analysiert (Abb. 13). Seren gegen die Core-Proteine I oder II aus *Neurospora* erkennen beide die drei hochmolekularen Komponenten des Proteinkomplexes aus Kartoffel. Damit gehören die 55, 53 und 51 kd-Untereinheiten vermutlich zur PEP/MPP/Core-Proteinfamilie (Schulte et al. 1989) und sind möglicherweise Träger von Aktivitäten, mit denen die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel an der Prozessierung importierter Vorläufer-Proteine beteiligt ist.

Antikörper, die gegen die drei respiratorischen Untereinheiten aus Pilzen gerichtet sind, erkennen jeweils eine Untereinheit des Proteinkomplexes aus Kartoffel (siehe Abb. 13). Demnach repräsentiert die 35 kd-Bande Cytochrom b, die 33 kd-Bande Cytochrom c₁ und die 25 kd-Bande das Eisen-Schwefel-Protein. Antikörper gegen die vier kleinen Untereinheiten aus *Neurospora* zeigen keine Kreuzreaktion mit Komponenten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel (nicht gezeigt).

3.3.2. Analyse der Cytochrom c Reduktase mit verschiedenen Gelsystemen

Für die Analyse von Proteinen und Proteingemischen gibt es zahlreiche Gelsysteme, die - je nach Aufgabenstellung - ihre definierten Vor- und Nachteile aufweisen (Laemmli 1970, Schägger et al. 1986). Da die Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase hinsichtlich ihrer Aminosäurekomposition und ihrer molekularen Größe sehr unterschiedlich sind, wurden mehrere Gelsysteme für die Analyse des Proteinkomplexes herangezogen.

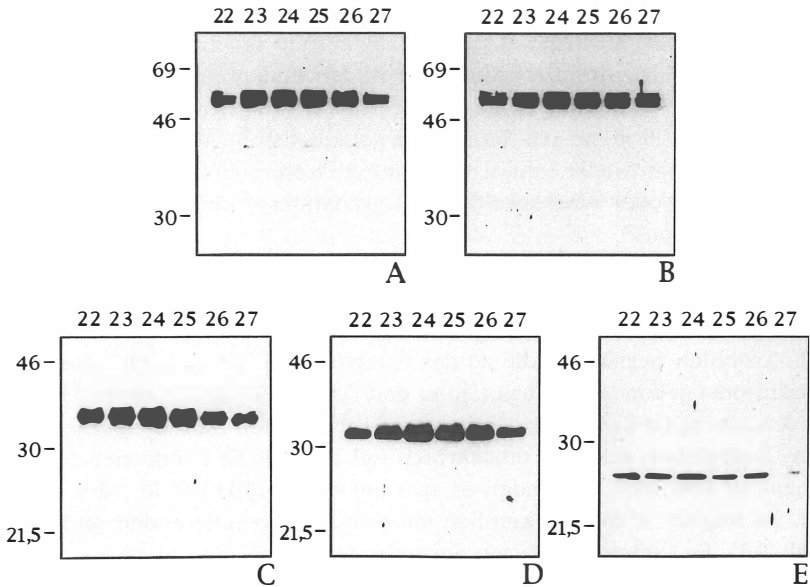


Abb. 13: Immunologische Identifizierung von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel. Gleiche Volumina von sechs aufeinanderfolgenden Fraktionen des chromatographisch gereinigten Proteinkomplexes wurden über Elektrophorese in 13 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf Nitrozellulose geblottet und mit Antikörpern, die gegen Bestandteile der Cytochrom c Reduktase aus Pilzen gerichtet sind, inkubiert. A: Serum gegen das Core-Protein I, B: gegen das Core-Protein II, C: gegen Cytochrom b, D: gegen Cytochrom c_1 und E: gegen das Eisen-Schwefel-Protein. Links sind die Größen von Standardproteinen angegeben. Die Zahlen oben bezeichnen die geladenen Fraktionen korrespondierend zu Abb. 10.

Auf der Basis von SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli setzt sich die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel aus 10 Komponenten zusammen (Abb. 9, 10 und 12). Die Stöchiometrie der Untereinheiten ist dabei nur schwer abschätzbar, da die Aminosäurezusammensetzung von Proteinen die Bindung von Farbreagenzien (z.B. Coomassie) beeinflusst. Die 55 und 53 kd-Banden erscheinen auf Gelen beispielsweise weniger intensiv als die benachbarte 51 kd-Bande. So bleibt noch zu zeigen, daß es sich bei den Core-Proteinen der Kartoffel wirklich um drei verschiedene Untereinheiten handelt, und nicht um lediglich zwei, von denen eine in zwei Isoformen vorkommt (siehe 3.5.2.).

Zwischen den Core-Proteinen und Cytochrom b treten zwei weitere Banden bei 50 bzw. 42 kd auf (Abb. 9, 10, 12), die absolut synchron mit den Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase von den Säulen eluieren, jedoch klar substöchiometrisch sind. Beide kreuzreagieren mit den Antikörpern, die gegen die Core-Proteine aus *Neurospora* gerichtet sind (Abb. 13, Teil A) und könnten somit entweder schwach exprimierte Isoformen dieser Untereinheiten darstellen, oder aber spezifische Degradationsprodukte derselben sein (siehe Diskussion).

Die Cytochrom b-Bande wirkt auf SDS-Polyacrylamidgelen mehr oder weniger diffus. Diese Tatsache weist auf den besonders hydrophoben Charakter der 35 kd-Untereinheit hin und liegt in einer variablen Anzahl von Phospholipid-Molekülen begründet, die an das Cytochrom b-Protein auch unter SDS-Konditionen gebunden bleiben (Sidhu und Beattie 1982).

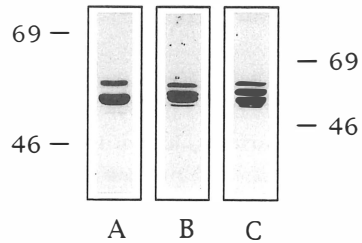
Cytochrom c_1 ist aufgrund der kovalent gebundenen Häm-Gruppe als einzige Untereinheit auch im ungefärbten Gel als rötliche Bande sichtbar. Bei genauerer Betrachtung handelt es sich um eine Doppelbande (Abb. 9, 10, 12). Sie reagiert in ihrer Gesamtheit mit dem korrespondierenden Antiserum (Abb. 13). Es kommen demnach entweder Isoformen für Cytochrom c_1 vor (siehe 3.4.2.), oder aber es sind unter den verwendeten Konditionen zwei verschiedene Entfaltungsstadien des Proteins auf Gelen sichtbar.

Die 14 und 12 kd-Banden der Cytochrom c Reduktase sind leicht mit Coomassie anfärbbar, verlieren einen Großteil des Farbstoffs jedoch wieder bei länger andauernder Entfärbung. Dieses Phänomen kennzeichnet besonders hydrophile Proteine. Somit könnte es sich bei diesen Untereinheiten um die "Q-binding"- und "Hinge"-Proteine handeln (siehe 3.4.4.).

Unterhalb der 11 und 10 kd-Untereinheiten befindet sich eine weitere substöchiometrische Bande von etwa 8 kd (Abb. 10 und 12).

Alle bisher gemachten Aussagen beziehen sich auf Analysen der Cytochrom c Reduktase mit SDS-PAGE unter Verwendung von 13-14 %igen Gelen. Auf niedriger prozentigen Gelen weisen vor allem Cytochrom b und die 51 kd-Untereinheit ein stark verändertes Laufverhalten auf (siehe auch Berry et al. 1991). Das apparente Molekulargewicht von Cytochrom b beträgt auf 10 %igen Gelen noch 33 kd, auf 7 %igen Gelen sogar lediglich 30 kd (vergleiche Abb. 15 und 16). Damit ist die Bande unterhalb von Cytochrom c_1 lokalisiert (nicht gezeigt). Das 51 kd-Protein verändert seine Lage auf niedriger prozentigen Gelen hingegen in entgegengesetzter Richtung. Auf 7 %igen Gelen fällt es mit der 53 kd-Bande zusammen, so daß sich die Anzahl der Core-Proteine scheinbar auf zwei reduziert (Abb. 14). Dieser Sachverhalt erklärt

Abb. 14: Analyse der Core-Proteine der gereinigten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel über Elektrophorese in Polyacrylamidgelen mit verschiedenen Prozentigkeiten. A: 7 %, B: 11 %, C: 13 %. Die Zahlen links und rechts geben für die beiden äußeren Spuren die molekulare Größe von Standardproteinen an.



auch das widersprüchliche Ergebnis der Kreuzreaktion des Serums gegen das Core-Protein I aus *Neurospora* mit zwei bzw. drei mitochondrialen Membranproteinen der Kartoffel, je nach der verwendeten Polyacrylamidkonzentration im Gel (Abb. 4, 6, 7, bzw. 13). Die substöchiometrische Bande bei 50 kd weist auf verschieden prozentigen Gelen ein Laufverhalten auf, das dem der 51 kd-Bande gleicht. Somit könnte sie eine Isoform bzw. ein Degradationsprodukt dieser Untereinheit darstellen.

Die vier kleinen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel sind erst auf Gelen mit >12% Acrylamid auftrennbar. Die apparenten Molekulargewichte der 12, 11 und 10 kd-Proteine erscheinen bei Verwendung von Acryamidkonzentrationen >15 % um etwa 2-3 kd kleiner (siehe auch 3.4.4.).

Mit Hilfe von Tricin-Gelen läßt sich die Cytochrom c Reduktase der Kartoffel nicht verbessert darstellen. Wie bereits von Berry et al. (1991) berichtet, führt eine verminderte Trennungskapazität im 50 kd-Bereich zu der Darstellung von lediglich zwei Core-Proteinen (nicht gezeigt).

Um mögliche Isoformen von einzelnen Untereinheiten zu ermitteln, sind hochauflösende Gelsysteme erforderlich, die auch sehr ähnliche Proteine noch zu trennen vermögen. Zweidimensionale Gelelektrophorese erwies sich jedoch als ungeeignet. Die Cytochrom c Reduktase dissoziiert in Gegenwart von Urea nicht in ihre Bestandteile, so daß es in der ersten Dimension des verwendeten Gelsystems (siehe Material und Methoden, 2.2.2.) zu keiner Auftrennung kommt (nicht gezeigt).

3.3.3. Cytochrom c Reduktase aus verschiedenen Sorten der Kartoffel

Die Cytochrom c Reduktase der Kartoffel wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit aus den Knollen von 6 verschiedenen Sorten isoliert (Hansa, Désirée, Bintje, Marfona, Jaerla und Ukama). Es zeigt sich bei der Analyse mit SDS-PAGE kleinere Unterschiede (Abb. 15). Die 53 und 55 kd-Proteine sind von ihrer Intensität her leicht variabel. Dabei bedingt die schwache Präsenz der einen Bande ein stärkeres Vorkommen der anderen und umgekehrt. Diese Beobachtung könnte bedeuten, daß es sich bei den 53 und 55 kd-Untereinheiten um (alternative?) Isoformen handelt. Bei der Sorte Bintje ist das 55 kd-Protein besonders schwach vertreten und scheint darüber hinaus als Doppelbande vorzuliegen (nicht gezeigt).

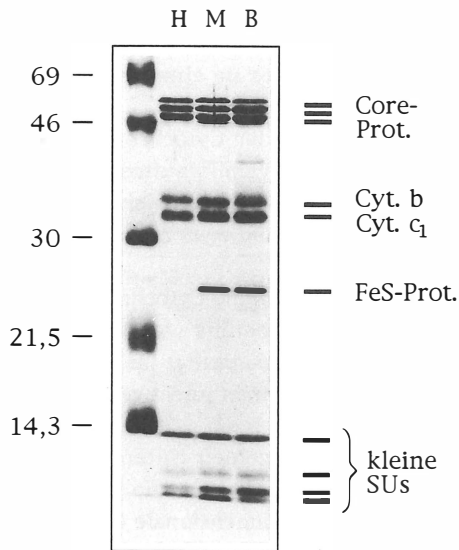


Abb. 15: Isolierung der Cytochrom c Reduktase aus verschiedenen Sorten der Kartoffel. Die Untereinheiten der Proteinkomplexe wurden über SDS-PAGE (13 % Polyacrylamid) aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. H: Hansa, M: Marfona, B: Bintje. Die Zahlen links beziehen sich auf die Molekulargewichte von Standardproteinen (Spur 1), die Bezeichnungen rechts geben die Identitäten der Untereinheiten an.

Von aus Pilzen oder Säugern isolierten Cytochrom c Reduktasen ist bekannt, daß die Eisen-Schwefel-Untereinheit nur locker an den Proteinkomplex gebunden ist und z.T. präparationsbedingt dissoziiert (Weiss und Juchs 1978, Riccio et al. 1977). Dafür ist hauptsächlich die Triton X-100-Konzentration während der Solubilisierung der Membranproteine bzw. der Verdünnungsgrad während der chromatographischen Enzympräparation verantwortlich, darüber hinaus scheinen die Cytochrom c Reduktasen aus verschiedenen Sorten der Kartoffel jedoch eine unterschiedliche Disposition für die Abspaltung des FeS-Proteins aufzuweisen. Bei dem Proteinkomplex aus Hansa geht die Untereinheit reproduzierbar abhanden (Abb. 15, 32), wohingegen unter identischen Bedingungen isoliertes Enzym aus Bintje immer eine deutliche d.h. stöchiometrische Eisen-Schwefel-Bande aufweist.

Die substöchiometrischen Banden bei 50 und 42 kd sind bei den einzelnen Sorten der Kartoffel in unterschiedlichem Maße vertreten (Abb. 15). Diese Tatsache ist sowohl mit einer Interpretation vereinbar, wonach es sich bei diesen Proteinen um niedrigexprimierte Isoformen von Untereinheiten handelt, als auch mit der Möglichkeit, daß Degradationsprodukte vorliegen.

3.3.4. Cytochrom c Reduktase aus verschiedenen Geweben der Kartoffel

Für die Kartoffelsorte Désirée wurde die Cytochrom c Reduktase auch aus Sproß- und Wurzelgewebe isoliert. Da vor allem für Kartoffelwurzel lediglich geringe Ausgangsmengen zur Verfügung standen, konnte der Proteinkomplex nur angereinigt werden. Aus Kartoffelsproß isolierte Cytochrom c Reduktase unterscheidet sich - abgesehen von einer präparationsbedingten Abspaltung der Eisen-Schwefel-Untereinheit - nicht von dem Enzymkomplex aus Kartoffelknolle (Abb. 16). Das 55 kd-Protein ist jedoch quantitativ besonders stark vertreten. Die angereinigte Cytochrom c Reduktase aus Kartoffelwurzel scheint dagegen im Bereich der Core-Proteine ein deutlich unterscheidbares Muster aufzuweisen. Auf der Basis von Immunoblotting laufen die 51 und 53 kd-Proteine hier bei etwa 50 bzw. 52 kd (Abb. 16, Teil B). Für eine Verifizierung dieses Ergebnisses sind jedoch weitere Experimente erforderlich.

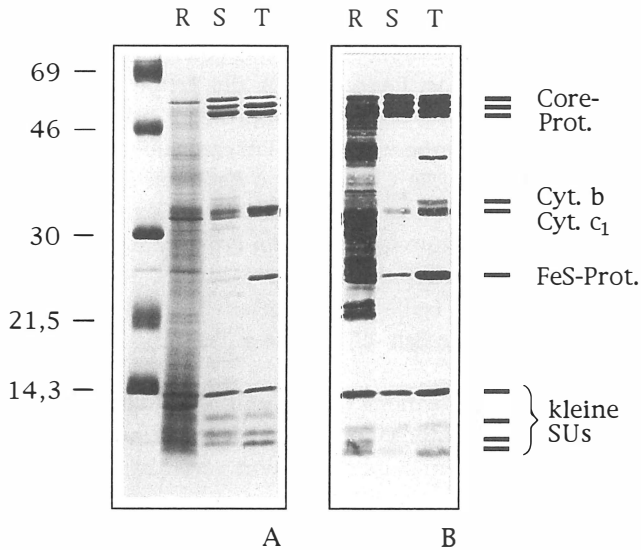


Abb. 16: Isolierung der Cytochrom c Reduktase aus verschiedenen Geweben der Kartoffel (R: Wurzel, S: Sproß, T: Knolle). A: Analyse der gereinigten bzw. angereinigten Enzymkomplexe über Elektrophorese in einem 12 %igen Polyacrylamidgel. Die Anfärbung der Banden erfolgte mit Coomassie. B: Immunoblot der gleichen Fraktionen, entwickelt mit einem Serum gegen Gesamtprotein der gereinigten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel (siehe Material und Methoden 2.2.5.). Die Zahlen links geben die Molekulargewichte von Standardproteinen an; rechts stehen Bezeichnungen für die 10 Untereinheiten des Proteinkomplexes.

3.4. Molekulare Charakterisierung von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel

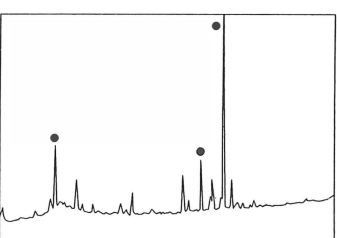
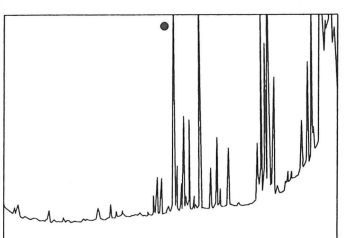
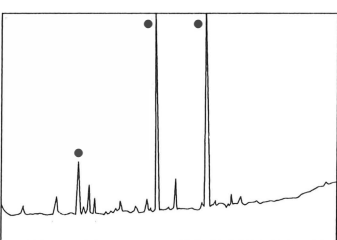
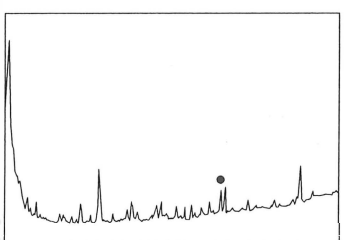
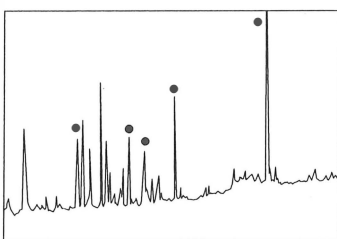
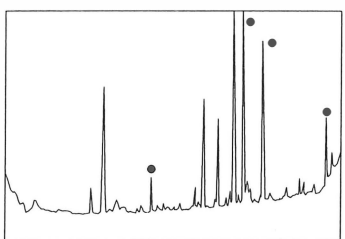
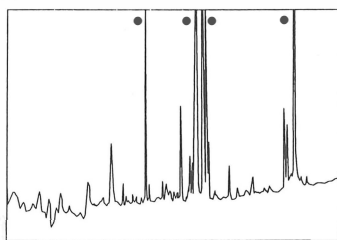
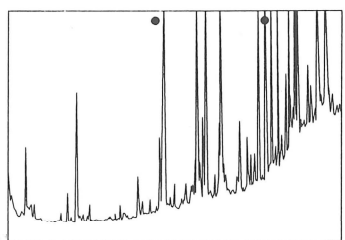
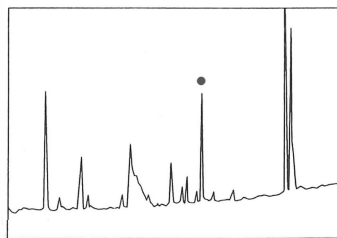
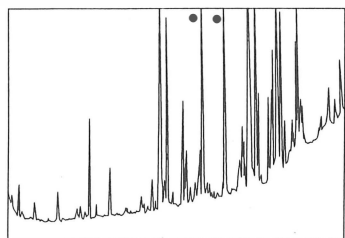
Für die weitere Charakterisierung der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel wurden Sequenzdaten für alle 10 Untereinheiten des Proteinkomplexes ermittelt. Ziel war eine genaue Identifizierung aller Komponenten. Besonderes Interesse galt dabei den Aminosäuredaten für die Core-Proteine, um diese Untereinheiten den Komponenten der PEP/MPP/Core-Proteinfamilie (Schulte et al. 1989) zuordnen zu können. Darüber hinaus lassen sich für kernkodierte Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase, deren Gene bekannt sind, über N-terminale Sequenzdaten die Leitsequenzen definieren. Noch nicht

identifizierte Gene können wiederum mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden, die von Aminosäuredaten abgeleitet sind, isoliert werden.

Gereinigte Cytochrom c Reduktase der Kartoffel (5 mg) wurde über präparative SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in ihre Untereinheiten zerlegt. Die Banden wurden auf PVDF-Membranfilter transferiert, über Ponceau-S angefärbt und mit einem Skalpell ausgeschnitten (siehe Material und Methoden, 2.2.4.). Mit diesem Ausgangsmaterial erfolgte die N-terminale Ansequenzierung sowie die endoproteolytische Fragmentierung aller Untereinheiten. Die generierten Peptide wurden mit Hilfe einer HPLC aufgetrennt (Abb. 17) und anschließend sequenziert. Eine Übersicht der erhaltenen N-terminalen und internen Aminosäuredaten für die Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel geben Abbildung 18 und Tabelle 5.

Abb. 17 (folgende Seite): HPLC-Auftrennungen der endoproteolytisch generierten Peptide der 10 Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel. Die Fragmentierung von Cytochrom b erfolgte über tryptische Verdauung, die aller anderen Untereinheiten mit Hilfe von Lys C. A: 55 kd-Protein, B: 53 kd-Protein, C: 51 kd-Protein, D: Cytochrom b, E: Cytochrom c₁, F: Eisen-Schwefel-Protein, G: 14 kd-Protein, H: 12 kd-Protein, I: 11 kd-Protein und J: 10 kd-Protein. Die Elution der Peptide wurde bei 220 nm aufgezeichnet. Sie erfolgte über einen Gradienten aus Wasser und Acetonitril (linker Rand der Diagramme: 5 % Acetonitril, rechter Rand: 60 %). Die Punkte markieren Peptide, deren Aminosäuresequenz bestimmt wurde (siehe Abb. 18).

Abb. 18 (Seite 55): Aminosäuresequenzen der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel. Alle 10 Untereinheiten wurden N-terminal ansequenziert (N). Außerdem erfolgte eine Sequenzierung von Peptiden (P1, P2, ...). Als Aminosäure unmittelbar vor dem N-Terminus der Peptide wird Lysin angenommen; das C-terminale Lysin vollständig sequenzierter Peptide ist unterstrichen. Aminosäurereste, die nicht eindeutig identifizierbar waren, sind als Fragezeichen dargestellt. Die Endoproteinase Lys C fragmentiert Proteine unter den angewendeten Konditionen (siehe Material und Methoden, 2.2.8.) mit großem Wirkungsgrad. Nur in einem Peptid konnte ein internes Lysin identifiziert werden (53 kd-Protein, Peptid P1, Aminosäure 5).



55 kd-Prot. N ? ? S I T N P ...
P1 ? T S I T N P S Q S S S L P S P P P P D A M I Y D R L ...
P2 (K) R P I R A L E E E I E N M G G H L N A Y T S R E E ...
P3 (K) Q P E E V I F D Q L H T T A F Q ...
P4 (K) A V D I L G D I L Q N S L L E E ...
P5 (K) H M G S E L V Q R V A I N E L A ...
P6 (K) S S L M L H I D G S G P T A E D ...

53 kd-Prot. N ? A S A A V A A T S S S T P A ...
P1 (K) F E E R K I G A E R D V I L R ...
P2 (K) L S T N P T T A S E L V A R E ...
P3 (K) R V A N R F I F D Q D V A I S A L G P I Q T L P D T ...
P4 (K) D Y I S T H Y T A P R M V I V A S G P V K
P5 (K) R T S ? E ...
P6 (K) ? ? ? F V E Q V ...

51 kd-Prot. N ? S S A A V A ...
P1 (K) E L I A V A N P S E V D Q V Q L N R A K
P2 (K) V A E P L L S D L P K
P3 (K) D I A S V V Q K
P4 (K) L I S S P L T M A ...

Cyt. b N T I R N Q R L S L L K Q P I S ? ? L ...
P1 (R) D V E G G ? L L R

Cyt. c₁ N D E A E H G L E ? P S Y P ? P ? A G I L ...
P1 (K) M L N D G A V E Y E D G V P A T E A Q M G K

FeS-Prot. N S S N S V S P A H Q L G L V S ? L P A T V A ...
P1 (K) L A N S V D L G T L R D P Q Q D A E R V K

14 kd-Prot. N - blockiert -
P1 (K) E A L N R L P R E I V D A R N Q R L L R A V D L S ...
P2 (K) N P L A A I H M K
P3 (K) H Q Y L P E D L Q A M Q T P ? ? R S Y L ...
P4 (K) R E S A E R E A L G A L P L Y Q R T K

12 kd-Prot. N G D E E V V D P K A T L E V S ? K ...
P1 (K) H ? T G Q Y F D Y W H S I D K
P2 (K) L F D H L K
P3 (K) N Y Q A Y A K
P4 (K) N Y Q A L A K
P5 (K) A V R E V S ...

11 kd-Prot. N M K Q R V K L G A V L E A E Y ...
P1 (K) T L W E K
P2 (K) R Y E D I S V L G Q R P V D E ...

10 kd-Prot. N G K Q P V K L K A V V Y A L S P F Q Q K I M P G L S ...
P1 (K) A V V Y A L S P F Q Q K
P2 (K) I M P G L ? K
P3 (K) L E H R Y ...

Untereinheit	N-Terminus	Anz. d. sequenzierten Peptide	Anzahl der ermittelten AS
55 kd-Prot.	+	6	120
53 kd-Prot.	+	6	106
51 kd-Prot.	+	4	58
Cyt. b	+	1	25
Cyt. c ₁	+	1	40
FeS-Prot.	+	1	43
14 kd-Prot.	-	4	75
12 kd-Prot.	+	5	61
11 kd-Prot.	+	2	37
10 kd-Prot.	+	3	33
gesamt	9	33	598

Tabelle 5: Zusammenfassende Darstellung der Aminosäuresequenzierungen für die 10 Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel.

3.4.1. Cytochrom b: Abtrennung des N-terminalen Methionins bei einem mitochondrial kodierten Protein

Genomische DNA-Sequenzen und korrespondierende RNA-Sequenzen weisen bei den mitochondrialen Genen höherer Pflanzen Diskrepanzen auf, die auf eine Editierung der Transkripte zurückzuführen sind (Pring et al. 1993). Die Konsequenzen für die Translation der entsprechenden Proteine wurden bislang nur in Einzelfällen untersucht (Bégu et al. 1990, Dell'Orto et al. 1993). Demnach scheinen nur vollständig editierte mRNAs an den mitochondrialen Ribosomen als Vorlage für die Proteinbiosynthese zu dienen. Um dieses Ergebnis zu überprüfen, wurde versucht, interne Aminosäuredaten der mitochondrial kodierten Cytochrom b-Untereinheit zu ermitteln. Eine Analyse erwies sich jedoch aufgrund der großen Hydrophobizität des Proteins als kompliziert. Es gelingt nur unter Schwierigkeiten, d.h. in Gegenwart von SDS und mit Hilfe eines starken elektrischen Feldes (siehe Material und Methoden, 2.2.4.), gelelektrophoretisch aufgetrenntes Cytochrom b auf Membranfilter zu transferieren. Zudem läßt sich das geblottete Protein weder mit Ponceau-S noch mit Amidoschwarz anfärben, ist also lediglich indirekt durch seine Abwesenheit in den entsprechenden Proteingelen oder über

Immunoblotting nachweisbar (Abb. 13). Dennoch konnten einige Peptide des tryptisch verdauten Cytochrom b über HPLC aufgetrennt werden (Abb. 17, Teil D). Auf der Basis der Sequenzierung eines dieser Peptide (siehe Abb. 18) kann jedoch vorerst keine Aussage über die Relevanz von "Editing" für die Translation gemacht werden, da in dem korrespondierenden Sequenzabschnitt des Transkripts (Zanlungo et al. 1991) keine Editierungsstelle liegt.

Entgegen den Erwartungen ließ sich die N-terminale Sequenz der Cytochrom b-Untereinheit aus Kartoffel ohne Probleme bestimmen (Abb. 18, 19). Analog zur Proteinbiosynthese bei Prokaryonten startet die Translation mitochondrial kodierter Proteine nämlich mit formyliertem Methionin, das für Sequenzanalysen "blockiert" ist. In Bakterien wird die Formyl-Gruppe oftmals posttranslational mit Hilfe einer Deformylase entfernt. Im Anschluß kann eine Methioninaminopeptidase das Initiator-Methionin abspalten. Dieser Vorgang findet auch im Cytoplasma von Eukaryonten statt, hier sind die Translationsprodukte jedoch von vornherein unformyliert. Physiologische Experimente mit isolierten Mitochondrien aus Hefe (Mahler et al. 1972, Feldmann und Mahler 1974) sowie die Tatsache, daß alle mitochondrial kodierten Proteine ohne intramitochondriale Targeting-Sequenz, bei denen bislang eine N-terminale Sequenzierung versucht wurde, durch Formylierung am N-Terminus blockiert waren (für Referenzen siehe Braun und Schmitz 1993), haben zu der Schlußfolgerung geführt, daß Deformylase- und Methioninaminopeptidase-Aktivitäten in den Mitochondrien fehlen (Feldmann und Mahler 1974, Mannhaupt et al. 1985). Insofern ist die Sequenzierbarkeit des Cytochrom b aus Kartoffel überraschend.

Um Artefakte auszuschließen, wurde die aminoternale Sequenzierung der Cytochrom b-Untereinheit mit drei unabhängigen Proteinpräparationen durchgeführt. Im ersten Degradationsschritt tauchte jeweils ein starkes Signal für Glycin auf, das bei Proteinen, die über Gelelektrophorese in Glycinpuffern isoliert wurden, in diesem Zyklus generell zugegen ist. Der echte Aminoterminus - es handelt sich um die Aminosäure Threonin - ließ sich dennoch in einem der drei Experimente bestimmen (Abb. 19). Im zweiten Zyklus tauchte übereinstimmend ein Isoleucin auf, im dritten ein Arginin etc. (siehe Abb. 19). Der "open reading frame" des korrespondierenden Gens aus Kartoffel (Abb. 20, aus Zanlungo et al. 1991) weist hingegen Threonin an Position 2, Isoleucin an Position 3 und Arginin an Position 4 auf. Das N-terminale Methionin des Cytochrom b ist also offensichtlich abgetrennt.

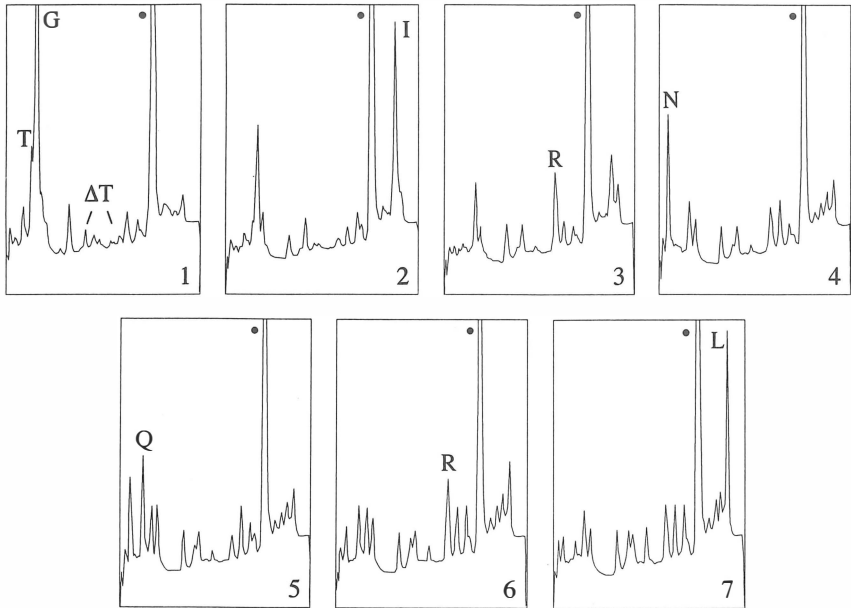


Abb. 19: N-terminale Sequenzierung von Cytochrom b. Die HPLC-Elutionsprofile der PTH-Aminosäurederivate der ersten sieben Zyklen der Edman-Degradation sind abgebildet. Horizontale Achse: Zeit (0-30 Minuten), vertikale Achse: Absorption. Die Buchstaben geben die identifizierten Aminosäuren an, die Punkte markieren Signale für Diphenylthiourea. Bei allen N-terminalen Sequenzierungen von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase tauchte im Degradationszyklus 1 ein Signal für Glycin auf, das von der Gegenwart dieser Aminosäure im Laufpuffer der SDS-PAGE herrührt. Korrespondierend zu der veröffentlichten cDNA-Sequenz von Cytochrom b der Kartoffel trat daneben ein Signal für Threonin auf. Außerdem sind die charakteristischen PTH-Derivate für DTT-Addukte von dehydriertem Threonin (ΔT) in diesem Zyklus sichtbar.

Aus verschiedenen Gründen ist es unwahrscheinlich, daß es sich beim Fehlen des Initiator-Methionins der Cytochrom b-Untereinheit der Kartoffel um ein künstliches, d.h. experimentell bedingtes Resultat handelt (z.B. als Folge einer präparationsbedingten schwachen Exoprotease-Aktivität): 1. Sequenzierung von Cytochrom b führte in drei unabhängigen Versuchen zum selben Ergebnis; 2. Es lagen keine "ausgefranst" N-Termini vor, die das Resultat von chemischer Degradation bzw. exoproteolytischer Aktivität darstellen könnten; 3. Auch alle anderen N-Termini der Untereinheiten der Cytochrom

c Reduktase aus Kartoffel wurden ansequenziert, ohne daß es irgendwelche Hinweise für Degradation gab. Somit muß für die Mitochondrien der Kartoffel das Vorkommen einer spezifischen Deformylase- und Methioninamino-peptidase-Aktivität angenommen werden (siehe Diskussion).

Zyklus:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	
(1)	*	I	*	N	Q																
(2)		*	I	R	N	Q	R	*	*	L	*	K	Q	*	I						
(3)			T	I	R	N	Q	R	L	S	L	L	K	Q	P	I	S	*	*	L	*
(4)		M	T	I	R	N	Q	R	L	S	L	L	K	Q	P	I	S	S	T	L	N
		ATG	ACT	ATA	AGG	AAC	CAA	CGG	CTC	TCT	CCT	AAA	CAA	CCT	ATA	TCC	TCC	ACA	CTT	AAT	...

Abb. 20: N-terminale Aminosäuresequenz von Cytochrom b. Drei unabhängige Experimente, (1), (2), und (3), wurden durchgeführt, und die Ergebnisse mit der veröffentlichten cDNA-Sequenz für Cytochrom b der Kartoffel (4) verglichen (aus Zanlungo et al. 1991). Die Nummern oben geben die Degradationszyklen an. Die Sterne stehen für Zyklen, in denen keine Aminosäure identifiziert werden konnte.

Methioninaminopeptidasen sind aus *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und aus dem Cytoplasma von Hefe aufgereinigt worden (Ben-Bassat et al. 1987, Wingfield et al. 1989 und Chang et al. 1990). Ihre Spezifität hängt entscheidend von der Größe der zweiten Aminosäure ab (Tsunasawa et al. 1985). Eine Abspaltung des Methionins erfolgt vor Gly, Ala, Pro, Ser, Thr, Val und Cys, auf keinen Fall hingegen vor His, Gln, Glu, Phe, Met, Lys, Tyr, Trp und Arg. Die Spezifität der postulierten Methioninaminopeptidase aus den Mitochondrien der Kartoffel ist bezüglich des Cytochrom b-Proteins in Einklang mit diesen Ergebnissen. Abb. 21 enthält N-terminale Sequenzen der Cytochrom b-Proteine aus verschiedenen Organismen. Auch bei Hefe und Rind wäre demnach eine Methioninabspaltung in Mitochondrien entsprechend den oben ausgeführten Regeln denkbar. Cytochrom b aus diesen beiden Organismen ist jedoch für die Edman-Degradation blockiert (Mannhaupt et al. 1985, v. Jagow et al. 1981). Cytochrom b anderer Pflanzen wurde bezüglich dieser Frage noch nicht untersucht, eine Abspaltung ist von der zweiten Aminosäure her jedoch möglich. (Die wenigen sonstigen mitochondrial kodierten Proteine, die aus Pflanzen isoliert und N-terminal ansequenziert wurden und die keine intramitochondriale Targeting-Sequenz aufweisen, waren blockiert, ließen jedoch nach den Spezifitätsregeln für

Methioninaminopeptidasen auch keine Methioninabspaltung zu und stellen insofern keinen Widerspruch für das Vorhandensein dieser Enzyme dar; siehe Braun und Schmitz 1993.)

Kartoffel	M T I R N Q R L S L L K Q P I S S T L N Q H L I D Y ...
Mais	M T I R N Q R F S L L K Q P I Y S T L N Q H L I D Y ...
Weizen	M T I R N Q R F S L L K Q P I Y S T L N Q H L I D Y ...
<i>Oenothera</i>	M A T I R N Q R F S L L K Q P I S S T L N Q H L I D Y ...
Hefe	M A F R K S N V Y L S L V N S Y I I D S ...
Rind	M T N I R K S H P L M K I V N N A F I D L ...

Abb. 21: Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenzen von Cytochrom b aus Kartoffel, Mais, Weizen, *Oenothera*, Hefe und Rind (für Referenzen siehe Braun und Schmitz 1993). Die Daten sind von den entsprechenden cDNA-Sequenzen abgeleitet. Die zweite Aminosäure, die für die Spezifität der Methioninaminopeptidasen entscheidend ist, ist jeweils **fett** dargestellt.

3.4.2. Cytochrom c_1 : Eine zweigeteilte Leitsequenz für den Transport in den mitochondrialen Intermembranraum

Cytochrom c_1 ist auf der Intermembranraum-Seite der Cytochrom c Reduktase lokalisiert (Li et al. 1981). Der Transport des kernkodierte Vorläufer-Proteins in die Mitochondrien von Säugern und Pilzen erfolgt in zwei separaten Schritten, für die eine zweigeteilte Leitsequenz erforderlich ist (siehe Einleitung). Zu Beginn der Untersuchungen für die vorliegende Arbeit lag noch keine Charakterisierung eines pflanzlichen Proteins des mitochondrialen Intermembranraums vor. Es wurden daher cDNA-Klone für Cytochrom c_1 der Kartoffel isoliert und sequenziert und die erhaltenen Daten mit der Aminosäuresequenz des reifen Proteins verglichen.

Eine cDNA-Bank der Kartoffel wurde ausplattiert und mit einem heterologen Antikörper, der gegen Cytochrom c_1 aus Hefe gerichtet ist, durchsucht. Acht von ca. 4×10^5 Plaques reagierten positiv. Ihre "Inserts" wurden in den pBluescript-Vektor kloniert (siehe Material und Methoden, 2.6.2.) und mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen sowie über partielle Sequenzanalysen untersucht. Es zeigte sich, daß zwei verschiedene Cytochrom c_1 -Klassen in der cDNA-Bank von Kartoffel vorkommen, die mit C_{1I} (7 Klone) und C_{1II} (1Klon) bezeichnet wurden. Jeweils ein Klon ($pC_{1I.8}$ und $pC_{1II.3}$) wurde vollständig sequenziert (siehe Material und Methoden, 2.6.3.).

	CTCTTCTCGCGCACACGAAACAAATCGTCTCGAACAGTTCACTACGCTGACGCACGCTACGGCTCTTCCGCATC	77
	M S L G K K I R I G F D G G F G R I	
	CGCTACTACCGGCCAACACTCTCTGTGAATC ATG AGT TTA GGG AAG AAG ATC AGA ATA GGA TTT GCG GGA TTT GGA AGA ATC	163
	N R F I T R G A A C Q R N D S K L P S R N D A L K H G	
	ATC DGG TTT ATT CGC AGA GGA GCT GCC CAG AGG AAT GAC TCG AAG CTT CCC AGT AGA AAT GAT GCA CTG AAG CAT GGC	241
	L D G L G S A G S K S F R A L A I G A G V S G L L	
	CTG GAT GGA CTT GGA TCT GCT GGC TCG AAG TCT TTC AGA GCA CTT GCA GCC ATT GGT GCT GGA GTG TCT GGG CTC CTT	319
TC TGA GCG GGT GTA TCT GGA CTT ATA	
	I G A G V S G L L	
	(S) F A T (1) A (V) (S) D E A E H G L E C P (N) Y P W P H (6) G	
	AGT TTT GCA ACA ATT GCT TAT TCT GAT GAG GCA GAG CAT GGA CTA GAG TGT CCC AAC TAT CCC TGG CCT CAC GAA GGC	397
	GGT TTT GCG ACA CTA GCA TCT GCT GAT GAG GCT GAA CAC GGA TTG GAA TGT CCA AGC TAT CCT TGG CCT CAT GCA GGC	
	(C) F A T (V) A (S) (A) D E A E H G L E C P (S) Y P W P H (A) G	
	I L S S Y D H A S I R R G H Q V Y Q Q V C A S C H S	
	ATC CTC AGT TCT TAT GAC CAT GCT TCG ATC CGT CGA GGT CAC CAG GTT TAC CAA CAA GTT TGC TCG TCA TGC CAG TCA	475
	ATT CTT AGT TCA TAC GAT CAT GCT TCG ATT CGT CGT GGT CAC CAG GTT TAT CAA CAA GTT GCA TCT TGT CAT TCA	
	I L S S Y D H A S I R R G H Q V Y Q Q V C A S C H S	
	M S L (1) S Y R D L V G V A Y T E E E (1) K A M A A E I	
	ATG TCT CTA ATT TCA TAT CGT GAT CTT GTT GGG GTT GCC TAC ACC GAG GAA GAG ACC AAC GGC ATG GCA GCA GAA ATT	553
	ATG TCA CTT GTT TCA TAT CGT GAC TTG CCG GGG GTG GCA TAT ACA GAG GAG GAA GGT AAG GCT ATG GCA GCT GAG ATT	
	M S L Y R D L V G V A Y T E E E (V) K A M A A E I	
	E G V (V) D B C P N D E G E M F T R P G K L S D R R F P Q P	
	GAG GTG GTT GAT GGG CCT AAT GCA GAA GTG GAG ATG TTT ACC CGT CCT GGG AAG CTG AGT GAT GCT TTC CCT GAG CCT	631
	GAG GTG GAG GAT GGG CCT AAT GAG GGT GAA ATG TTT ACC CGT CCT GGT AAA CTG AGT GAT CDT TTT CCT GAG CCA	
	E V G (E) D G P N D E G E M F T R P G K L S D R R F P Q P	
	Y (A) N E A A A R F A N G G A Y P P D L S L I T K A R	
	TAT GCA AAT GAA GCA ACC GCT GCA AGG TTT GCT AAT GGA GGA GCC TAT CCT CCA GAT TTA AGT CTA ATT AAC GAG CAT CGT	709
	TAT CCA AAT GAA GCT GCT AGA S I T G A N G G A Y P P D L S L I T K A R	
	Y (E) N E A A A R F A N G G A Y P P D L S L I T K A R	
	H N G Q N Y V F A L L T G Y R D P P A G V S I R E G	
	CAT AAT GGT CAA AAC TAT GTT TTT GCT CTT CTA ACT GGC TAC CGC GAC CCT CCT GCT GGT GTC TCG ATT CGA GAA GGA	787
	CAT AAT GGT CAA AAC TAT GTG TTT GCT CTT ACT ACT GGC TAT CGT GAT CCT CCT GGT GGT TCG ATT CGT GAA GGA	
	H N G Q N Y V F A L L T G Y R D P P A G V S I R E G	
	L H Y N P Y F P G G A I A M P K M L N D G A V E Y E	
	CTT CAC TAT AAT CCT TAC TTC CCT GGT GGA GCT ATA GCA ATG CCT AAA ATG CTT AAT GAT GGT GCC GTT GAG TAT GAG	865
	CTG CAC TAT AAT CCT TAC TTC CCT GGT GGA GCT ATT GCA ATG CCA AAA ATG CTT AAT GAT GGT GCT GTT GAG TAT GAA	
	L H Y N P Y F P G G A I A M P K M L N D G A V E Y E	
	D G (1) P A T E A Q M G K D V V S F L (S) W A A E P E M	
	GAT GGC ATC CCT GCA ACC GAG GCA CAG ATG GGA AAA GAT GTT GTC TCA TTC TGC TCG GCT CGG GAG CCA GAG ATG	943
	GAT GGT GTC CCT GCA ACA GAA GCT CAG ATG GGG AAA GAT GTG GTG TCA TTT TTA ACT TGG GCT GCT GAA CCA GAG ATG	
	D G (V) F A T E A Q M G K D V V S F L (1) W A A E P E M	
	E E R K L M G F K W I F V L S L A L L Q A A Y Y R R	
	GAA GAG AGA AAG CTG ATG GGT TTC AAA TGG ATA TTT GTT TTA TCT CTC GCA CTT CTC CAA GCA GCT TAC TAC CGC CGT	1021
	GAA GAG AGA AAA CTG ATG GGC TTC AAG TGG ATA TTT GTA CTG TCC CTT GCA CTA CTT CAA GCT GCT TAC TAC AGG CGT	
	E E R K L M G F K W I F V L S L A L L Q A A Y Y R R	
	L R W S V L K S R K L V L D V V N *	
	TTG AGA TGG TCT GTC CTC AAA TCT CGC AAG TTG GTT CTT GAT GTT GTC AAC TGA TATCGAGGATTTCGAAATGACACTCTAAGC	1106
	TTG AGG TGG TCT GTC CTC AAG TCA CGG AAG CTG GTC CTT GAT GTT GTC AAT *ACATCCCTATTCAAAATGCTTGTGGAGCAG	
	L R W S V L K S R K L V L D V V N *	
	GTGAAGGGCTTAGAGAATAATATCTCAATATTTTGTCCAAATGATTCGAGTTTGCAGCGTTATACAATATAGTCTAGACTATAGACAATAGAGTGCAATTA	1209
	GCAAAATAATATTTTTCGAAAATGCTTTTTGTGTTTGGAGCTTACTCTGGAATGGCCGTGGTTTTTGGTAAAGCGCAACAGCTAAAATTTCTCTTACT	
	GAACCTGCTCTCGCAGGATTTCTTTTTGAGGGGTAATAATAACTACTTAACATAA . . .	1304
	TGGAGTTGAAATAGAGGCCCGTGAATTTTTATAGTGGGGAGACATTCTCGCCCTGTTTTTGGAGGCTGAACCTGTTTTGGGGAGTAAAAAAAAA . . .	

Abb. 22: Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz der DNA-Insertionen von pC11.3 (untere Zeilen) und pC11.8 (obere Zeilen). Der Pfeil markiert die ermittelte Schnittstelle im Vorläufer-Protein. Aminosäurepositionen, an denen sich die beiden Proteine unterscheiden, sind mit Kreisen umrandet. Die Rahmen markieren Bereiche, die durch Aminosäuresequenzierung verifiziert wurden. Sie beinhalten drei Positionen, an denen die beiden Cytochrom c₁-Proteine verschieden sind. Die ermittelten Aminosäuresequenzen sind mit der von pC11.3 abgeleiteten Sequenz identisch.

Das "Insert" von pC1II.3 umfaßt 1304 bp und beinhaltet einen "open reading frame" von 960 Basen (Abb. 22). Die abgeleitete Aminosäuresequenz (320 AS) ergibt ein (Vorläufer-) Protein mit einem rechnerischen Molekulargewicht von 35 kd. Das 1014 bp-"Insert" von pC1I.8 enthält dagegen ein unvollständiges Leseraster von 782 Basen (Abb. 22).

Die Aminosäuresequenzen der Cytochrom c₁-Proteine aus Kartoffel sind zu 95 % identisch. Sie gleichen den korrespondierenden Sequenzen aus Pilzen und Säugern zu 55-60 % (Alignment in Braun et al. 1992a). Auf der Basis von Sequenzvergleichen lassen sich distinkte Domänen, die für Cytochrom c₁ aus anderen Organismen charakterisiert wurden, im Protein der Kartoffel identifizieren (Abb. 23). Dazu gehören zwei negativ geladene Bereiche, die an der Bindung zu Cytochrom c beteiligt sind (Broger et al. 1983, Stonehuerner et al. 1985), eine Häm-binde-Domäne, die das aktive Zentrum darstellt und eine C-terminale "Anker"-Domäne (Wakabayashi et al. 1980), mit der das Protein in die mitochondriale Membran integriert ist.

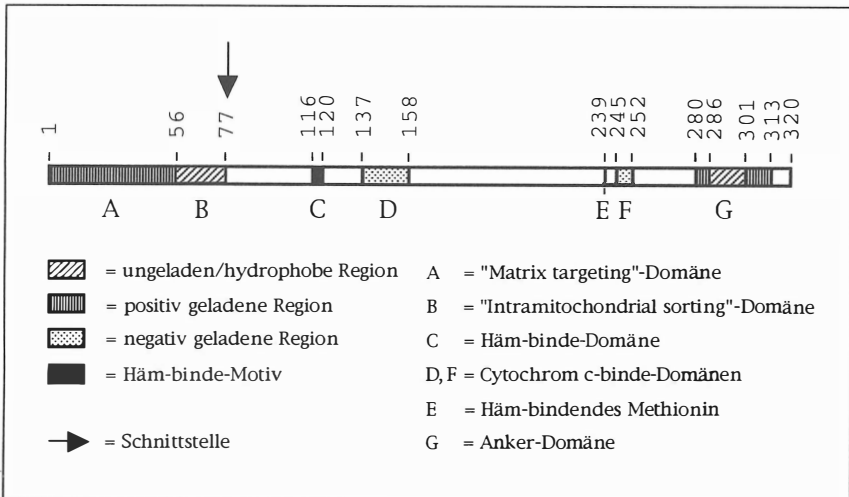
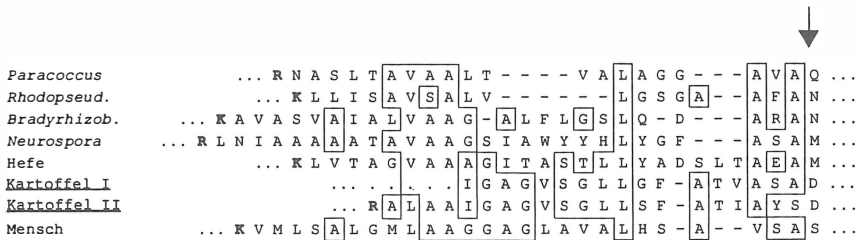


Abb. 23: Domänen des Cytochrom c₁-Proteins aus Kartoffel. Die Identifizierung der Bereiche erfolgte auf der Basis von Homologievergleichen mit Cytochrom c₁-Proteinen aus anderen Organismen. Die Nummern oben beziehen sich auf die Aminosäuresequenz des Vorläufer-Proteins aus Kartoffel; der Pfeil markiert die ermittelte Schnittstelle.

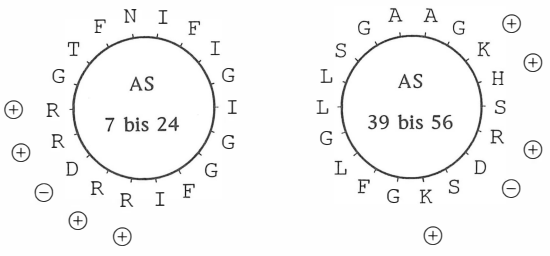
Um die Existenz einer Leitsequenz für das Cytochrom c_1 -Protein aus Kartoffel nachzuweisen, wurde das Insert von pC₁II.3 in *Escherichia coli* exprimiert. Gelelektrophoretisch aufgetrenntes Gesamtprotein dieser Bakterien reagierte mit einem Antikörper, der gegen Cytochrom c_1 aus Hefe gerichtet ist. Die immunopositive Bande hatte dabei erwartungsgemäß ein etwas größeres Molekulargewicht als das Cytochrom c_1 -Protein aus den Mitochondrien der Kartoffel (Braun et al. 1992a).

Eine Ansequenzierung der Cytochrom c_1 -Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ergab, daß die Schnittstelle des Precursors zwischen Aminosäure 77 und 78 liegt (siehe Abb. 18 und 22). Die somit erstmals definierte Leitsequenz eines pflanzlichen Proteins des mitochondrialen Intermembranraums weist dieselben Charakteristika auf, wie sie für kernkodierte Proteine dieses Subkompartiments aus Pilzen und Säugern beschrieben wurden (Hurt und van Loon 1986). Im vorderen Bereich (AS 1-55) befindet sich eine hydrophile Region, die potentiell amphiphile Helices als Sekundärstruktur ausbilden könnte und im hinteren Bereich ein Abschnitt mit ungeladen/hydrophoben Aminosäuren, der bakteriellen "Targeting"-Sequenzen gleicht (AS 56-77). Auch für Intermembranraum-Proteine pflanzlicher Mitochondrien lassen sich also Leitsequenzen mit einer "Matrix targeting"- und einer "Intramitochondrial sorting"-Domäne postulieren (Abb. 24).

Die Isolierung von cDNA-Klonen, die sich zwei verschiedenen Klassen zuordnen lassen, weist auf zwei Isoformen des Cytochrom c_1 -Proteins aus Kartoffel hin. Zumindest in Kartoffelknolle scheint die Klasse C₁II jedoch niedrig exprimiert zu sein und läßt sich, so belegen N-terminale und interne Sequenzdaten (siehe Abb. 22), auch auf der Proteinebene nicht wiederfinden. Die Aminosäuredaten der Cytochrom c_1 -Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffelknolle entsprechen in Positionen, die für die beiden Isoformen unterschiedlich sind, der Sequenz der Klasse C₁I. In anderen Geweben der Kartoffel könnte jedoch eine andere Situation vorliegen.



A



B

Abb. 24: Analyse der Leitsequenz des Cytochrom c₁-Proteins aus Kartoffel. A: Alignment der "intramitochondrial sorting"-Domänen von Cytochrom c₁ aus verschiedenen Eukaryonten und der entsprechenden "export signal"-Domänen von Prokaryonten (für Referenzen siehe Braun et al. 1992a). Die Kästen markieren Positionen, an denen die Proteine aus 3 oder mehr Organismen eine identische Aminosäure haben. Der Pfeil zeigt die Schnittstelle an. B: Helix-Projektionen für zwei Regionen aus der "matrix targeting"-Domäne der Leitsequenz von Cytochrom c₁ aus Kartoffel.

3.4.3. Bestimmung der Schnittstelle für das Eisen-Schwefel-Protein

Auch das Eisen-Schwefel-Protein ist eine Intermembranraum-exponierte Untereinheit der Cytochrom c Reduktase (Li et al. 1981), die - zumindest bei Pilzen - ebenfalls eine zweigeteilte "Targeting-Sequenz" aufweist. Der C-terminale Teil der Leitsequenz ist jedoch nicht hydrophob wie bei Cytochrom c₁, sondern besteht aus einem charakteristischen Oktapeptid, das von der "Mitochondrial Intermediate Peptidase" (MIP) erkannt und abgespalten wird (siehe Einleitung, Hartl et al. 1986, Fu et al. 1990). Bei Säugern wird die Präsequenz des Eisen-Schwefel-Proteins hingegen in einem Schritt prozessiert. Es konnte gezeigt werden, daß die abgetrennte Leitsequenz in der

Cytochrom c Reduktase verbleibt und eine der kleinen Untereinheiten des Proteinkomplexes darstellt (Brandt et al. 1993). Vor dem Hintergrund dieser Unterschiede zwischen Pilzen und Säugern stellt sich die Frage nach der Struktur der Leitsequenz und der Prozessierung des Eisen-Schwefel-Proteins bei Pflanzen.

Das FeS-Protein wurde bereits für eine höhere Pflanze auf cDNA-Ebene charakterisiert (*Zea mays*; Huang et al. 1991). Die Identifizierung der ersten 21 Aminosäuren der FeS-Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ermöglichte eine Zuordnung der erhaltenen Sequenz zu den Daten aus Mais. Auf der Basis des Alignments in Abb. 25 (Teil A) bestehen 52 % Identität, wohingegen ein Vergleich mit den entsprechenden Sequenzbereichen aus Hefe und Rind lediglich entfernte Ähnlichkeiten ergibt. Nimmt man an, daß die Schnittstelle beim Eisen-Schwefel-Protein aus Mais eine analoge Position hat, befindet sich im C-terminalen Teil der postulierten Leitsequenz kein Oktapeptid mit den für Pilzen beschriebenen Charakteristika. Somit könnte die Prozessierung ähnlich wie bei Säugern in einem Schritt erfolgen; weitere Experimente sind hier jedoch erforderlich.

Die Aminosäuresequenz eines internen Peptids der FeS-Untereinheit hat große Homologie zu den entsprechenden Sequenzen aus anderen Organismen (74 % zu Mais, 61 % zu Hefe, 57 % zu *Neurospora* und 48 % zu Rind, Abb. 25, Teil B). Mit Hilfe von degenerierten Oligonukleotiden, die von diesem Sequenzbereich abgeleitet waren, konnten Klone für das Eisen-Schwefel-Protein aus einer cDNA-Bank der Kartoffel isoliert werden* (Emmermann et al. 1993b).

Es gibt soweit keine Hinweise auf Isoformen für das FeS-Protein aus Kartoffel. Auf allen verwendeten Gelsystemen bzw. Immunoblots erwies sich die Eisen-Schwefel-Untereinheit als singuläre scharfe Bande (siehe Abb. 10 und 13).

3.4.4. Bestimmung von N-terminalen und internen Aminosäuresequenzen der kleinen Untereinheiten

Für die Cytochrom c Reduktasen aus Hefe und Rind sind 5-6 kleine Untereinheiten beschrieben (siehe Einleitung): das "Q-binding"-Protein, das "Hinge"-Protein sowie die "Core-linked"-, "Cytochrome c₁-linked"- und "FeS-linked"-Proteine. Außerdem verbleibt die Leitsequenz des FeS-Proteins als kleine Untereinheit im Proteinkomplex aus Rind (Brandt et al. 1993). Es

* durchgeführt von M. Clericus

<u>Kartoffel</u>	S	S	-	N	S	V	S	P	A	H	Q	L	G	L	V	S	D	L	P	A	T	V	...
Mais	S	S	T	E	T	V	V	P	R	R	Q	D	A	G	L	A	D	L	P	A	T	V	...
Hefe	S	S	V	K	T	C	F	K	P	M	S	L	T	S	K	R	L	I	S	Q	S	L	...
Rind	L	C	R	E	S	L	R	G	Q	A	A	A	A	L	V	A	S	V	S	L	N	V	...

A

<u>Kartoffel</u>	...	K	L	A	N	S	V	D	L	G	T	L	R	D	P	Q	Q	D	A	E	R	V	K	...
Mais	...	K	L	A	N	S	V	D	V	A	S	L	R	H	P	E	Q	D	A	E	R	V	K	...
Hefe	...	Q	E	A	N	S	V	D	M	S	A	L	K	D	P	Q	T	D	A	D	R	V	K	...
<i>Neurospora</i>	...	E	E	A	N	K	V	N	V	A	T	L	R	D	P	E	T	D	A	D	R	V	K	...
Rind	...	D	Q	E	A	A	V	E	V	S	Q	L	R	D	P	Q	H	D	L	E	R	V	K	...

B

Abb. 25: Alignment der N-terminalen Aminosäuresequenz (A) und der Sequenz eines Peptids (B) des Eisen-Schwefel-Proteins aus Kartoffel mit den entsprechenden Sequenzbereichen der Proteine aus Mais (Huang et al. 1991), Hefe (Beckmann et al. 1987), *Neurospora* (Harnisch et al. 1985) und Rind (Schägger et al. 1987). Identische Aminosäurereste sind eingerahmt.

wurde über Sequenzanalysen versucht, die 14, 12, 11 und 10 kd-Proteine der Kartoffel den kleinen Untereinheiten aus Hefe und Rind zuzuordnen.

Das 14 kd-Protein

Für das 14 kd-Protein der Kartoffel erfolgte eine Sequenzanalyse von 4 Peptiden (siehe Abb. 18, Tabelle 5). Die ermittelten 75 Aminosäuren sind überwiegend hydrophil und weisen 30 % bzw. 41 % Identität zu den "Q-binding"-Proteinen aus Hefe und Rind auf (Abb. 26, Tabelle 6). Der N-Terminus der 14 kd-Untereinheit ist blockiert. Da die Ansequenzierung aller anderen 9 Untereinheiten der isolierten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel keine Probleme bereitete, ist eine präparationsbedingte Blockierung unwahrscheinlich. Auch in Rind und Hefe sind die "Q-binding"-Proteine für eine N-terminale Sequenzierung blockiert (für Rind konnte eine Acetyl-Gruppe nachgewiesen werden, Wakabayashi et al. 1985).

Das 14 kd-Protein der Kartoffel läßt sich durch Behandlung der isolierten Cytochrom c Reduktase mit 1 % Guanidiniumhydrochlorid von dem Proteinkomplex abspalten (siehe 3.5.6.). Vermutlich handelt es sich demnach bei dieser Untereinheit um eine periphere Komponente. Für weitere Analysen wurde ein Antiserum gegen das 14 kd-Protein hergestellt (siehe Abb. 3, 36).

Das 12 kd-Protein

Aminosäuresequenzen, die für die 12 kd-Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ermittelt wurden, ließen sich klar dem "Hinge"-Protein des Enzymkomplexes aus Säugern (50 % Identität) bzw. Hefe (43 %) zuordnen (Abb. 26, Tabelle 6). Auch in Kartoffel handelt es sich um ein extrem hydrophiles Protein: 22 der 53 identifizierten Aminosäuren (42 %) tragen eine Ladung. Da auch die Anzahl an Lysinen relativ hoch ist, wurden bei der Lys C-Verdauung vergleichsweise kurze Peptide generiert (siehe Abb. 18).

Die N- und C-Termini der "Hinge"-Proteine sind hoch konserviert (G-D- und L-F-X-X-L-K). Ein charakteristischer Bereich von aufeinanderfolgenden sauren Aminosäuren (Hefe: 24 Reste; Rind und Mensch: 9 Reste) nahe dem N-Terminus ist bei Kartoffel jedoch auf zwei Glutaminsäurereste reduziert. Der hohe negative Ladungsüberschuß des Proteins aus Pilzen und Säugern dürfte sich dadurch vermindern.

Zwei separate Peptide des Lys C-verdauten Proteins aus Kartoffel weisen - mit Ausnahme von einer Aminosäure - eine identische Sequenz auf: N-Y-Q-A-Y-A-K- und N-Y-Q-A-L-A-K- (Abb. 18). Dieses Ergebnis könnte auf das Vorhandensein von zwei Isoformen für diese Untereinheit hinweisen.

Negativ geladene Proteine wie das "Hinge"-Protein binden nur wenig SDS, so daß ihr Molekulargewicht gewöhnlich überschätzt wird. Auch auf der Basis der Homologievergleiche der 12 kd-Untereinheit aus Kartoffel mit den korrespondierenden Proteinen aus Hefe und Rind muß eher von einer molekularen Größe von lediglich 9 kd ausgegangen werden. Das "Hinge"-Protein der Kartoffel ist, wie das "Q-binding"-Protein, mit Guanidiniumhydrochlorid von der isolierten Cytochrom c Reduktase abspaltbar (siehe 3.5.6.). Auch gegen diese Untereinheit wurde ein Antiserum hergestellt (Abb. 3).

Abb. 26 (Seiten 68, 69): Homologievergleich der Aminosäuresequenzen von den Peptiden der kleinen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel mit den Sequenzen dieser Proteine aus anderen Organismen. Identische Aminosäuren sind eingerahmt. Striche kennzeichnen Lücken, die eingefügt wurden, um die Ähnlichkeit zwischen den Aminosäuresequenzen aufzuzeigen. Sequenzbereiche, die von den analysierten Peptiden der Untereinheiten aus Kartoffel nicht abgedeckt werden, sind mit Punkten markiert.

Die Sequenzen der Proteine aus anderen Organismen sind folgenden Veröffentlichungen entnommen: de Haan et al. 1984 und Wakabayashi et al. 1985 ("Q-binding"-Proteine aus Hefe bzw. Rind); van Loon et al. 1984 und Ohta et al. 1987 ("Hinge"-Proteine aus Hefe bzw. Mensch); Maarse und Grivell 1987 und Borchart et al. 1986 ("Core-linked"-Proteine aus Hefe bzw. Rind); Schägger und Jagow 1983 und Phillips et al. 1990 ("Cytochrome c₁-linked"-Proteine aus Rind bzw. Hefe).

"Q-binding"-Protein:

Kartoffel KN?LAA
 Rind AGRPAV-S-ASSRWLEGIRKWWYNAA
 Hefe MPQSFTSIARI GDYILKSPVLSKLCVPVANQFINLA

IHMK KEALNRLPREIVDARNQRLLRAVDLS.K
 GFNKLGLMRDDTI-HENDDVKEAIRRLPENLYDDRVRIRKRALDLSMR
 GYKKLGLKFDLIIAENPIMQTA LRRLPEDESYARAYRIIRAHQTELT

HQ?LPEDLQAMQTP??RSYL KRESAEREALGALPLYQRTK
 QQILPKE-QWTKYEEDKSYLEFYLKEVIRERKEREEWAKK
 HHLPRN-QWIKAQEDVPYLLPYILEAEAAAKEKDEL DNI EVSK

"Hinge"-Protein:

Kartoffel
 Mensch MG
 Hefe MDMLELVGEYWEQLKITVVPVVAAAEDDDNEQHKK

. GD-----EEVVDPKATLEVS
 LEDEQKMLTESGDPE-----EEEEEEELVDP LTTVREQ
 AAEGEKEEENGDEDEDEDEDEDDDDDDDEDEEEEEEVTDQLEDLREH

?K KAVREVS KH-?TGQYFDY?
 CEQLKCVKA-RERLELCDERVSSRSHT-----E-EDCTEELFDL
 FKNTEEG-KALVHHYECAERVKIQQQP GYADLEHKEDCV EEFHLLQ

HSIDK KLFDHLK
 HARDHCVAHKLFNNLK
 HYLDTATA PR LFDKLLK

"Core-linked"-Protein:

Kartoffel G K Q P ----- V K L K A V V - Y A L S P F Q Q K I M
 Rind G R Q F ---- G H L T R V R H -- V I T Y S L S P F E Q R A F
 Hefe G P P S G K T Y M G W W G H M G G P K Q K G I T S Y A V S P Y A Q K P L

P G L - S K
 P H Y F S K G I P N V L R R T R A C I L -- R V A P P F V A F ----- Y L V Y T C G T Q E F
 Q G I F H N A V F N S F R R F K S Q F L Y V L I L R E F I G T G G R T V T S I M N F C T A K L V

..... K ----- L E H R Y
 E K S K R K ----- N F A A Y E N D R
 E K S W K E L M F N I V S M P L H Y I D L L I F

"Cytochrome c₁-linked"-Protein:

Kartoffel
 Hefe S F S S L Y K T F F K R N A V F V G T I F A G A F V F Q T V F D
 Rind V A P T L T A R L Y S L L F R R T S T F A L T I V V G A L F F E R A F D

..... K R Y E ----- D I S V L G Q R P V -- D E E E
 T -- A I T S W Y E N H N K G K L W K D V K A R I A A G D G D D D D E
 Q G R D A I --- Y E H I N E G K L W K H I K H K Y E N K

Die 10 und 11 kd-Proteine

Die 10 kd-Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ist homolog zu den "Core-linked"-Proteinen aus Rind bzw. Hefe (Abb. 26, Tabelle 6). Für einen Bereich von 33 identifizierten Aminosäuren besteht eine Identität von 45 % bzw. 33 %. Der N-Terminus ist nicht blockiert. Soweit eine Auswertung möglich ist, weist das "Core-linked"-Protein der Kartoffel, analog zu den entsprechenden Proteinen aus Hefe und Rind, einen positiven Ladungsüberschuß auf (8+/1-). Das ermittelte Molekulargewicht des Proteins liegt vermutlich ebenfalls etwas niedriger als über SDS-PAGE abgeschätzt.

Die Cytochrom c Reduktasen aus Hefe und Rind weisen neben dem "Q-binding"-Protein, dem "Hinge"-Protein und dem "Core-linked"-Protein noch ein "Cytochrome c₁-linked"- und ein "FeS-linked"-Protein auf (siehe Einleitung). Das 11 kd-Protein der Kartoffel konnte jedoch auf der Basis der Aminosäuresequenz von zwei Peptiden (Abb. 18) keiner dieser beiden Untereinheiten mit Sicherheit zugeordnet werden. Eine begrenzte Homologie besteht zum C-Terminus der "Cytochrome c₁-linked"-Proteine (Abb. 26). Der N-Terminus des 11 kd-Proteins weist hingegen Ähnlichkeit mit dem N-Terminus des 10 kd-Proteins aus Kartoffel auf (siehe Abb. 18). Diese Tatsache beruht jedoch vermutlich auf einer Verunreinigung, da sich die 10 und 11 kd-Proteine über SDS-PAGE nur schwer auftrennen ließen. Für eine Identifizierung der 11 kd-Untereinheit aus Kartoffel sind somit weitere Aminosäuredaten erforderlich.

	Hefe	Rind	∅
"Q-binding"-Protein (75 AS)	30%	41%	36%
"Hinge"-Protein (44 AS)	43%	50%	47%
"Core-linked"-Prot. (33 AS)	33%	45%	39%
"Cyt c ₁ -linked"-Prot. (16 AS)	31%	19%	25%
∅	35%	39%	

Tabelle 6: Identitäten der 14, 12, 11 und 10 kd-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel mit den Untereinheiten des Proteinkomplexes aus Hefe und Rind. Die Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Aminosäuren ist in Klammern in Spalte 1 angegeben. Basis für die Berechnung ist das Alignment in Abb. 26.

3.5. MPP und PEP sind integrale Bestandteile der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel

Die auffälligste Besonderheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ist das Vorhandensein von drei Untereinheiten im Größenbereich von 50 kd. Sie reagieren alle mit Antikörpern, die gegen die Core-Proteine aus Pilzen gerichtet sind (siehe Abb. 13, Teil A). Es stellt sich jedoch die Frage, ob es sich bei diesen Komponenten wirklich um Core-Proteine handelt oder vielmehr um andere Vertreter der PEP/MPP/Core-Proteinfamilie.

3.5.1. Immunologische Identifizierung der Prozessierungsprotease als Bestandteil der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel

Die Proteine der isolierten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel wurden mit SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit Antikörpern, die gegen die Komponenten der Prozessierungs-Protease aus Hefe gerichtet sind, inkubiert. Das Serum gegen PEP reagiert deutlich mit den 53 und 55 kd-Untereinheiten (Abb. 27). Antikörper gegen MPP, die mit mitochondria-

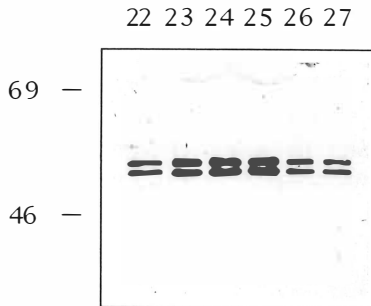


Abb. 27: Immunoblot der isolierten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel nach Inkubation mit Antikörpern, die gegen PEP aus Hefe gerichtet sind. Gleiche Volumina von sechs aufeinanderfolgenden Fraktionen des chromatographisch gereinigten Proteinkomplexes wurden über Elektrophorese in einem 13 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf Nitrozellulose gebロットet. Die Zahlen links geben die molekulare Größe von Standardproteinen an, die Zahlen oben bezeichnen die geladenen Fraktionen korrespondierend zu Abb. 10.

lem Gesamtprotein der Kartoffel nicht kreuzreagieren (siehe 3.1.1.), weisen eine schwache Spezifität für die 51 kd-Bande auf (nicht gezeigt). Demnach könnten in Kartoffel beide Untereinheiten der Prozessierungsprotease - MPP und PEP - Bestandteile der Cytochrom c Reduktase sein. Es sind jedoch andere Interpretationen denkbar, da wiederum eine Kreuzreaktion der Antikörper gegen die Prozessierungsprotease mit den Core-Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann.

3.5.2. Die drei Core-Proteine aus Kartoffel sind immunologisch unterscheidbar

Die Banden der 55 und 53 kd-Proteine erscheinen auf Coomassie-Gelen quantitativ etwas schwächer als die benachbarte 51 kd-Untereinheit (siehe 3.3.2.) und sind bei verschiedenen Sorten bzw. Geweben der Kartoffel von der Intensität her variabel (siehe 3.3.3.). Da die 55 und 53 kd-Banden überdies beide mit Antikörpern reagieren, die gegen PEP aus Hefe gerichtet sind (Abb. 27), ist nicht auszuschließen, daß es sich bei diesen Proteinen um alternative Isoformen derselben Untereinheit handelt.

Es wurde daher die immunologische Unterscheidbarkeit der Core-Proteine aus Kartoffel getestet. Die Herstellung der Seren erfolgte in Kaninchen (siehe Material und Methoden, 2.2.5.). Antikörper, die gegen die 53 kd-Untereinheit gerichtet sind, zeigen keinerlei Kreuzreaktion mit dem 55 kd-Protein (Abb. 28, Teil B). Auch ein Serum gegen das 51 kd-Protein erwies sich als monospezifisch (Abb. 28, Teil A). Die drei Core-Proteine sind also immunodistinguierbar und stellen vermutlich keine Isoformen dar. In der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel kommt demnach - verglichen mit dem Proteinkomplex aus Pilzen und Säugern - eine echte zusätzliche Untereinheit im 50 kd-Bereich vor.

3.5.3. Das 51 kd-Protein der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ist homolog zu MPP

Um eine Zuordnung der drei großen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel zu den Core-Proteinen bzw. den Komponenten der Prozessierungsprotease zu ermöglichen, wurden N-terminale und interne Aminosäuresequenzen der 55, 53 und 51 kd-Proteine analysiert (siehe Abb. 18). Die erhaltenen Sequenzdaten für das 51 kd-Protein weisen tatsächlich Homologie

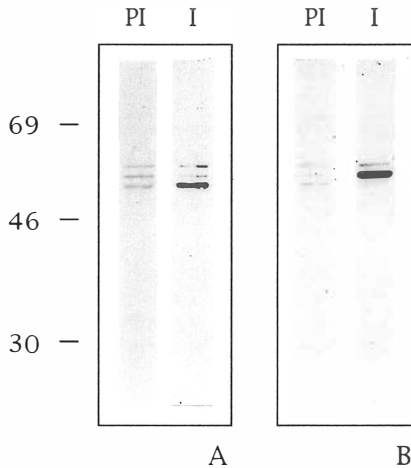


Abb. 28: Immunoblot der gereinigten Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel nach Inkubation mit Antikörpern, die gegen das 51 kd-Protein (A) und das 53 kd-Protein (B) gerichtet sind. Die Präimmunsereen (PI) zeigen keine Reaktion mit den aufgetrennten Untereinheiten des Proteinkomplexes, wohingegen die Immunsereen (I) jeweils das für die Immunisierung verwendete Protein erkennen. Der leichte Hintergrund auf allen Blots beruht auf einer Kreuzreaktion zwischen dem sekundären Antikörper, der für die Entwicklung der Immunreaktion Verwendung fand, und den geblotteten Proteinen. Die Zahlen links geben die Molekulargewichte von Standardproteinen an.

zu den MPP-Proteinen aus Hefe, *Neurospora* und Ratte auf (Abb. 29). Allerdings liegen die analysierten Peptide in unterdurchschnittlich konservierten Regionen der Protease-Untereinheit (nicht gezeigt). Oligonukleotide, die von einem hochkonservierten Zentrum der MPP-Proteine aus Pilzen abgeleitet sind, erlaubten jedoch die Isolation von Klonen des entsprechenden Proteins aus Kartoffel (Emmermann 1991). Die Sequenzen der Peptide sind im "open reading frame" (ORF) zu 100 % enthalten (Braun et al. 1992b).

Der N-Terminus des MPP aus Kartoffel konnte ansequenziert werden (S-S-S-A-A-V-A-..., siehe Abb. 29) und erlaubt im Vergleich zum ORF der cDNA-Sequenz die Definition der Leitsequenz.

<u>Kartoffel</u>	...	K	V	A	E	P	L	L	S	D	L	P	K	...
Hefe	...	E	L	T	E	K	Y	L	G	D	W	Q	S	...
<i>Neurospora</i>	...	K	L	A	E	K	Y	F	G	D	M	K	A	...
Ratte	...	E	C	A	R	K	Y	L	L	G	V	Q	P	...

<u>Kartoffel</u>	...	K	E	L	I	A	-	V	A	N	P	S	E	V	D	Q	V	Q	L	N	-	-	R	A	K	...
Hefe	...	Q	Q	M	Y	N	-	T	F	A	N	K	D	L	R	L	T	E	D	E	V	S	R	A	K	...
<i>Neurospora</i>	...	R	E	L	H	A	L	T	T	D	H	G	Y	S	A	L	G	E	L	E	V	S	R	A	K	...
Ratte	...	K	E	F	I	L	-	-	M	G	R	T	V	D	L	V	E	L	E	-	-	R	A	K	...	

<u>Kartoffel</u>	...	K	D	I	A	S	V	V	Q	K	L	I	S	S	P	L	T	M	A	...
Hefe	...	D	D	I	S	R	V	A	E	M	I	F	T	G	N	V	N	N	A	...
<i>Neurospora</i>	...	K	D	L	R	R	V	A	K	R	V	V	G	G	M	A	N	N	A	...
Ratte	...	E	D	I	K	R	V	A	S	K	M	L	R	G	K	P	A	V	A	...

Abb. 29: Alignment der Aminosäuresequenzen von Peptiden der 51 kd-Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel mit internen Sequenzbereichen der MPP-Proteine aus Hefe (Jensen und Yaffe 1988, Pollock et al. 1988), *Neurospora* (Schneider et al. 1990) und Ratte (Kleiber et al. 1990). Identische Aminosäuren sind eingerahmt. Zwischen Kartoffel und Ratte sind 35 % der Aminosäurereste konserviert, zwischen Kartoffel und Pilzen durchschnittlich 24 %.

3.5.4. Die 53 und 55 kd-Proteine der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel sind homolog zu PEP

Aminosäuredaten der 53 und 55 kd-Proteine der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel zeigen große Ähnlichkeit zu PEP-Sequenzen aus Hefe und *Neurospora*. Es wurden jeweils über 100 Aminosäurereste bestimmt (siehe Tabelle 5, Abb. 18). Die Identität der 55 und 53 kd-Proteine zu der Protease-Untereinheit aus *Neurospora* beträgt 64 bzw. 52 %, zu dem Enzym aus Hefe 49 bzw. 33 % (Abb. 30, Tabelle 7). Eine vergleichbare Homologie besteht auch zu dem Core-Protein I aus Rind, von dem ebenfalls eine PEP-Funktion angenommen wird (Gencic et al. 1991). Hingegen ist die Ähnlichkeit der 55 und 53 kd-Proteine aus Kartoffel zu dem von PEP verschiedenen Core-Protein I aus Hefe deutlich kleiner (Emmermann et al. 1993a).

Die Homologie der 55 und 53 kd-Proteine zueinander konnte über zwei Peptide abgeschätzt werden, die in analogen Regionen der Untereinheiten liegen (Abb. 30). Demzufolge beträgt die Identität etwa 50 %, weitere Sequenzdaten sind jedoch erforderlich, um eine abgesicherte Aussage zu erhalten. Auch die N-terminalen Bereiche der beiden Untereinheiten (15 Aminosäuren) gleichen

```

Kartoffel (55 kd)      [S][T][S]ITNPSQ[SSS]L[F]SPPPPD[A][M]IYDR[L].....
Neurospora          [M][A][SRR]L[ALNLAQGVKARAGG
Hefe                [M][F][SRT]A-----
Kartoffel (53 kd)   [S][A][S]AAVAAT[SSS]T[E]A.....

VINPFRRGLATPHSGTGIKTQTTLTKNGLTVASQYSPAQTSTVGMWIDAGSRAETDET
SKFRNTRRLSSTISSQIPGTRTSKLPNGLTIATIEYIPNTSSATVGI FVDAGSRAENVKNN
.....

.....[KR]P[IR]A[LE][E]E[IE]NMG[GH]LNAYTSRE[Q].....[K]AVDIL
GTAHFLEHLAFKGT[KR]T[Q]Q[LE]LEIEENMG[AH]LNAYTSREN[T]VYFAKALNEDV[FK][C]VDIL
GTAHFLEHLAFKGTQ[N][R][S][Q][G][I][E]LEIEEN[T]G[S]HLNAYTSREN[T]VYFAKSLQEDIP[K]AVDIL
.....[KR]T[S]?E

G[D]I[L]Q[N]S[L]L[E]E[.].K[Q]P[E]E[V]I[F]D[Q]L[H]T[T]A[E]Q[.].
Q[D]I[L]Q[N]S[K]L[E]E[S]A[I]E[R]E[R]D[V]I[L]R[E]S[E]E[V]E[K]Q[L]E[E]V[F]D[H]L[H]A[T]A[Y]Q[H]Q[P]L[G]R[T]I[L]G[P]R[E]N
[S][D]I[L]T[K][S][V]I[D]N[S]A[I]E[R]E[R]D[V]I[T]R[E]S[E]E[V]D[K]M[Y]D[E]V[F]D[H]L[H]E[I]T[Y]K[D]Q[P]L[G]R[T]I[L]G[P]I[K]N
.....[K]F[E]E[R]K[I]E[R]E[R]D[V]I[L]R[.].

IRDITRTELVN[Y]I[K]N[N]Y[T]A[DR]M[V]L[V]GAG[G]V[P]H[E]Q[L]V[E]M[A]D[K]Y[F][S][K]L[P]A[T]A[P]V[S][S]A[S]I[S]K
IKSITRTDL[K]D[Y]I[T]K[N]Y[K]G[D]R[M]V[L]A[G]A[G]A[V]D[H]E[K]L[V]Q[Y]A[Q]K[Y]F[G]H[V]P[K]S[E]S[P]V[L]G[S]P[R]G
.....[K]D[Y]I[S]T[H]Y[T]A[P]R[M]V[I]V[A]S[G]P[V]K...F[V]E[Q]V...[K]L[S]T[N]P[T]A[S]E[L]V[A]R[E]

.....K[H]M[G]
K[K]P[D]F[I]G[S]D[I]R[IR]D[D]T[P]T[A]N[I]A[I]A[V]E[G]V[S]W[S]D[D]D[Y]F[T]G[L]V[T]Q[A]I[V]G[N]Y[D]K[A]L[G]N[A]P[H]Q[G]
P[L]P[V]F[C]R[G]E[R]F[I]K[E]N[T]L[P]T[H]I[A]I[A]L[E]G[V]S[W]S[A]P[D]Y[F]V[A]L[A]T[Q]A[I]V[G]N[W]D[R]A[I]G[T]G[T]N[S]F
.....

[S]E[L]V[Q]R[V]A[I]N[E]L[A].
[S]K[L]S[G]F[V]H[K]H[D]L[A]T[S]F[M]S[F]S[T]S[Y]S[D]T[G]L[W]G[I]Y[L]V[T]D[K]L[D]R[V]D[D]L-V[H]F[S]L[R]E[W]T[R]L[C]S[N]-
[S]P[L]A[A]A[S]Q[N]G[S]L[A]N[S]Y[M]S[F]S[T]S[Y]A[D]S[G]L[W]G[M]Y[I]V[T]D[S]N[E]H[N]V[Q]L[I]V[N]E[I]L[K]E[W]K[R]I[K]S[G]K
.....

.....[K][S][L]M[L]H[I]D[G]S[G]P[T]A[E]D[.].
V[S]E[A]E[V]E[R]A[K]A[Q]L[K]A[S]I[L]L[S]L[D]G[T]T[A]V[A]E[D]I[G]R[Q]I[V]T[G]R[R]M[S]P[A]E[I]E[R]I[D]A[V]S[A]K[D]V[M]
I[S]D[A]E[V]N[R]A[K]A[Q]L[K]A[A]L[L]S[L]D[G]S[T]A[I]V[E]D[.].I[G]R[Q]V[V]T[T]G[K]R[L]S[P]E[E]V[F]E[Q]V[D]K[I]T[K]D[D]I
.....K

D[F]A[N]K[K]I[W]D[Q]D[I]A[S]A[V]G[S]I[E]G[L]F[D]Y]A[R]I[R]G[D]M[S]R[N]A[F]
M[W]A[N]Y[R]L[Q]N[K]E[V]S[M]V[A]L[G]N[T]S[T]V[P]N[V]S[Y]I[E]E[K]L[N]Q
R[V]A[N]R[F]I[F]D[Q]D[V]A[S]A[L]G[P]I]Q[T]L[P]D]Y[.].

```

Abb. 30: Alignment der Aminosäuresequenzen von Peptiden der 53 und 55 kd-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel mit den PEP-Proteinen aus *Neurospora* (Hawliczek et al. 1988) und Hefe (Witte et al. 1988). Sequenzbereiche, die von den analysierten Peptiden nicht abgedeckt werden, sind mit Punkten markiert. Identische Aminosäuren sind eingerahmt.

sich zu 50 % (Abb. 30). Der N-Terminus des 53 kd-Proteins hat außerdem Homologie zum 51 kd-Protein (MPP).

Von den Aminosäuredaten der PEP-Proteine aus Kartoffel wurden DNA-Oligonukleotide abgeleitet, die für die Isolation korrespondierender Klone aus einer cDNA-Bank der Kartoffel verwendet wurden (Emmermann et al. 1993a). Die Sequenzen der Peptide sind in den charakterisierten ORFs zu 100 % enthalten und erlauben darüber hinaus die Definition der Leitsequenzen.

		Hefe	<i>Neurospora</i>	∅
55 kd-Protein	(100 AS)	49%	63%	56%
53 kd-Protein	(91 AS)	33%	52%	43%
∅		41%	58%	

Tabelle 7: Prozentsatz von Aminosäuren, die zwischen den 55 und 53 kd-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel und den PEP-Proteinen aus Hefe und *Neurospora* konserviert sind. Die Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Aminosäuren ist in Klammern in Spalte 1 angegeben. Die Berechnung erfolgte auf der Basis des Alignments in Abb. 30.

3.5.5. Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ist eine Prozessierungsprotease

Angenommen beide Komponenten der Prozessierungsprotease, MPP und PEP, sind Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel, dann sollte der isolierte Proteinkomplex eine spezifische proteolytische Aktivität aufweisen. Gereinigte Cytochrom c Reduktase sowie mitochondriales Gesamtprotein wurden daher in einem *in vitro* Prozessierungs-Assay getestet*. Als Substrat dienten verschiedene Vorläufer-Proteine, die über ³⁵S-Methionin radioaktiv markiert wurden. Prozessierungsaktivität, d.h. definierte Verkürzungen der Vorläufer-Proteine, wurden mit SDS-PAGE und anschließender Fluorographie sichtbar gemacht.

Die isolierte Cytochrom c Reduktase erwies sich als hochspezifische Protease. Unter den verwendeten Versuchsbedingungen führen 0,5 µg gereinigter En-

* durchgeführt von M. Emmermann

zymkomplex zur Reifung von 50 % der radioaktiv markierten Precursor der β -Untereinheit der ATP-Synthase, wohingegen für das gleiche Resultat 20 μg mitochondriales Gesamtprotein erforderlich sind (Abb. 31). Die Prozessierungsaktivität ist demnach etwa 40 fach aufgereinigt. Dieses Resultat entspricht dem Aufreinigungsfaktor für spektroskopisch meßbares Häm b, das in Fraktionen der gereinigten Cytochrom c Reduktase bezogen auf mitochondriales Gesamtprotein um den Faktor 38 angereichert vorliegt (siehe 3.2.5.). Es ist also davon auszugehen, daß die gesamte Aktivität der mitochondrialen Haupt-Prozessierungsprotease der Kartoffel in die Cytochrom c Reduktase integriert ist.

Die proteolytische Aktivität der gereinigten Cytochrom c Reduktase ist PMSF sensitiv und wird analog zu den Aktivitäten aus Pilzen und Säugern durch EDTA und o-Phenanthrolin gehemmt. Sie hat ein pH-Optimum zwischen 7,5 und 9,0 und ein Temperaturoptimum um 30°C (Emmermann und Schmitz 1993).

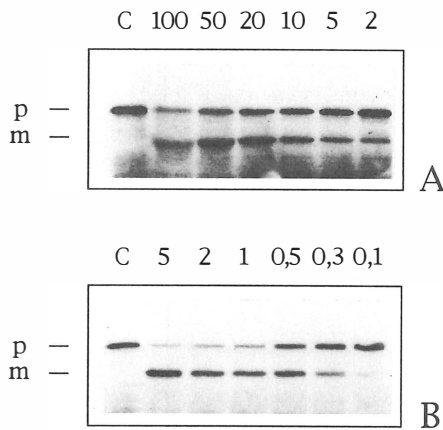


Abb. 31: Prozessierungsaktivität von mitochondrialem Gesamtprotein (A) und isolierter Cytochrom c Reduktase (B) aus Kartoffel. Radioaktiv markiertes Vorläufer-Protein der β -Untereinheit der ATP-Synthase wurde mit den Proteinfractionen inkubiert und anschließend über SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Ein Teil des Precursors (p) wird zur reifen Form (m) prozessiert (56 \rightarrow 52 kd). Die Zahlen oben geben die Menge des in den Prozessierungsexperimenten eingesetzten Proteins an (in μg). Spur 1: Kontrolle.

3.5.6. Destabilisierungen der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel: Abspaltung der MPP-Untereinheit

Die Prozessierungsprotease könnte einen integralen Bestandteil der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel darstellen oder aber nur locker an den Proteinkomplex gebunden sein. Auf jeden Fall dissoziieren die MPP- und PEP-Untereinheiten während der Präparation schwerer als das Eisen-Schwefel-Protein vom Cytochrom c Reduktase-Komplex (Abb. 32, siehe auch 3.3.3. und 3.4.3.). Es wurde versucht, weitere Untereinheiten des Proteinkomplexes durch gezielte Destabilisierungen abzulösen. Geeignete Konditionen sind für die Cytochrom c Reduktasen aus Rind und *Neurospora* bekannt (Rieske und Zaugg 1962, Rieske et al. 1967, Schägger et al. 1986, Linke und Weiss 1986).

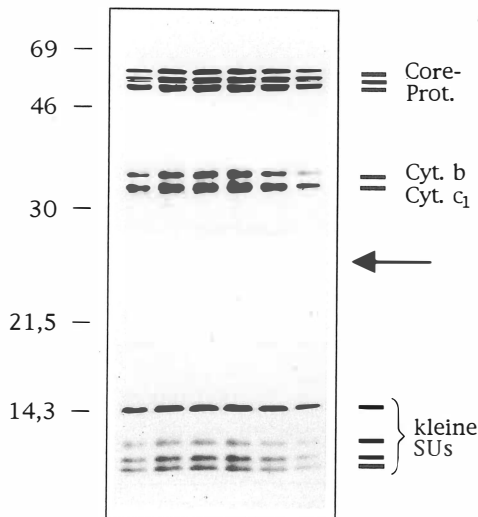


Abb. 32: Dissoziation des Eisen-Schwefel-Proteins der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel. SDS-PAGE von sechs aufeinanderfolgenden Fraktionen des chromatographisch aufgereinigten Proteinkomplexes. Die Zahlen links geben die molekularen Größen von Standardproteinen an; rechts stehen Bezeichnungen für die Untereinheiten des Proteinkomplexes. Der Pfeil markiert die Position der dissoziierten Untereinheit.

Die Spaltungsexperimente wurden mit jeweils 1,5 mg Cytochrom c Reduktase in Gegenwart von Triton X-100 sowie variablen Mengen verschiedener Salze (NaCl, NaBr, NaJ, Harnstoff, Guanidiniumhydrochlorid [GuHCl]) durchgeführt (siehe Material und Methoden, 2.5.3.). Die Auftrennung der Spaltprodukte erfolgte über Gelfiltrationschromatographie und die anschließende Analyse über SDS-PAGE. Den Spaltungsansätzen wurde außerdem EDTA zugegeben, um potentielle Metall-Kofaktoren der Protease-Untereinheiten wegzufangen. Es zeigte sich jedoch, daß zweiwertige Metall-Ionen keine Bindungs- oder Stabilisierungsfunktionen für den Cytochrom c Reduktase-Komplex haben (nicht gezeigt).

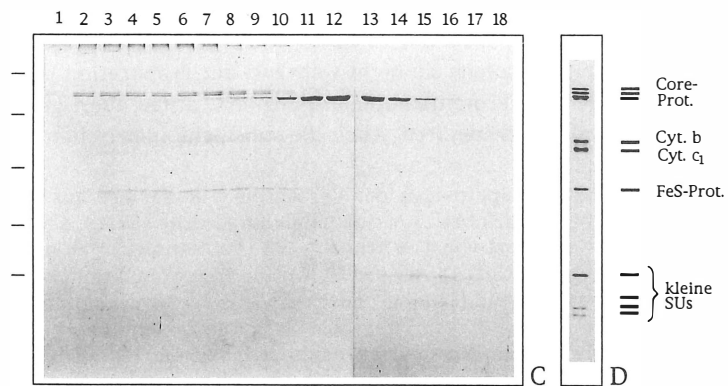
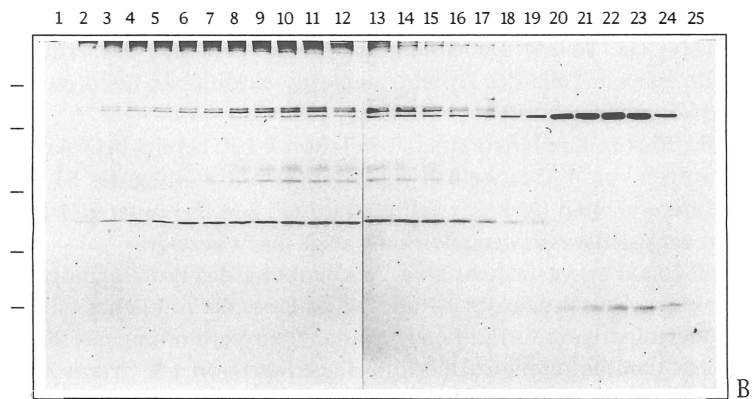
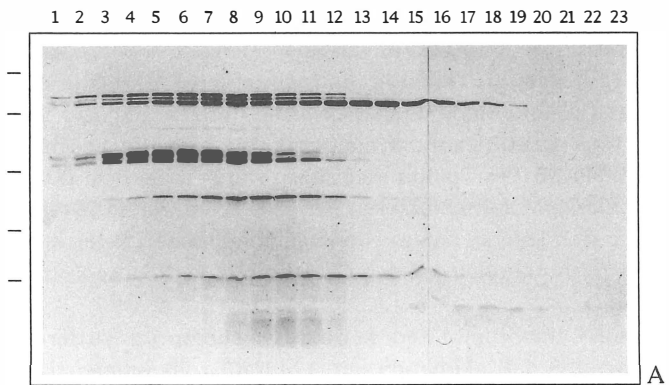
Im Gegensatz zur Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora* ist der Proteinkomplex aus Kartoffel bei Inkubation mit 2 M NaCl vollkommen stabil. Erst in Gegenwart von 2 % Triton X-100 und Inkubationstemperaturen von über 30 °C erfolgt eine teilweise Abspaltung der 51 (MPP), 14 und 12 kd-Untereinheiten (Abb. 33, Teil A). Dabei könnten Phasenübergänge des Triton X-100 eine Rolle spielen. Teile des Proteinkomplexes verklumpen bei diesen Ansätzen und können abzentrifugiert werden.

2 M NaBr führt in Kombination mit 1 % Triton X-100 bereits bei Inkubationstemperaturen von 4 °C zu beinahe vollständiger Abtrennung der 51, 14, und 12 kd-Untereinheiten (Abb. 33, Teil B), während 2 M NaJ unter gleichen Bedingungen vergleichsweise wenig Wirkung zeigt (nicht gezeigt).

Harnstoff (bis 6 M) verursacht eine Verklumpung des Proteinkomplexes bei gleichzeitiger Abspaltung der 14 und 12 kd-Proteine. Ähnliches gilt für 2 M GuHCl oder niedrigere GuHCl-Konzentrationen in Verbindung mit Einfrieren. 0,8-1,0 M Guanidiniumhydrochlorid in Gegenwart von 1 % Triton X-100 bewirkt dagegen bei 4 °C eine vollständige Spaltung der Cytochrom c Reduktase in separate 51, 14 und 12 kd-Untereinheiten sowie einen weitgehend verklumpten Restkomplex (Abb. 33, Teil C).

Die FeS-Untereinheit ist, sofern sie nicht während der Präparation der Cytochrom c Reduktase vom Proteinkomplex dissoziiert, unter allen getesteten Bedingungen ein stabiler Bestandteil. Auch die substöchiometrischen 50 und

Abb. 33 (folgende Seite): Spaltungen der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel mit 2 M NaCl (A), 2 M NaBr (B) bzw. 1 M Guanidiniumhydrochlorid (C). Die Inkubationen erfolgten in Gegenwart von 1 % Triton X-100 (NaCl-Ansatz: 2 %) und 5 mM EDTA für 5 Minuten bei 4 °C (NaCl-Ansatz: 30 °C). Die Spaltprodukte wurden über Gelfiltration aufgetrennt (siehe Material und Methoden, 2.5.3.) und mit SDS-PAGE analysiert. (D): ungespaltene Cytochrom c Reduktase. Die Zahlen oben bezeichnen aufeinanderfolgende Fraktionen der chromatographischen Trennungen, die Striche links geben die molekularen Größen von Standardproteinen an (von oben nach unten: 69, 46, 30, 21,5, und 14,3 kd).



42 kd-Proteine lassen sich nicht abspalten. Falls sie Degradationsprodukte oder Isoformen der großen Untereinheiten darstellen sollten, sprechen die Ergebnisse aus den Destabilisierungsexperimenten am ehesten für einen Bezug dieser Proteine zu den PEP-Komponenten des Cytochrom c Reduktase-Komplexes (siehe jedoch 3.3.2.).

Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel erweist sich als ausgesprochen stabil. Die proteolytisch aktiven Komponenten scheinen somit integrale Bestandteile des Proteinkomplexes darzustellen. Das Herauslösen der MPP-Untereinheit ist nur bei gleichzeitiger Verklumpung des verbleibenden Restkomplexes möglich. Für Prozessierungsexperimente waren die Spaltprodukte nicht weiter verwendbar.

3.6. Die Cytochrom c Reduktase aus Weizen

Stellt die Bifunktionalität der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel eine Ausnahme dar, oder ist die Integration der Prozessierungsprotease in den respiratorischen Proteinkomplex ein Phänomen, das für alle Mitochondrien höherer Pflanzen Geltung besitzt? Für die Analyse einer zweiten Pflanze wurde als Vertreter der Klasse der Monokotyledoneae *Triticum aestivum* (Weizen) ausgewählt.

3.6.1. Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus Weizenkeimlingen

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung der Cytochrom c Reduktase aus Weizen wurden etiolierte Keimlinge verwendet (siehe Material und Methoden, 2.3.2.). Die Präparation der Mitochondrien erfolgte über differentielle Zentrifugation und Dichtegradientenzentrifugation. 10 kg Weizenkeimlinge ergeben etwa 7,5 g gereinigte Mitochondrien, das sind ca. 750 mg mitochondriales Protein. Die Organellen wurden mit Ultraschall aufgeschlossen, über Ultrazentrifugation subfraktioniert und die mitochondrialen Membranproteine mit Hilfe von Triton X-100 solubilisiert. Die Reinigung der Cytochrom c Reduktase erfolgte über Cytochrom c Affinitätschromatographie und Gelfiltrationschromatographie analog dem Protokoll für die Isolierung des Enzymkomplexes aus Kartoffel.

Alternativ wurde Weizenkeimextrakt als Ausgangsmaterial für die Reinigung der Cytochrom c Reduktase verwendet. Die Präparation einer Fraktion mit

mitochondrialen Membranen erfolgte nach der Methode von Pfeiffer et al. (1990). Die Membranproteine wurden ebenfalls mit Triton X-100 solubilisiert und der Proteinkomplex über Säulenchromatographie wie oben angegeben aufgereinigt.

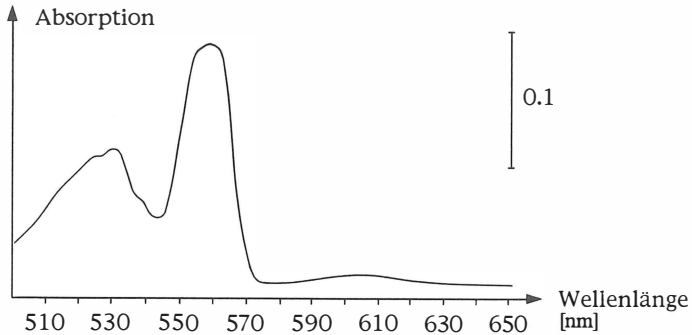


Abb. 34: Reduktionsspektrum der gereinigten Cytochrom c Reduktase aus Weizen. Das Spektrum wurde bei Zimmertemperatur und in Gegenwart von Triton X-100 aufgenommen.

Cytochrom c Reduktase aus Weizen bindet spezifisch an die Cytochrom c Affinitätssäule und eluiert in Gegenwart von NaAscorbat bei einer Tris-Acetat Konzentration von 100 mM. Die weitere Aufreinigung erfolgte über Gelfiltrationschromatographie. Das Eluat der Säule wurde über SDS-PAGE analysiert und spektrophotometrisch vermessen. Von der Komposition her ähnelt der isolierte Proteinkomplex der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel (siehe Abb. 35). Cytochrom b wurde bezogen auf mitochondriales Protein ca. 40 fach aufgereinigt. Die Ausbeute betrug jedoch lediglich 10 % - deutlich weniger als bei der analogen Enzymisolierung aus den Mitochondrien der Kartoffel (24 %). Enzympräparationen mit Weizenkeimextrakt als Ausgangsmaterial führten zu keinem verbesserten Ergebnis. Die Isolationsmethode für den Cytochrom c Reduktase-Komplex aus Kartoffel lässt sich demnach auf Weizen übertragen, allerdings ist die Ausbeute dabei reduziert.

3.6.2. Charakterisierung der isolierten Cytochrom c Reduktase

Das Reduktionsspektrum der isolierten Cytochrom c Reduktase weist zwischen 500 und 650 nm die charakteristischen α -Banden der Cytochrome b und c_1 auf (Abb. 34). Die Maxima liegen bei 553 bzw. 557 und 562 nm. Eine Kontamination durch Cytochrom c Oxidase ist nicht sichtbar, da die α -Bande für Cytochrom a bei 600 nm praktisch fehlt.

Eine Analyse der gelelektrophoretisch aufgetrennten Untereinheiten der isolierten Cytochrom c Reduktase aus Weizen über Coomassie-Färbung und Immunoblotting (Abb. 35 und 36) ergibt 10-11 Proteine, die von der Affini-

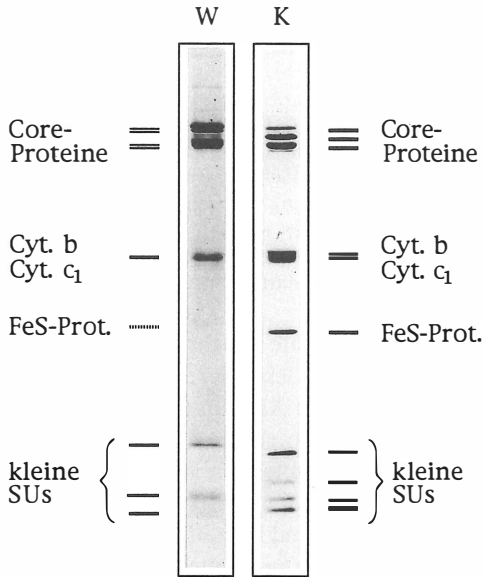


Abb. 35: Vergleich der Komposition der Cytochrom c Reduktasen aus Weizen (W) und Kartoffel (K). Die Untereinheiten der gereinigten Proteinkomplexe wurden über Elektrophorese in einem 12 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die Bezeichnungen rechts und links geben die Identitäten der Banden an (siehe Abb. 36). Bei der verwendeten Polyacrylamidkonzentration laufen die Cytochrome b und c_1 auf einer Höhe (siehe 3.3.2.). Das Eisen-Schwefel-Protein der Cytochrom c Reduktase aus Weizen ist abgespalten (gepunktete Linie).

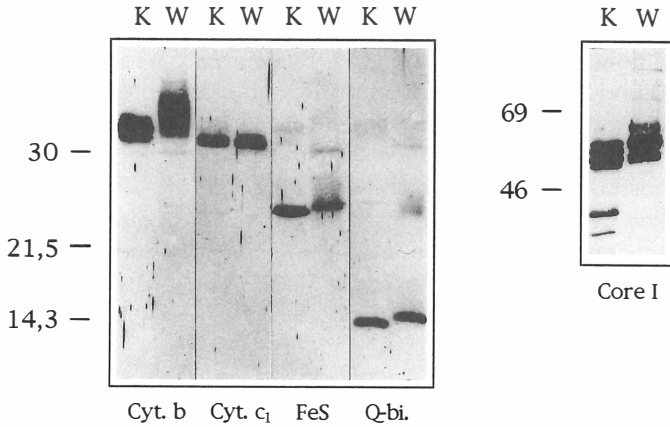


Abb. 36: Immunoblot der isolierten Cytochrom c Reduktasen aus Weizen (W) und Kartoffel (K) nach Inkubation mit Antikörpern, die gegen Cytochrom b und Cytochrom c₁ aus Hefe, gegen das Eisen-Schwefel-Protein und das Core-Protein 1 aus *Neurospora* und gegen das "Q-binding"-Protein aus Kartoffel gerichtet sind. Die Untereinheiten der Proteinkomplexe wurden über Elektrophorese in 13 %igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und auf Nitrozellulose geblottet. Die Zahlen links geben die molekularen Größen von Standardproteinen an.

tätssäule und der Gelfiltrationssäule synchron eluieren. Ihr apparentes Molekulargewicht liegt auf 13 %igen Gelen bei 55.5, 55.0, 51.5, 51.0, 34, 33, 25, 14, 11 und 9 kd. Verglichen mit Kartoffel kommt somit eine zusätzliche Bande im 50 kd-Bereich vor, wohingegen eine kleine Untereinheit fehlt. Bei dem 11 kd-Protein handelt es sich jedoch vermutlich um eine Doppelbande (nicht gezeigt). Antikörper gerichtet gegen Komponenten der Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora*, Hefe und Kartoffel erkennen einzelne Banden des Proteinkomplexes aus Weizen und ermöglichen eine Identifizierung der Untereinheiten. Die vier großen Proteine gehören erwartungsgemäß zu der Familie der Core-Proteine und die 34, 33 und 25 kd-Banden entsprechen den respiratorischen Untereinheiten Cytochrom b, Cytochrom c₁ und dem Eisen-Schwefel-Protein. Das FeS-Protein neigt - wie bei anderen Organismen - zur Dissoziation vom Proteinkomplex und ist auf dem Coomassie-Gel (Abb. 35) kaum sichtbar, läßt sich aber über Antikörper klar nachweisen (Abb. 36). Auch die Cytochrom b-Bande, die relativ diffus ist und auf 11 %igen Gelen

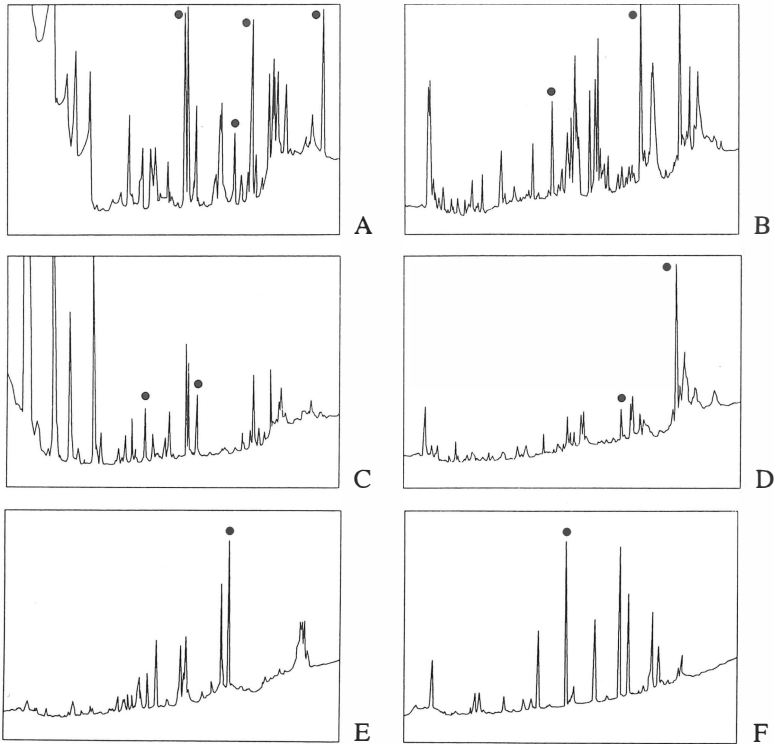


Abb. 37: HPLC-Auftrennungen der Lys-C generierten Peptide von 6 Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen. A: 55.5 kd-Protein, B: 51.5 kd-Protein, C: 55.0 kd-Protein, D: 51.0 kd-Protein, E: Cytochrom c_1 , F: "Q-binding"-Protein. Die Elution der Peptide wurde bei 220 nm aufgezeichnet. Sie erfolgte über einen Gradienten aus Wasser und Acetonitril (linker Rand der Diagramme: 10 % Acetonitril, rechter Rand der Diagramme: 70 %). Die Punkte markieren Peptide, deren Aminosäuresequenz bestimmt wurde (siehe Abb. 38).

mit Cytochrom c_1 zusammenfällt, war immunologisch leichter visualisierbar als über Coomassie-Färbung. Das 14 kd-Protein kreuzreagierte mit einem Antiserum, das gegen das "Q-binding"-Protein der Kartoffel gerichtet ist (Abb. 36).

Bei den vier hochmolekularen Banden könnte es sich um vier verschiedene Proteine der PEP/MPP/Core-Familie handeln, oder aber lediglich um zwei Untereinheiten, die in jeweils zwei Isoformen vorkommen. Für eine genaue Zu-

55.5 kd-Prot. N A S T A V A A G P G A I A P D A P A V D A P V M A Y ? R ...
P1 (K) L E D N R I E R E R G V I L R E M E E V Q G Q S E E V I ...
P2 (K) S L P D Y N W F R R R T Y M L R Y ...
P3 (K) D P G L F G V Y A ...
P4 (K) D V P R A M N V L A D I L Q N S K

55.0 kd-Prot. N A S T A V A A G ? ? A I A P D ...
P1 (K) S L P D Y N G F R R R T Y M L R Y ...
P2 (K) N L I D Y I Q K

51.5 kd-Prot. N A S T A V A Q R P T G G F ...
P1 (K) A S A N R E L M S Y S Y G A L K
P2 (K) S V Y V G G E Y R R A A D D S N T D L A L A F E L P ...

51.0 kd-Prot. N A S T ? V A ...
P1 (K) I I S S P L T L A ? S G D V I G V P ...
P2 (K) S Y A P E M V E V L V D F V R N ...

Cyt. c₁ N D E A E ? G L ...
P1 (K) A R H D G Q N Y V F A L L T G Y ? ? D ...

14 kd-Prot. P1 (K) H Q Y L P D D V R A L Q Q P F K

Abb. 38: Aminosäuresequenzen von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen. Es wurden N-terminale Sequenzen der unverdauten Proteine (N) und von einzelnen Peptiden (P1, P2,...) ermittelt. Als Aminosäure unmittelbar vor dem N-Terminus von Peptiden wird Lysin angenommen; das C-terminale Lysin vollständig sequenzierter Peptide ist unterstrichen.

ordnung, wurden Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen N-terminal ansequenziert. Die Aminosäuredaten erlaubten jedoch keine zweifelsfreie Identifizierung, da die aminoterminalen Regionen der Core-Proteine aus Weizen und Kartoffel vergleichsweise wenig konserviert sind (nicht gezeigt).

Um interne Aminosäuredaten der vier großen Banden der Cytochrom c Reduktase aus Weizen zu erhalten, wurden 3 mg gereinigter Proteinkomplex über SDS-PAGE aufgetrennt und auf PVDF-Membranfilter transferiert (siehe Material und Methoden, 2.2.4.). Es folgte eine Verdauung der einzelnen Untereinheiten mit der Endoprotease Lys C und die Auftrennung generierter Peptide über HPLC (Abb. 37). Die Elutionsprofile der fragmentierten 55.5 und 55.0 kd-Banden waren dabei ähnlich - ein Hinweis, daß es sich bei diesen Proteinen um Isoformen derselben Untereinheit handeln könnte. Das gleiche gilt für die 51.5 und 51.0 kd-Komponenten.

Untereinheit	N-Terminus	Anz. d. sequenzierten Peptide	Anzahl der ermittelten AS
55.5 kd-Prot.	+	4	102
55.0 kd-Prot.	+	2	40
51.5 kd-Prot.	+	2	57
51.0 kd-Prot.	+	2	40
Cyt. b		-	-
Cyt. c ₁	+	1	24
FeS-Prot.		-	-
14 kd-Prot.		1	17
11 kd-Prot.		-	-
9 kd-Prot.		-	-
gesamt	5	12	280

Tabelle 8: Zusammenfassende Darstellung der Aminosäuresequenzierungen für die Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen.

Die erhaltenen internen Aminosäuredaten für die Cytochrom c Reduktase aus Weizen sind in Abb. 38 und Tabelle 8 zusammengefaßt. Sie erlauben eine eindeutige Zuordnung der 55.5 und 55.0 kd-Proteine zu den PEP-Untereinheiten aus Kartoffel. Die Identität liegt bei etwa 70 % (Abb. 39, Tabelle 9). Die 55.5 und 55.0 kd-Proteine weisen auch untereinander große Ähnlichkeit auf: Aminosäuresequenzen der C-terminalen Peptide der beiden Untereinheiten sind nur in einer Position verschieden (siehe Abb. 43). Es handelt sich demnach vermutlich um zwei Isoformen, die sich auf der Basis der vorhandenen Daten jedoch vorerst nicht den einzelnen Formen für PEP aus Kartoffel zuordnen lassen (siehe Tabelle 9).

Die Sequenzen der 51.5 und 51.0 kd-Banden sind beide homolog zu MPP. Über 44 bzw. 35 Aminosäuren bestehen knapp 70 % Identität zu der Protease-Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel (Abb. 39, Tabelle 9). Bei diesen Proteinen handelt es sich vermutlich ebenfalls um Isoformen. Eine Aussage über ihre Ähnlichkeit ist jedoch nicht möglich, da keine Ami-

Abb. 39 (folgende Seite): Alignment der Aminosäuresequenzen von Peptiden der 55.5, 55.0, 51.5 und 51.0 kd-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen mit MPP und PEP aus Kartoffel (aus Braun et al. 1992b, Emmermann et al. 1993a). Sequenzbereiche, die von den analysierten Peptiden nicht abgedeckt werden, sind mit Punkten markiert. Identische Aminosäurereste sind eingerahmt. Der Pfeil markiert die Schnittstelle der Vorläufer-Proteine aus Kartoffel.

↓

```

Haizan 55.5 kd-P. .... A S T A V A A G --- P G A T A P D A
Haizan 55.0 kd-P. .... A S T A V A A G --- ? A I A P D ?
Kartoffel PEP I MATRHLLNLTTRRRSRITPFVLPCCITFSSRS $ T S I T N P S Q S S S I P --- S P P P
Kartoffel PEP II M T I R Q L L T I A R R S R N L T T S H S L R --- R L Y S A S A A V A A T S S S T P - A I G P P P
Kartoffel MPP M Y - R C A S S R L S S L K A R Q G N R V L T --- R F S S S A A V A T K --- P S G G L F S -
Haizan 51.5 kd-P. .... A S T A V A A Q R --- P T G G - F ?
Haizan 51.0 kd-P. .... A S T ? V A ? ? . . . . .

```

```

P A V D A P V M A Y ? P . . . . . R N I I D Y I Q K . . . . .
P - - D A - - M I Y D R L A E Q V K S I K R L E D P N Q R F L R Y - N S P D P T V A D H T S I L S A P E T K V T T L P N G L R I A T E S N L S S Q T
P - - D A - - M I Y D R L A E D V K K I K R L E N P D S R F L Q H L Q L T T P N F S R P H I N P Q L S L L R G V T T L P S G L R V G H G D N L A V K T
----- W I T G D T S S S V T P L D F P L N D V K L S P P L P D Y V E P A K T Q I T T L A N G L K V A E A S V - N P A
-----

```

```

. . . . . K D V P R A
A T V G V M I D A G S R F E T E E N N G V A H F L E H M I F K G T E K R P I R A L E E E I E N M G G H L N A Y T S R E Q T A Y T F A K V I G C D V P K A
A T V G V F I D A G S R F E D T E T N G T A H F L E H M I F K G T E K R T S W E M E E E I E N M G G H L N A Y T S R E Q T A Y Y A K V L D N D V P A
A S I G L Y V D C G S I Y E T P A S Y G A T H L L E R M A F K S T L N R S H L R I V R E I A I G G N V T A S A S R E H M I Y T Y P A L K T Y V P Q M
----- K A S A N R E J M S Y S Y G A L L K . . . . . K S Y A P E M
-----

```

```

M N V L A D I L Q N S K L E D N R I E R E R Q V I L R E M E E V Q G G S E E V I . . . . .
V D I I G D I L Q N S L L E E D K T I R E R S V I L R E M E E V E K Q P E E V I F D Q L H T T A F Q Y T P L G R T I L G P A Q N I E K M T R A H I Q D
L D I L A D I L Q N S K F E R K I E R E R D V I L R E M E E V E G Q T E E V I F D H L H S T A F Q Y S P L G R T I L G P A Q N I K T I T R S H L K D
V E M L A D C V R N P A F L D W E V K E Q L E K V K A E I S E Y S K N P Q H L L E A V H S - A G Y A G P Y G N S L M A T E A T I N R L N S T V L E E
-----
V E V I V D F V R N . . . . .
-----

```

```

Y I S T H Y G A H R M V I S A A G A V K H E E V V E L V K K H F T K L S S M P I I T T S Q L V S E E P A I F T G S E I R I R I D D L P L A Q F A V A F
Y I S T H Y T A P R M V I V A S G P V K H E E F V E Q V K K Q F T K L S T N P - T T A S E L V A R E P A I F T G S E V R V I D D D I P L A Q F A V A F
F V A E N Y T A P R M V L - A A S G V E H E E F L K V A E P L L S D L P K V A - - T I E E P K - - P V Y V G G - D Y R C Q A D A E M T H - F A L A F
----- K S - - V Y V G G - E Y R R A D D S M T D - L A L A F
-----

```

```

. . . . . K D P G I F G V Y A . . . . .
- S G A S W T D P D S I A L M V M Q M L G S W N K - S S G G - G K H M G S E L V Q R V A I N E L A E S V M A - F N T N Y K D T G L F G V Y A E A K P
- Q G A P W T D P D A I P L M V M Q S M L G T W N K - N A G G - G K H M G S D L A Q S V A I N E L A E S M M S - F N T N Y K D T G L F G V Y A V A K S
P V P G M S E K E S M T L T V L Q L M G G G S F S A G G P G K G M Y S R L Y L R V L N Q Y P I H A F S A F S S I Y N N T G L F G T Q G T S S
E L P . . . . .
-----

```

```

D C L S D L A Y V I M N G I C K L S Y K V S D A D V V - - - R A R N O L K S S L M L H I D G S G P T A E D I G R Q L I T Y G R R I P Y A E L F S R I D
D C L S D L S Y C I M R E I S K L C Y R V S D A D V T - - - H A C N O L K S S L M L H I D G T S P V A E D I G R H V L T Y G R R I P V T E L F A R V D
D F G P Q A V D V A V K E L I A V A N P - S E V D Q V Q L N R A K Q A T K S A I L M N L E S R M V A S E D I G R Q L L T Y G E R N P V E H F L K A I D
-----

```

```

. . . . . K S L P D Y N W F R R R T Y M L R Y
. . . . . K S L P D Y N G F R R R T Y M L R Y
S V D T G T I K R V R N R F T P D R D V A I S A R G P I Q D L P D Y N W F R R R T Y M L R Y
A V D A S T I K R V A N R F I F D Q D V A I S A L G P I Q T L P D Y N W F R R R T F M L R Y
A V S A K D I A S V V Q R I S S P L T M A S Y - G D V I S L E S Y D A V S S N - F R S K
-----
K I I S S P L T L A S ? - G D V I G V P . . . . .
-----

```

		MPP	PEP I	PEP II
55.5 kd-Protein	(74 AS)	20%	76%	78%
55.0 kd-Protein	(27 AS)	15%	67%	63%
51.5 kd-Protein	(44 AS)	66%	32%	27%
51.0 kd-Protein	(35 AS)	69%	26%	23%

Tabelle 9: Prozentsatz von Aminosäuren, die zwischen den 55.5, 55.0, 51.5 und 51.0 kd-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen und PEP und MPP aus Kartoffel identisch sind. Die Anzahl der in die Auswertung eingegangenen Aminosäuren ist in Klammern in Spalte 1 angegeben. Die Berechnung erfolgte auf der Basis des Alignments in Abb. 40.

nosäuresequenzen aus analogen Regionen vorliegen.

Auch für andere Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen wurden Aminosäuresequenzen ermittelt. Sie lassen sich in allen Fällen den Sequenzen der entsprechenden Untereinheiten aus anderen Organismen zuordnen (Abb. 40).

Cytochrom c₁ (P1):

<u>Weizen</u>	...	K	A	R	H	D	G	Q	N	Y	V	F	A	L	L	T	G	Y	?	D	...
Kartoffel	...	K	A	R	H	N	G	Q	N	Y	V	F	A	L	L	T	G	Y	R	D	...
Hefe	...	K	A	R	H	G	C	D	Y	I	F	S	L	L	T	G	Y	P	D	...	
Rind	...	R	A	R	H	G	E	D	Y	V	F	S	L	L	T	G	Y	C	E	...	

"Q-binding"-Protein (P1):

<u>Weizen</u>	...	K	H	Q	Y	L	P	D	D	V	R	A	L	Q	Q	P	F	K	...
Kartoffel	...	K	H	Q	?	L	P	E	D	L	Q	A	M	Q	T	P	?	?	...
Hefe	...	R	Q	Q	I	L	P	K	E	Q	W	T	K	Y	E	E	D	K	...
Rind	...	T	H	H	L	L	P	R	N	Q	W	I	K	A	Q	E	D	V	...

Abb. 40: Alignment der Aminosäuresequenzen von Peptiden der Cytochrom c₁- und "Q-binding"-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen mit den entsprechenden Sequenzbereichen der Proteine aus Kartoffel, Hefe und Rind (für Referenzen siehe Braun et al. 1992a und Legende zu Abb. 26). Identische Aminosäurereste sind eingerahmt.

3.6.3. Die Cytochrom c Reduktase aus Weizen ist eine Prozessierungsprotease

Die isolierte Cytochrom c Reduktase wurde *in vitro* als Prozessierungsprotease getestet. Auch der gereinigte Enzymkomplex aus Weizen ist in der Lage, die Leitsequenzen von radioaktiv markierten Vorläufer-Proteinen spezifisch abzutrennen (Abb. 41, Teil B). Die Aktivität ist EDTA-hemmbar. Damit stellt die Bifunktionalität der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel keine Ausnahme dar, sondern scheint ein allgemeines Phänomen in den Mitochondrien höherer Pflanzen zu sein. Bei allen Pilzen und Säugern, die diesbezüglich untersucht wurden, sind Ubiquinol-Cytochrom c-Oxidoreduktase und Prozessierungsprotease hingegen separate Aktivitäten, die überdies in verschiedenen mitochondrialen Subkompartimenten lokalisiert sind.

Um mit Sicherheit auszuschließen, daß kein experimentell bedingtes Resultat vorliegt, wurde der Cytochrom c Reduktase-Komplex aus den Mitochondrien von vier verschiedenen Organismen über eine identische Isolationsmethode (Cytochrom c-Affinitätschromatographie) aufgereinigt und auf Prozessierungsaktivität untersucht* (Abb. 41). Dabei bestätigte sich, daß die Proteinkomplexe aus Hefe und *Neurospora* keinerlei Prozessierungsaktivität aufweisen. Die Bifunktionalität der Cytochrom c Reduktase ist somit ein Charakteristikum der Mitochondrien höherer Pflanzen.

* Der Prozessierungs-Assay wurde von M. Emmermann durchgeführt.

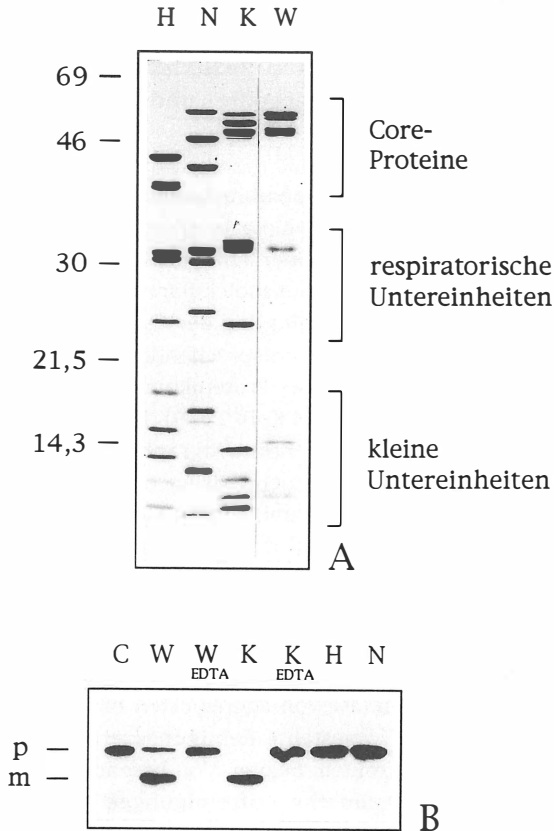


Abb. 41: Gelelektrophoretische und physiologische Analyse der Cytochrom c Reduktasen aus Hefe (H), *Neurospora* (N), Kartoffel (K), und Weizen (W). Die Aufreinigung aller Proteinkomplexe erfolgte über Cytochrom c-Affinitätschromatographie und Gelfiltration. A: Auftrennung der Untereinheiten der verschiedenen Cytochrom c Reduktasen über Elektrophorese in einem 12 %igen Polyacrylamidgel. Die Zahlen links geben die molekulare Größe von Standardproteinen an, rechts stehen Bezeichnungen für die Untereinheiten der Proteinkomplexe. B: Prozessierungsaktivität der gereinigten Cytochrom c Reduktasen. Radioaktivmarkiertes Vorläufer-Protein der β -Untereinheit der ATP-Synthase wurde mit gleichen Mengen der verschiedenen Enzymkomplexe inkubiert und anschließend über SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Proteinkomplexe aus Pflanzen prozessieren den Precursor (p) zur reifen Form (m). Die Prozessierungsaktivität läßt sich durch 1 mM EDTA hemmen (Spuren 3 und 5). Spur 1: Kontrolle.

4. DISKUSSION

4.1. Reinigung der Cytochrom c Reduktase höherer Pflanzen über Affinitätschromatographie und Gelfiltrationschromatographie

In der Atmungskette überträgt der membrangebundene Cytochrom c Reduktase-Komplex Elektronen auf das lösliche Intermembranraum-Protein Cytochrom c. Die spezifische Bindung beider Komponenten ist Voraussetzung für den Elektronenfluß von $\text{NADH}+\text{H}^+$ auf molekularen Sauerstoff. Cytochrom c läßt sich daher für eine Affinitätsreinigung der Cytochrom c Reduktase verwenden (Weiss und Juchs 1978). Ein entsprechendes Verfahren konnte bisher jedoch lediglich für die Isolierung des Proteinkomplexes aus *Neurospora* erfolgreich etabliert werden (Weiss und Kolb 1979). In der vorliegenden Dissertation ist die Cytochrom c-Affinitätschromatographie für die Präparation der Cytochrom c Reduktase aus den Mitochondrien höherer Pflanzen beschrieben. Ausgehend von Triton X-100-solubilisierten Membranproteinen wird der Proteinkomplex in einem einzigen Schritt fast vollständig aufgereinigt. Dabei kann besonders schonend verfahren werden, da sich die Cytochrom c Reduktase in Gegenwart eines Reduktionsmittels (z.B. Natrium Ascorbat) bei niedrigen Salzkonzentrationen von der Affinitätssäule ablösen läßt. Mit Hilfe von Gelfiltrationschromatographie erfolgt im Anschluß eine Trennung der monodispersen Cytochrom c Reduktase von aggregierten bzw. zerfallenen Formen des Proteinkomplexes. Das vorgestellte Reinigungsverfahren ermöglicht die Präparation von hochgradig reinem Enzym. Von besonderem Vorteil ist dabei die gute Ausbeute, da biochemische Aufreinigungen aus pflanzlichen Geweben oftmals von mühsamen Ausgangsbedingungen geprägt sind.

Cytochrom c-Affinitätschromatographie scheint für die Isolation des respiratorischen Proteinkomplexes aus höheren Pflanzen generell eine geeignete Methode zu sein. Neben Kartoffel und Weizen kann die Cytochrom c Reduktase mit dem beschriebenen Verfahren auch aus den Mitochondrien von Blumenkohl und *Oenothera berteriana* aufgereinigt werden (nicht gezeigt, Braun und Schmitz 1992). Als kritisch für die Enzympräparationen erweist sich dabei die Menge des Ausgangsmaterials. Aufreinigungen, die von weniger als 300 mg mitochondrialem Protein ausgehen, führen zu Ergebnissen mit verminderter Sauberkeit und Aktivität. Die Eisen-Schwefel-Untereinheit neigt zu Dissoziation. Vermutlich ist die Triton X-100-solubilierte Cytochrom c Reduktase während der Isolation besonders anfällig gegenüber Verdünnungszu-

ständen, die bei kleinen Ausgangsmengen schwer zu vermeiden sind. Möglicherweise ließe sich die beschriebene Methode in Kombination mit "Fast Protein Liquid Chromatography" (FPLC) diesbezüglich weiter optimieren. Ein Protokoll für eine "Minipräparation" des pflanzlichen Cytochrom c Reduktase-Komplexes würde eine schnelle Analyse verschiedener Gewebe, Sorten und Arten ermöglichen.

Für die Cytochrom c Reduktasen höherer Pflanzen können drei verschiedene enzymatische Aktivitäten nachgewiesen werden. Die isolierten Enzymkomplexe erweisen sich als Ubiquinol-Cytochrom c-Oxidoreduktasen, als Ubiquinol-Ubiquinon-Transhydrogenasen und als Prozessierungsproteasen. Die Oxidoreduktase-Aktivität der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ist etwas niedriger als die des affinitätsgereinigten Proteinkomplexes aus *Neurospora* (Linke und Weiss 1986) und deutlich niedriger als die Aktivitäten der nach alternativen Präparationsmethoden isolierten Cytochrom c Reduktasen aus Hefe und Rind (Ljungdahl et al. 1986). Dafür gibt es verschiedene Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen bewirkt Triton X-100 eine weitgehende Delipidierung von Membranproteinen, die sich abträglich auf die Aktivität der Cytochrom c Reduktase auswirkt (Schägger et al. 1990). Außerdem wurde Cytochrom c aus Säugern (Pferdeherz) als Substrat für die pflanzliche Oxidoreduktase im Aktivitäts-Assay verwendet. Schließlich ist die Kartoffelknolle ein Gewebe im Ruhezustand, d.h. die enzymatischen Aktivitäten sind generell reduziert.

4.2. Die Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase höherer Pflanzen

Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel wurde in 17 unabhängigen Präparationen aus insgesamt 6 verschiedenen Sorten und 3 verschiedenen Geweben aufgereinigt. Die Analyse der Komposition des isolierten Enzymkomplexes erfolgte mit SDS-PAGE und Immunoblotting. Auf den Gelen sind 10 Banden sichtbar, die von ihrer Stöchiometrie her in vergleichbaren Mengen vorliegen. Darüber hinaus treten noch drei substöchiometrische Banden auf. Sie waren bei allen Aufreinigungsschritten und in jeder Präparation in den Fraktionen der isolierten Cytochrom c Reduktase enthalten. Einige Untereinheiten kommen in unterschiedlichen Isoformen vor (Cytochrom c_1 und das "Hinge"-Protein, eventuell auch PEP und MPP, siehe unten). In Pflanzen scheint das Vorliegen von mehreren Genkopien für kernkodierte mitochondriale Proteine

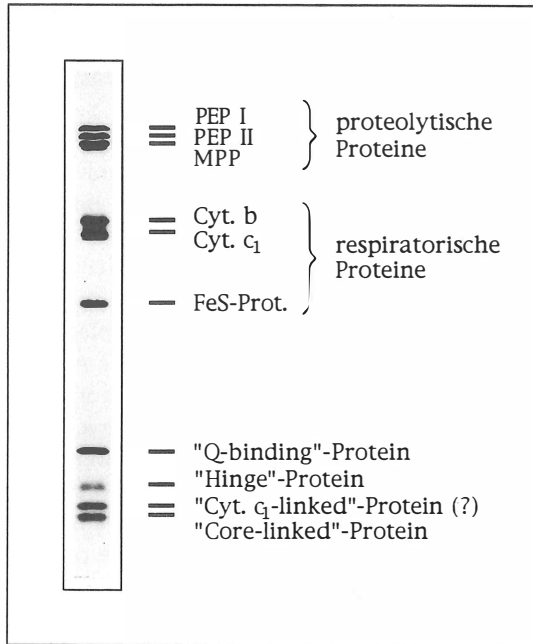


Abb. 42: Der "Cytochrom c Reduktase / Processing Peptidase-Komplex" aus den Mitochondrien der Kartoffel

jedoch eher Regel als Ausnahme zu sein (Braun et al. 1992a). Vermutlich hängt dieses Phänomen mit der Polyploidie vieler Pflanzen zusammen (die Kulturformen für Kartoffel und Weizen sind tetra- bzw. hexaploid). Eine mögliche gewebs- bzw. entwicklungsstadienspezifische Verteilung der Isoformen ist bisher nur in seltenen Fällen untersucht worden.

Die Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel wurden immunologisch und molekularbiologisch charakterisiert und konnten den entsprechenden Komponenten des Proteinkomplexes aus anderen Organismen zugeordnet werden (Abb. 42, Tabelle 10).

4.2.1. Die proteolytischen Untereinheiten

Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel zeichnet sich durch das Vorkommen von drei Core-Proteinen aus. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit Berry, Huang und DeRose (1991), die auch für Rote Bete eine zusätzliche Core-Bande beschreiben. Gleiches gilt für den Proteinkomplex aus Trypanosomen (*Crithidia fasciculata*), dessen Aufreinigung und Charakterisierung kürzlich veröffentlicht wurde (Priest und Hajduk 1992). Die drei Core-Proteine aus *Crithidia fasciculata* sind immunologisch unterscheidbar, zwei von ihnen werden jedoch als Isoformen derselben Untereinheit diskutiert, da ihre N-terminalen Aminosäuresequenzen ähnlich sind. Auch für die Cytochrom c Reduktase aus Hefe wurde gelegentlich eine weitere Core-Untereinheit beschrieben, die sich jedoch auf eine Mikroheterogenität des Core-Proteins II zurückführen ließ (Ljungdahl und Trumppower 1985). So mutmaßen auch Berry et al., daß die zusätzliche Core-Untereinheit der Cytochrom c Reduktasen höherer Pflanzen eine allelische oder gewebsspezifische Isoform darstellt.

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation erfolgte erstmals eine genaue Analyse der Untereinheiten eines Cytochrom c Reduktase-Komplexes, der drei distinkte Core-Proteine enthält.

Die drei hochmolekularen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel ähneln den Proteinen der PEP/MPP/Core-Familie aus Pilzen und Säugern, weisen dabei jedoch überraschenderweise die größten Homologien zu den Komponenten der Prozessierungsprotease auf. Das Core-Protein III ist zu 30-35 % identisch mit MPP anderer Organismen. Zwei hochkonservierte Domänen der MPP-Proteine aus Hefe, *Neurospora* und Ratte sind in der Cytochrom c Reduktase-Untereinheit aus Kartoffel enthalten (Braun et al. 1993). Die Core-Proteine I und II gleichen dem "Processing Enhancing Protein" aus Pilzen zu 50 % (siehe Tabelle 11). Der isolierte Cytochrom c Reduktase-Komplex aus Kartoffel umfaßt somit beide Bestandteile der mitochondrialen Prozessierungsprotease und erweist sich physiologisch als bifunktional.

Ob die beiden PEP-Untereinheiten gleichzeitig als Bestandteil von einzelnen Proteinkomplexen vorkommen, oder aber alternative Isoformen darstellen, kann nicht mit Sicherheit beantwortet werden. Allerdings sind die Core-Proteine I und II im Grunde genommen zu verschieden, um als Isoformen bezeichnet zu werden. Antikörper gegen das Core-Protein II kreuzreagieren nicht mit dem Core-Protein I, die Lys C-verdauten Untereinheiten unterscheiden sich hinsichtlich ihres Peptidmusters (siehe Abb. 17) und auch die Ami-

Untereinheiten	Bakterien	Chloroplasten	Mitochondrien			
			Pilze	Säuger	Pflanzen	
Core-Proteine	Core I (PEP)	-	-	+	+	++
	Core II	-	-	+	+	-
	MPP	-	-	-	-	+
respirator. Proteine	Cyt b (Cyt b ₆)	+	++	+	+	+
	Cyt c ₁ (Cyt f)	+	+	+	+	+
	FeS-P.	+	+	+	+	+
"kleine" Proteine	"Q-binding"-P.	-	-	+	+	+
	"Hinge"-P.	-	-	+	+	+
	"Core-linked"-P.	-	-	+	+	+
	"Cyt c ₁ -linked"-P.	-	-	+	+	(+)
	"FeS-linked"-P.	-	-	+	+	?
	andere (?)	(+)	+	-	+	-

Tabelle 10: Die Untereinheiten der Cytochrom bc₁/b₆f-Komplexe aus Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien.

nosäuresequenzen der beiden Proteine gleichen sich lediglich zu etwa 50 %. Darüber hinaus ist das isolierte Cytochrom c Reduktase-Dimer aus Kartoffel um rund 100 kd größer als der Proteinkomplex aus den Mitochondrien von *Neurospora*. Diese Gewichtsdivergenz ließe sich durch das Vorhandensein einer zusätzlichen Untereinheit im 50 kd-Bereich erklären. Andererseits wirken die Core-Proteine I und II auf Coomassie-Gelen quantitativ etwas schwächer als das benachbarte Core-Protein III und sind von ihrem Vorkommen her bei verschiedenen Sorten bzw. Geweben der Kartoffel variabel. Immunpräzipitationen der isolierten Cytochrom c Reduktase mit Antikörpern, die monospezifisch für eine der beiden PEP-Untereinheiten sind, könnten die Frage nach dem gleichzeitigen Vorkommen der Core-Proteine I und II in individuellen Proteinkomplexen beantworten.

Bei der Cytochrom c Reduktase aus Weizen liegen sogar vier Untereinheiten im 50 kd-Bereich vor, die auf der Basis von Immunoblots und Aminosäuresequenzierungen der Core-Proteinfamilie zugeordnet werden können. Zwei davon weisen 70 % Identität zu MPP aus Kartoffel auf, die zwei anderen

gleichen den PEP-Untereinheiten (Tabelle 12). Bei den MPP- und PEP-Paaren aus Weizen handelt es sich jedoch mit hoher Wahrscheinlichkeit um Isoformen, da HPLC-Auftrennungen der endoproteolytisch verdauten Untereinheiten jeweils beinahe identische Peptidmuster ergeben (siehe Abb. 37). Auf der Basis der Sequenzierung von Peptiden konnte zwischen den beiden PEP-Untereinheiten aus Weizen nur an einer Position eine unterschiedliche Aminosäure identifiziert werden.

4.2.2. Die respiratorischen Untereinheiten

Auch die respiratorischen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel bzw. Weizen wurden partiell sequenziert. Sie gleichen sich zu jeweils etwa 95 % und weisen durchschnittlich 55 % Identität mit den entsprechenden Proteinen aus Pilzen und Säugern auf (siehe Tabellen 11 und 12). Auf der Basis von Sequenzvergleichen lassen sich Domänen, die für die respiratorischen Proteine aus anderen Organismen definiert wurden, auf die Untereinheiten aus Pflanzen übertragen.

Für Cytochrom c_1 der Kartoffel wurden cDNA-Klone isoliert und sequenziert. Die Leitsequenz weist ein zweigeteiltes Polaritätsprofil auf, wie es für die Präsequenzen von kernkodierten, im Intermembranraum lokalisierten Proteinen aus Pilzen und Säugern charakteristisch ist.

Die N-terminale Aminosäuresequenz für das FeS-Protein aus Kartoffel ähnelt einem Sequenzbereich des Vorläufer-Proteins aus Mais. Demnach besteht die potentielle Leitsequenz des Mais-Precursors aus 60 Aminosäuren und weist an ihrem C-Terminus keine Motive auf, die auf eine zweistufige Prozessierung hinweisen. Falls die Leitsequenz des Eisen-Schwefel-Proteins aus Pflanzen analog zu derjenigen aus Rind in einem Schritt abgetrennt wird, so verbleibt sie jedoch vermutlich nicht als kleine Untereinheit im Proteinkomplex, wie ausgedehnte Aminosäuresequenzierungen der niedrig-molekularen Komponenten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel nahelegen (siehe unten).

Die Cytochrom b-Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel konnte N-terminal ansequenziert werden. Obwohl Cytochrom b mitochondrial kodiert ist und in der Matrix der Organellen nach bisherigem Wissensstand keine Methioninaminopeptidasen vorkommen, ist das Initiator-Methionin abgetrennt. Damit muß für die Mitochondrien aus höheren Pflanzen die Präsenz von Deformylase- und Methioninaminopeptidase-Aktivitäten angenommen werden.

	Hefe	Rind	∅
PEP I (55 kd)	49%	47%	48%
PEP II (53 kd)	33%	30%	32%
MPP	31%	35%*	33%
Cytochrom b	50%	52%	51%
Cytochrom c ₁	55%	59%	57%
Eisen-Schwefel-Protein	64%	45%	57%
"Q-binding"-Protein	30%	41%	36%
"Hinge"-Protein	43%	50%	47%
"Core-linked"-Protein	33%	45%	39%
"Cyt c ₁ -linked"-Protein	31%	19%	25%
∅	42%	43%	

Tabelle 11: Prozentsatz von Aminosäuren, die zwischen den Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel und Untereinheiten des Proteinkomplexes aus Hefe und Rind (*Ratte) konserviert sind. Die Berechnungen erfolgten auf der Basis der Aminosäuresequenzen von Peptiden (Übersicht in Abb. 18, Alignments in Abb. 25, 26 und 30). Für MPP, Cytochrom b und Cytochrom c₁ wurden die abgeleiteten Aminosäuresequenzen korrespondierender Gene bzw. cDNA-Klone herangezogen (Braun et al. 1992a, Zanlungo et al. 1991, Braun et al. 1992b).

Obwohl die meisten Sequenzen der Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel nur unvollständig vorliegen, zeichnen sich einige Resultate ab: Die respiratorischen Proteine sind überdurchschnittlich stark konserviert (50-64 %). Von den restlichen Untereinheiten (30-50 % Identität) weisen vor allem PEP und das "Hinge"-Protein relativ große Ähnlichkeiten zu den entsprechenden Komponenten aus anderen Organismen auf. Die Übereinstimmung zwischen den Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel und Hefe bzw. Rind liegt insgesamt bei rund 43 %.

Warum wird das N-terminale Methionin bei Prokaryonten bzw. im Cytoplasma von Eukaryonten oftmals posttranskriptional von Proteinen abgespalten? Zum einen hängt die Stabilität und damit der "turnover" von Proteinen entscheidend von der N-terminalen Aminosäure ab (Bachmair et al. 1986). Zum anderen könnte bei Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen die Gegenwart oder Abwesenheit des endständigen Methionins, einer chemisch reaktiven Aminosäure, einen wichtigen Einfluß haben. Schließlich beeinflusst Methionin-Abspaltung den cytoplasmatischen (hier: organellären) Methionin-"Pool" (Hirel et al. 1989). In den Mitochondrien von Pilzen und Säugern scheint diese posttranslationale Modifikation hingegen verzichtbar zu sein.

PEP I	(55.5 kd)	76,78%
PEP II	(55.0 kd)	67,63%
MPP I	(51.5 kd)	66%
MPP II	(51.0 kd)	69%
Cytochrom b		96%
Cytochrom c ₁		94%
Eisen-Schwefel-Protein		?
"Q-binding"-Protein		64%
"Hinge"-Protein		?
∅		76%

Tabelle 12: Prozentsatz von Aminosäuren der Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase aus Weizen, die zu den entsprechenden Sequenzbereichen der Untereinheiten des Proteinkomplexes aus Kartoffel identisch sind. Den Berechnungen liegen die Aminosäuresequenzen von Peptiden zugrunde (Übersicht in Abb. 38, Alignments in Abb. 39 und 40). Für Cytochrom b erfolgte der Vergleich auf der Basis der veröffentlichten DNA-Sequenzen (Boer et al. 1985, Zanlungo et al. 1991). Die Identitäten für die respiratorischen Proteine liegen bei etwa 95 %, für die anderen Untereinheiten bei durchschnittlich 68 % (63-78 %).

Lediglich Pflanzen mit ihrem ungleich komplizierteren Chondriom (siehe Oda et al. 1992) könnten dabei eine Ausnahme darstellen.

4.2.3. Die kleinen Untereinheiten

In den Cytochrom c Reduktasen aus Rind und Hefe kommen gleichermaßen fünf kleine Untereinheiten vor, die als "Q-binding"-, "Hinge"-, "Core-linked"-, "Cytochrome c₁-linked"- und "FeS-linked"-Proteine bezeichnet werden. Drei der vier kleinen Untereinheiten des Proteinkomplexes aus Kartoffel konnten auf der Basis der Aminosäuresequenzen von Peptiden den Komponenten aus Rind und Hefe zugeordnet werden. Demzufolge gibt es auch in Cytochrom c Reduktase-Komplexen aus Pflanzen "Q-binding"-, "Hinge"- und "Core-linked"-Proteine (siehe Tabelle 10). Bei der vierten kleinen Untereinheit könnte es sich um das "Cytochrome c₁-linked"-Protein handeln. Lediglich für ein pflanzliches "FeS-linked"-Protein ergaben sich bisher keine Hinweise. Es ist unwahrscheinlich, daß sich diese Untereinheit unter einer der anderen Komponenten des elektrophoretisch aufgetrennten Proteinkomplexes verbirgt, da

sich alle sequenzierten Peptide einzelner Banden jeweils einem Protein der Cytochrom c Reduktase aus Rind oder Hefe zuordnen lassen. In Hefe und Rind löst sich die "FeS-linked"-Untereinheit leicht vom Proteinkomplex ab, ohne daß die respiratorische Aktivität der Cytochrom c Reduktase davon tangiert wird (Schägger et al. 1990, Geier et al. 1992). Das entsprechende Protein könnte also auch bei Pflanzen vorkommen, jedoch präparationsbedingt dissoziiert sein. Ein potentieller Kandidat für die gesuchte Untereinheit ist die substöchiometrische 8 kd-Bande des SDS-PAGE-aufgetrennten Proteinkomplexes aus Kartoffel. Andere Interpretationen sind hier jedoch denkbar, z.B. daß es sich bei dieser Bande um die abgetrennte Leitsequenz der Eisen-Schwefel-Untereinheit handelt.

Die Aminosäuresequenzen der kleinen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktasen aus Hefe, Rind und Kartoffel sind zu 30 bis 50 % identisch (siehe Tabelle 11). Obwohl sie vermutlich nicht direkt am Elektronentransport beteiligt sind, und der analoge bc₁-Komplex aus Prokaryonten auch ohne kleine Komponenten auskommt, ist der hohe Grad der Konservierung ein weiterer Hinweis auf die unverzichtbare Funktion dieser Proteine in Eukaryonten.

4.2.4. Substöchiometrische Proteine in Cytochrom c Reduktase-Präparationen

Bei gelelektrophoretischen Analysen der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel tauchen drei substöchiometrische Banden auf (50, 42, und 8 kd). Sie kommen bei allen Aufreinigungsschritten (Affinitätssäule, Gelfiltrationssäule, Saccharosegradient) in den Fraktionen des Proteinkomplexes vor. Es könnte sich bei ihnen um niedrig exprimierte Isoformen von einzelnen Untereinheiten handeln, um Degradationsprodukte, um assoziierte Komponenten oder um echte Untereinheiten, die sich während der Präparation vom Proteinkomplex weitgehend abgelöst haben.

Bei der 42 kd-Bande, auf die auch Berry et al. (1991) hingewiesen haben, liegt vermutlich eine Degradation eines der Core-Proteine vor. Die Bande ist bei gelelektrophoretischer Analyse von verschiedenen Enzympräparationen von ihrer Intensität her variabel und reagiert mit Antikörpern, die gegen die Core-Proteine aus Pilzen gerichtet sind. Für die Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora* konnte eine Bande vergleichbarer Größe als Degradationsprodukt des Core-Proteins I identifiziert werden (M. Bödicker, persönliche Mitteilung). Das 50 kd-Protein der Kartoffel stellt vermutlich eine Isoform für die 51 kd-Untereinheit dar. Die molekulare Größe beider Komponenten verschiebt sich

auf niedrig prozentigen Polyacrylamidgelen in analoger Weise nach oben (50→52 kd bzw. 51→53 kd auf 7 %igen gegenüber 14 %igen Gelen). Darüber hinaus konnte aus einer cDNA-Bank für Kartoffel eine zweite schwach exprimierte cDNA für die MPP-Untereinheit isoliert werden (Emmermann und Schmitz, persönliche Mitteilung).

Die mögliche Identität der substöchiometrischen 8 kd-Bande wurde bereits diskutiert (siehe oben).

Bei der affinitätsgereinigten Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora* tritt eine substöchiometrische Bande bei 60 kd auf, die dem "Heat-Shock"-Protein HSP 60 entspricht (Hutchinson et al. 1989). Bei dem elektrophoretisch aufgetrennten Proteinkomplex aus Kartoffel fehlt diese Komponente. Möglicherweise ist HSP 60, das auch für pflanzliche Mitochondrien charakterisiert wurde (Prasad und Stewart 1992), nur locker an den Cytochrom c Reduktase-Komplex gebunden. Tatsächlich war dieses "Heat-Shock"-Protein im Eluat der Cytochrom c-Affinitätssäule vorhanden (nicht gezeigt). HSP 60 könnte aufgrund einer Assoziation mit dem Proteinkomplex indirekt von der Säule festgehalten werden. Da die Bindung des Proteins an die Cytochrom c Reduktase jedoch schwächer ist als die Bindung des Proteinkomplexes an das Cytochrom c der Säule, eluiert es bereits bei niedrigen Salzkonzentrationen.

4.3. Die Stabilität der Cytochrom c Reduktase aus höheren Pflanzen

Während der chromatographischen Präparation der Cytochrom c Reduktasen aus Kartoffel und Weizen kommt es unter bestimmten Umständen zu einer Abspaltung der FeS-Untereinheit. Dieses Phänomen wurde auch für die Cytochrom c Reduktasen anderer Organismen beschrieben (Riccio et al. 1977, Weiss and Juchs 1978) und ist vermutlich durch das Herauslösen des Proteinkomplexes aus der mitochondrialen Phospholipidmembran mit Triton X-100 oder durch Verdünnungszustände bedingt.

Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel wurde mit Hilfe von verschiedenen Salzen und Detergenzien unter variablen Konditionen gezielt destabilisiert. Der Proteinkomplex erwies sich dabei als ausgesprochen stabil. Die proteolytischen Komponenten scheinen integrale Bestandteile darzustellen. Ein Herauslösen der MPP-, "Q-binding"- und "Hinge"-Untereinheiten ist zwar möglich, es werden dabei jedoch vermutlich hydrophobe Flächen freigelegt, so daß der verbleibende Restkomplex verklumpt. Eventuell wird die Solidität

der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel durch die zusätzliche Core-Untereinheit bedingt.

Isolierte Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel kann auch von Triton X-100 in andere Detergenzien überführt werden, ohne daß strukturelle Komplikationen auftreten. Der Proteinkomplex ist beispielsweise in N-octyl Glucopyranosid, einem niedermolekularen Detergens, das vergleichsweise kleine Mizellen bildet und daher für Kristallisierungen der Cytochrom c Reduktase aus Rind eingesetzt wird (Berry et al. 1992), vollkommen stabil (nicht gezeigt). Auch mit dem Proteinkomplex höherer Pflanzen lassen sich möglicherweise Kristalle herstellen, die für eine Entschlüsselung der atomaren Feinstruktur geeignet wären. Dabei könnte erstmals Einblick in die Konfiguration einer Prozessierungsprotease gewonnen werden.

4.4. Die pflanzliche Prozessierungsprotease

Die in der Matrix lokalisierte Prozessierungsaktivität aus Mitochondrien von Säugern und Pilzen beruht auf dem Zusammenwirken von MPP, der "Matrix Processing Protease" und PEP, dem "Processing Enhancing Protein". In den Mitochondrien aus Kartoffel und Weizen liegt dagegen eine membrangebundene Prozessierungsaktivität vor (Braun et al. 1992b, Eriksson and Glaser 1993). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß MPP und PEP integrale Bestandteile des pflanzlichen Cytochrom c Reduktase-Komplexes darstellen.

Die Sequenzen der Core-Proteine I und II aller bislang untersuchten Organismen haben eine begrenzte Homologie zu den Komponenten der mitochondrialen Prozessierungsprotease (Jensen und Yaffe 1988, Schulte et al. 1989). Nur in einigen Fällen sind diese Untereinheiten jedoch tatsächlich an der Prozessierung beteiligt (siehe Abb. 43). In den Mitochondrien aus Hefe spielen die Core-Proteine lediglich eine Rolle bei der Assemblierung der Cytochrom c Reduktase. In *Neurospora* ist das Core-Protein I identisch mit PEP, das Core-Protein II hingegen monofunktional. Die Prozessierung importierter Vorläufer-Proteine findet bei *Neurospora* jedoch in der Matrix statt, da MPP in diesem mitochondrialen Subkompartiment lokalisiert ist und auch ein Teil des PEP als lösliches Protein vorkommt (Arretz et al. 1991). Andererseits konnte mit Hilfe von *in vitro* Prozessierungsexperimenten gezeigt werden, daß das in den Komplex integrierte PEP ebenfalls eine prozessierungsverstärkende Funktion aufweist. Interessanterweise ist die isolierte Cytochrom c Reduktase aus

Neurospora dabei ein stärkerer "Enhancer" als die separate PEP-Untereinheit (Schulte et al. 1989).

In Pflanzen schließlich liegen bifunktionale Core-PEP- und Core-MPP-Proteine vor. Ubiquinol-Cytochrom c Reduktase und Prozessierungsprotease erweisen sich als strukturelle Einheit. Eine ähnliche Situation könnte auch für den Proteinkomplex aus Trypanosomen zutreffen (Antikörper gegen die MPP-Untereinheit aus Kartoffel reagieren mit dem dritten Core-Protein von *Leishmania tarentolae*, Berry et al. 1991). Die Cytochrom c Reduktase aus Rind ist hingegen vermutlich keine Prozessierungsprotease, dürfte jedoch eine "Enhancer"-Funktion beinhalten, da das Core-Protein I größere Homologie zu PEP aus Hefe als zum Core-Protein I aus Hefe aufweist (Gencic et al. 1991).

Vorerst offen bleibt, warum in Kartoffel und Weizen verschiedene Formen für PEP vorkommen (in Weizen zudem auch für MPP). Es ist denkbar, daß die beiden PEPs unterschiedliche Gruppen an Precursoren für die proteolytische Reifung zugänglich machen, es könnte sich jedoch auch um physiologisch kongruente Isoformen handeln.

Das Vorkommen von Core-Proteinen unterscheidet die mitochondrialen Cytochrom c Reduktasen aller bisher untersuchten Organismen von bakteriellen bc₁-Komplexen und muß daher bereits ein Merkmal der Eukaryonten gewesen sein. Unklar ist jedoch, ob die Core-Untereinheiten von Beginn an proteolytische Funktionen hatten und diese im Verlauf der Evolution bei bestimmten Organismengruppen verloren haben, oder ob die Proteine erst sekundär zu Protease-Komponenten geworden sind. Über die Entwicklungsgeschichte der PEP/MPP/Core-Proteinfamilie läßt sich vorerst nur spekulieren. Allerdings könnte sich die vollständige Trennung von Prozessierungsprotease und Cytochrom c Reduktase als Besonderheit der Physiologie fakultativ aerober Organismen erweisen (Weiss et al. 1990).

Inzwischen ist auch für den mitochondrialen NADH-Dehydrogenase-Komplex (Komplex I) aus *Neurospora* bzw. Rind ein bifunktionales Protein beschrieben worden (Sackmann et al. 1991, Runswick et al. 1991). Eine 10 kd-Untereinheit des Proteinkomplexes ist als "Acyl-Carrier"-Protein an der mitochondrialen Fett-Biosynthese beteiligt. Möglicherweise stellen die respiratorischen Proteinkomplexe für bestimmte enzymatische Funktionen eine vorteilhafte molekulare "Mikro-Umgebung" dar. Komponenten von Enzymkomplexen verringern gegenseitig ihre Protease-Suszeptibilität. Die membranverankerte Prozessierungsaktivität könnte darüber hinaus eine Kopplung von Import und Reifung kernkodierter Vorläufer-Proteine ermöglichen. Schließlich stellen bi-

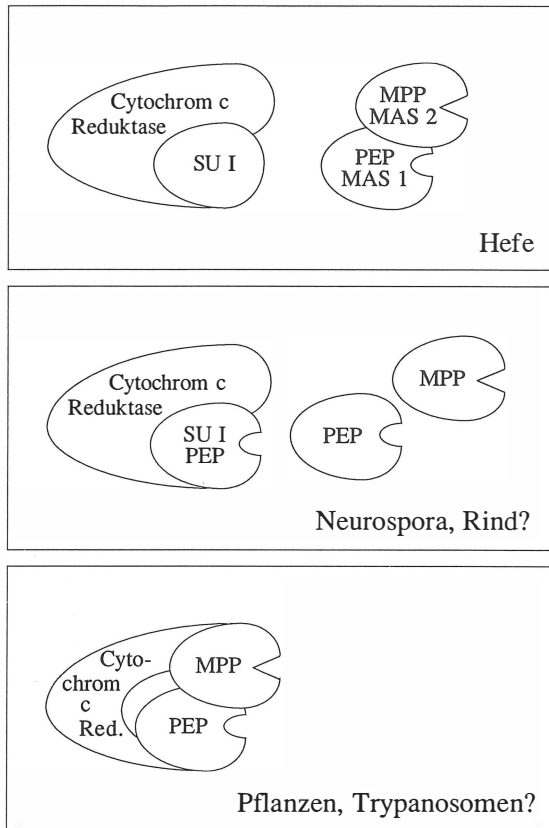


Abb. 43: Die Beziehung zwischen Cytochrom c Reduktase und Prozessierungsprotease in verschiedenen Organismen

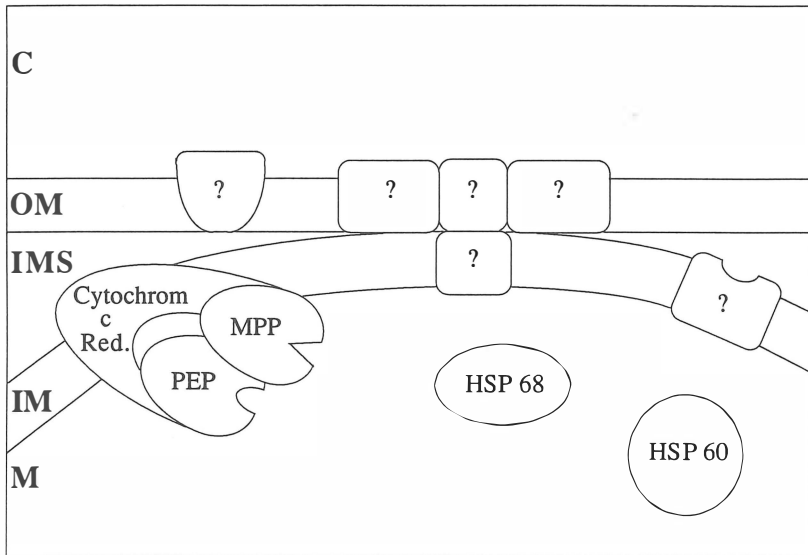


Abb. 44: Der Protein-Import-Apparat der Mitochondrien höherer Pflanzen. Im Vergleich zu Säugern und Pilzen (siehe Abb. 2) sind erst wenige Elemente identifiziert. Dazu zählen neben der Prozessierungsprotease zwei in der Matrix lokalisierte Hitzeschockproteine (HSP 60 und HSP 68, Watts et al. 1992, Neumann et al. 1993, Vidal et al. 1993, Prasad und Stewart 1992).

funktionale Proteine potentielle Schaltstellen für die koordinierte Regulation von physiologischen Prozessen dar (hier: Atmungskette, Protein-Import).

Die Cytochrom c Reduktase ist nicht nur Bestandteil der mitochondrialen Atmungskette, sondern hat als b_6f - bzw. bc_1 -Komplex in analoger Weise auch eine zentrale Bedeutung für die chloroplastidäre Lichtreaktion und für bakterielle Elektronentransportketten (siehe Einleitung). Die vorliegende Dissertation belegt für die Cytochrom c Reduktase höherer Pflanzen eine weitere Funktion. Mit der in den Komplex integrierten Prozessierungsprotease wurde eine der ersten Komponenten des pflanzlichen Protein-Import-Apparates identifiziert (Abb. 44). Die Cytochrom c Reduktase ist jedoch über eine Beteiligung an der Reifung importierter Vorläufer-Proteine hinaus aufgrund ihrer eigenen Biogenese von Interesse. Der Enzymkomplex setzt sich aus mitochondrial- und kernkodierte Untereinheiten zusammen, die "Targeting"-Informationen für drei verschiedene suborganelläre Kompartimente auf-

weisen (Matrix, innere Membran, Intermembranraum). Ein Verständnis der Assemblierung und der Physiologie der Cytochrom c Reduktase verspricht vor dem Hintergrund des ubiquitären Vorkommens von bc_1/b_6f -Komplexen interessante Einblicke in die Evolution energieumwandelnder Systeme.

5. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde die Isolierung der mitochondrialen Cytochrom c Reduktasen aus Kartoffel und Weizen mit Hilfe von Cytochrom c-Affinitätschromatographie und Gelfiltrationschromatographie beschrieben. Die verwendete Präparationsmethode führt zu einem hochgradig aufgereinigten und aktiven Enzymkomplex in monodisperser Form.

Die Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel wurde physiologisch und strukturell eingehend untersucht. Der Enzymkomplex liegt als Dimer vor und katalysiert nach Rekonstitution in Phospholipidmembranen eine Antimycin- und Myxothiazol-sensitive Reduktion von Cytochrom c mit einem Umsatz von 50 s^{-1} . Daneben konnte eine Ubiquinol-Ubiquinon Transhydrogenase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Cytochrom c Reduktase setzt sich aus 10 Untereinheiten zusammen, die sich auf der Basis von immunologischen und strukturellen Daten den Komponenten der entsprechenden Proteinkomplexe aus Pilzen und Säugern zuordnen lassen. Demnach kommen neben den respiratorischen Untereinheiten Cytochrom b, Cytochrom c_1 und einem Eisen-Schwefel-Protein noch vier Komponenten mit niedrigem Molekulargewicht vor, die als "Q-binding-", "Hinge-", "Core-linked"- und "Cytochrome c_1 -linked"-Proteine bezeichnet werden, sowie drei Untereinheiten im 50 kd-Bereich, die zu der Gruppe der sogenannten "Core"-Proteine gehören.

Für Cytochrom b der Kartoffel konnte erstmals die Abspaltung des Initiator Methionins eines mitochondrial kodierten Proteins gezeigt werden. Damit muß für pflanzliche Mitochondrien das Vorhandensein von Methionin-aminopeptidasen angenommen werden.

Für Cytochrom c_1 der Kartoffel erfolgte eine Isolierung und Sequenzierung von cDNA-Klonen. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen erlauben im Vergleich zu der N-terminalen Sequenz des reifen Proteins die Definition der Leitsequenz. Auch pflanzliche Komponenten des mitochondrialen Intermembranraums zeichnen sich demnach analog zu den Proteinen dieses Subkompartiments aus Pilzen und Säugern durch eine "Targeting"-Sequenz mit einem charakteristischen zweigeteilten Polaritätsprofil aus.

In der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel kommt im Gegensatz zu dem Enzymkomplex aus anderen Organismen eine dritte Core-Untereinheit vor. Die drei Core-Proteine sind immunologisch unterscheidbar und stellen integrale Bestandteile des respiratorischen Proteinkomplexes dar. Sie kreuzreagieren mit Antikörpern, die gegen die beiden Komponenten der mitochondrialen Prozessierungsprotease - MPP und PEP - aus Pilzen gerichtet sind. Ausgedehnte Aminosäuresequenzierungen bestätigen einen Bezug dieser Untereinheiten zu

MPP und PEP. Auch physiologisch erweisen sich die isolierten Cytochrom c Reduktasen aus Kartoffel und Weizen als spezifische Prozessierungsproteasen. Somit ist der Komplex III der Atmungskette höherer Pflanzen bifunktional und wird als "Cytochrom c Reduktase / Processing Peptidase-Komplex" bezeichnet.

6. LITERATUR

Arretz, M., Schneider, H., Wienhues, U. and Neupert, W. (1991) Processing of mitochondrial precursor proteins (1991) Biomed. Biochim. Acta 50, 403-412.

Bachmair, A., Finley, D. and Varshavsky, A. (1986) *In vivo* half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. Science 234, 179-186.

Bechmann, G., Schulte, U. and Weiss, H. (1992) Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. In: Molecular mechanisms in bioenergetics, pp 199-216, Ernster, L. (ed.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Beckmann, J., Ljungdahl, P.O., Lopez, J.L. and Trumpower, B. (1987) Isolation and characterization of the nuclear gene encoding the Rieske iron-sulfur protein (RIP1) from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 262, 8901-8909.

Bégu, D., Graves, P.-V., Domec, C., Arselin, G., Litvak, S. and Araya, A. (1990) RNA editing of wheat mitochondrial ATP synthase subunit 9: direct protein and cDNA sequencing. Plant Cell 2, 1283-1290.

Behrens, M., Michaelis, G. and Pratje, E. (1991) Mitochondrial inner membrane protease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* shows sequence similarity to the *Escherichia coli* leader peptidase. Mol. Gen. Genet. 228, 167-176.

Ben-Bassat, A., Bauer, K., Chang, S.-Y., Myambo, K., Boosman, A. and Chang, S. (1987) Processing of the initiation methionine from proteins: properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. J. Bacteriol. 169, 751-757.

Berry, E.A., Huang, L. and DeRose, V.J. (1991) Ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase of higher plants. J. Biol. Chem. 266, 9064-9077.

Berry, E.A., Huang, L., Earnest, T.N. and Jap, B.K. (1992) X-ray diffraction by crystals of beef heart ubiquinol:cytochrome c oxidoreductase. J. Mol. Biol. 224, 1161-1166.

Birnboim, H.C. and Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. Nucl. Acids Res. 7, 1513-1523.

Boer, P.H., McIntosh, J.E., Gray, M.W. and Bonen, L. (1985) The wheat mitochondrial gene for apocytochrome b: absence of a procaryotic ribosome binding site. *Nucl. Acids Res.* 13, 2281-2292.

Böhni, P., Gasser, S., Leaver, C. and Schatz, G. (1980): A matrix-localized mitochondrial protease processing cytoplasmically-made precursors to mitochondrial proteins. In: *The organisation and expression of the mitochondrial genome*, pp 423-433, Kroon, A. M. and Saccone, C. (eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Borchart, U., Machleidt, W., Schägger, H., Link, T.A. and v. Jagow, G. (1985) Isolation and amino acid sequence of the 8 kDa DCCD-binding protein of beef heart ubiquinol:cytochrome c reductase. *FEBS Lett.* 191, 125-130.

Borchart, U., Machleidt, W., Schägger, H., Link, T.A. and v. Jagow, G. (1986) Isolation and amino acid sequence of the 9.5 kDa protein of beef heart ubiquinol:cytochrome c reductase. *FEBS Lett.* 200, 81-86.

Boutry, M. and Chua, N.H. (1985) A nuclear gene encoding the beta subunit of the mitochondrial ATP synthase in *Nicotiana plumbaginifolia*. *EMBO J.* 4, 2159-2165.

Boutry, M., Faber, A.-M., Charbonnier, M. and Briquet, M. (1984) Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products. *Plant Mol. Biol.* 3, 445-452.

Boveris, A., Oshino, R., Erecinska, M. and Chance, B. (1971) Reduction of mitochondrial components by durohydroquinone. *Biochim. Biophys. Acta* 245, 1-16.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248-254.

Brandt, U., Yu, L., Yu, C.-A. and Trumpower, B.L. (1993) Evidence that the mitochondrial targeting presequence of the Rieske iron-sulfur protein is processed in a single step after insertion into the cytochrome bc₁ complex in mammals and retained as a subunit in the complex. *J. Biol. Chem.* 268, 8387-8390.

Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1992) Affinity purification of cytochrome c reductase from plant mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 208, 761-767.

Braun, H.P. and Schmitz, U.K. (1993) Purification and sequencing of cytochrome b from potato reveals methionine cleavage of a mitochondrially encoded protein. *FEBS Lett.* 316, 128-132.

Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V. and Schmitz, U.K. (1992a) Cytochrome c₁ from potato: a protein with a presequence for targeting to the intermembrane space. *Mol. Gen. Genet.* 231, 217-225.

Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, V. and Schmitz, U.K. (1992b) The general mitochondrial processing peptidase from potato is an integral part of cytochrome c reductase of the respiratory chain. *EMBO J.* 11, 3219-3227.

Braun, H.P., Emmermann, M. and Schmitz, U.K. (1993) Cytochrome c reductase from potato mitochondria: A protein complex involved in respiration and protein import. In: *Plant Mitochondria*, Brennicke, A. and Kück, U. (eds), VCH Publishers, Weinheim, FRG, in press.

Breiman, A. (1987) Mitochondrial DNA diversity in the genera of *Triticum* and *Aegilops* revealed by Southern blot hybridization. *Theor. Appl. Genet.* 73, 563-570.

Broger, C., Salardi, S. and Azzi, A. (1983) Interaction between isolated cytochrome c₁ and cytochrome c. *Eur. J. Biochem.* 131, 349-352.

Butler, W.L. and Hopkins, D.W. (1970a) Higher derivate analysis of complex absorption spectra. *Photochem. and Photobiol.* 12, 439-450.

Butler, W.L. and Hopkins, D.W. (1970b) An analysis of fourth derivate spectra. *Photochem. and Photobiol.* 12, 451-456.

Chang, Y.H., Teichert, U. and Smith, J.A. (1990) Purification and characterization of a methionine aminopeptidase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265, 19892-19897.

Chaumont, F., O'Riordan, V. and Boutry, M. (1990) Protein transport into mitochondria is conserved between plant and yeast species. *J. Biol. Chem.* 265, 16856-16862.

Cocco, T., Lorusso, M., Sardanelli, A.M., Minuto, M., Ronchi, S., Tedeschi, G. and Papa, S. (1991) Structural and functional characteristics of polypeptide subunits of bovine heart ubiquinol-cytochrome-c reductase complex. *Eur. J. Biochem.* 195, 731-734.

Crivellone, M.D., Wu, M. and Tzagoloff, A. (1988) Assembly of the mitochondrial membrane system. *J. Biol. Chem.* 263, 14323-14333.

Dale, R. M. K., McClure, B. A. and Houchins, J. P. (1985) A rapid single-stranded cloning strategy for producing a sequential series of overlapping clones for use in DNA sequencing: application to sequencing the corn mitochondrial 18 S rDNA. *Plasmid* 13, 31-40.

Daum, G., Böhni, P.C. and Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 13028-13033.

Degli Esposti, M., Flamini, E. and Zannoni, D. (1985) Functional characterization and partial purification of the ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase from higher plant mitochondria (*Heliantus tuberosum*). *Plant Physiol.* 77, 758-764.

Dell'Orto, P., Moenne, A., Graves, P.V. and Jordana, X. (1993) The potato mitochondrial ATP synthase subunit 9: gene structure, RNA editing and partial protein sequence. *Plant Science* 88, 45-53.

Devereux, J., Haeblerli, P. and Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12, 387-395.

Douce, R. (1985) *Mitochondria in higher plants: Structure, function and biogenesis.* Academic Press, Orlando, FL.

Edman, P. (1950) Method for the determination of amino acid sequences in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4, 283-293.

Emmermann, M. (1991) Charakterisierung von kernkodierten mitochondrialen Proteinen. Diplomarbeit an der Freien Universität Berlin.

Emmermann, M. and Schmitz, U.K. (1993) Unique properties of the cytochrome c reductase integrated processing peptidase from potato mitochondria. *Plant Physiol.*, in press.

Emmermann, M., Braun, H.P., Arretz, M. and Schmitz, U.K. (1993a) Characterization of the bifunctional cytochrome c reductase / processing peptidase complex from potato mitochondria. *J. Biol. Chem.*, in press.

Emmermann, M., Clericus, M., Braun, H.P., Mozo, T., Kruff, V. and Schmitz, U.K. (1993b) Molecular features, processing and import of the Rieske-iron-sulfur protein from potato mitochondria. Submitted to *Plant Mol. Biol.*

Eriksson, A.C. and Glaser, E. (1993) Mitochondrial processing protease. A general processing protease of spinach leaf mitochondria is a membrane-bound enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, in press.

Feldman, F. and Mahler, H.R. (1974) Mitochondrial biogenesis. Retention of terminal formylmethionine in membrane proteins and regulation of their synthesis. *J. Biol. Chem.* 249, 3702-3709.

Friedrich, T., Hofhaus, G., Ise, W., Nehls, U., Schmitz, B. and Weiss, H. (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 180, 173-180.

Fu, W., Japa, S. and Beattie, D.S. (1990) Import of the iron-sulfur protein of the cytochrome bc₁ complex into yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 16541-16547.

Gatti, D.L. and Tzagoloff, A. (1990) Structure and function of the mitochondrial bc₁ complex. *J. Biol. Chem.* 265, 21468-21475.

Gavel, Y. and v. Heijne, G. (1990) Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides. *Prot. Engineering* 4, 33-37.

Geier, B., Schägger, H., Brandt, U., Colson, A.M. and v. Jagow, G. (1992) Point mutation in cytochrome b of yeast ubiquinone:cytochrome-c oxidoreductase causing myxothiazol resistance and facilitated dissociation of the iron-sulfur subunit. *Eur. J. Biochem.* 208, 375-380.

Gencic, S., Schägger, H. and v. Jagow, G. (1991) Core I protein of bovine ubiquinol-cytochrome c reductase; an additional member of the mitochondrial-protein-processing family. *Eur. J. Biochem.* 199, 123-131.

Geyl, D., Böck, A. and Isono, K. (1981) An improved method for two-dimensional gel electrophoresis: Analysis of mutationally altered ribosomal proteins of *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 181, 309-312.

Gietl, C., Lehnerer, M. and Olsen, O. (1990) Mitochondrial malate dehydrogenase from watermelon: sequence of cDNA clones and primary structure of the higher-plant precursor protein. *Plant Mol. Biol.* 14, 1019-1030.

Glick, B.S. and Schatz, G. (1991) Import of proteins into mitochondria. *Ann. Rev. Genet.* 25, 21-44.

Glick, B.S., Beasley, E.M. and Schatz, G. (1992a) Protein sorting in mitochondria. *TIBS* 17, 453-459.

Glick, B.S., Brandt, A., Cunningham, K., Müller, S., Hallberg, R.L. and Schatz, G. (1992b) Cytochromes c_1 and b_2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* 69, 809-822.

Gonzalez-Halphen, D., Lindorfer, M.A. and Capaldi, R.A. (1988) Subunit arrangement in beef heart complex III. *Biochem.* 27, 7021-7031.

Graack, H.R., Grohmann, L. and Kitakawa, M. (1991) The nuclear encoded mitoribosomal proteins YmL27 and YmL31 are both essential for mitochondrial function in yeast. *Biochimie* 73, 837-844.

Grohmann, L., Graack, H.-R., Kruff, V., Choli, T., Goldschmidt-Reisin, S. and Kitakawa, M. (1991) Extended N-terminal sequencing of proteins of the large ribosomal subunit from yeast mitochondria. *FEBS Lett.* 284, 51-56.

de Haan, M., van Loon, A.P.G.M., Kreike, J., Vaessen, R.T.M.J. and Grivell, L.A. (1984) The biosynthesis of the ubiquinol-cytochrome c reductase complex in yeast. DNA sequence analysis of the nuclear gene coding for the 14-kDa subunit. *Eur. J. Biochem.* 138, 169-177.

Hallermayer, G., Zimmermann, R. and Neupert, W. (1977) Transport of cytoplasmically synthesized proteins into the mitochondria in a cell free system from *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* 81, 523-532.

Harnisch, U., Weiss, H. and Sebald, W. (1985) The primary structure of the iron-sulfur subunit of ubiquinol-cytochrome c reductase from *Neurospora*, determined by cDNA and gene sequencing. *Eur. J. Biochem.* 149, 95-99.

Hartl, F.U. and Neupert, W. (1990) Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247, 930-938.

Hartl, F.U., Schmidt, B., Wachter, E., Weiss, H. and Neupert, W. (1986) Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the FeS protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell* 47, 939-951.

Hartl, F.U., Ostermann, J., Guiard, B. and Neupert, W. (1987) Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting of proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide. *Cell* 51, 1027-1037.

Hartl, F.U., Pfanner, N., Nicholson, D.W. and Neupert, W. (1989) Mitochondrial protein import. *Biochim. Biophys. Acta* 988, 1-45.

Hatefi, Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Ann. Rev. Biochem.* 54, 1015-1069.

Hatefi, Y., Haavik, A.G. and Griffiths, D.E. (1962) Studies on the electron transfer system XLL: Reduced coenzyme Q (QH₂)-cytochrome c reductase. *J. Biol. Chem.* 237, 1681-1685.

Hauska, G., Nitschke, W. and Herrmann, R.G. (1988) Amino acid identities in the three redox center-carrying polypeptides of cytochrome bc₁/b₆f complexes. *J. Bioenerg. Biomem.* 20, 211-228.

Hawkesford, M.J. and Leaver, C.J. (1987) Structure and biogenesis of the plant mitochondrial inner membrane. In: Plant mitochondria: structural, functional and physiological aspects., pp 251-263, Moore, A.L. and Beechy, R.B. (eds), Plenum, New York.

Hawkesford, M.J., Liddell, A.D. and Leaver, C.J. (1989) Subunit composition of cytochrome c oxidase in mitochondria of *Zea mays*. Plant Physiol. 91, 1535-1542.

Hawlitschek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.-U. and Neupert, W. (1988) Mitochondrial protein import: Identification of Processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein. Cell 53, 795-806.

v. Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. EMBO J. 1986, 1335-1342.

Hirel, P.-H., Schmitter, J.-M, Dessen, P., Fayat, G. and Blanquet, S. (1989) Extent of N-terminal methionine excision from *Escherichia coli* proteins is governed by the side-chain length of the penultimate amino acid. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 8247-8251.

Hovmöller, S., Leonard, K. and Weiss, H. (1981) Membrane crystals of subunit complex of mitochondrial cytochrome reductase containing the cytochromes b and c₁. FEBS Lett. 123, 118-122.

Hsu, S.-M., Raine, L. and Fanger, H. (1981): A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. Am. J. Clin. Pathol. 75, 734-738.

Huang, J., Struck, F., Matzinger, D.F. and Levings III, C.S. (1991) Functional analysis in yeast of cDNA coding for the mitochondrial Rieske iron-sulfur protein of higher plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88, 10716-10720.

Hurt, E.C. and van Loon, A.P.G.M. (1986) How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments. TIBS 11, 204-207.

Hutchinson, E.G., Tichelaar, W., Hofhaus, G., Weiss, H. and Leonard, K.R. (1989) Identification and electron microscopic analysis of a chaperonin oligomer from *Neurospora crassa* mitochondria. EMBO J. 8, 1485-1490.

Huynh, T.V., Young, R.A. and Davis, R.W. (1985) Constructing and screening cDNA libraries in Lambda gt10 and Lambda gt11. In: DNA cloning, a practical approach, Vol I, pp 49-78, Glover, D. M. (ed.), IRL Press, Oxford.

Isaya, G., Kalousek, F. and Rosenberg, L.E. (1992) Sequence analysis of rat mitochondrial intermediate peptidase: similarity to zinc metallopeptidases and to a putative yeast homologue. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 8317-8321.

v. Jagow, G., Engel, W.D. and Schägger, H. (1981) On the mechanism of proton translocation linked to electron transfer at the energy conversion site 2. In: Vectorial reactions in electron and ion transport in mitochondria and bacteria, pp 149-161, F. Palmer et al. (eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

v. Jagow, G., Link, T.A., Ohnishi, T. and Schägger, H. (1985) Ubiquinol:cytochrome c reductase, an osmoenzyme consisting of eleven subunits, transferring electrons and conducting hydrogen. In: Achievements and perspectives of mitochondrial research, Vol I, pp 115-126, Quagliariello, E. et al. (eds), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Jensen, R.E. and Yaffe, M.P. (1988) Import of proteins into yeast mitochondria: the nuclear MAS2 gene encodes a component of the processing protease that is homologous to the MAS1-encoded subunit. EMBO J. 7, 3863-3871.

Kadenbach, B., Stroh, A., Hüther, F.J., Reimann, A. and Steverding, D. (1991) Evolutionary aspects of cytochrome c oxidase. J. Bioenerg. Biomem. 23, 321-334.

Kalousek, F., Isaya, G. and Rosenberg, L.E. (1992) Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. EMBO J. 11, 2803-2809.

Karlsson, B., Hovmöller, S., Weiss, H. and Leonard, K. (1983) Structural studies of cytochrome reductase. J. Mol. Biol. 165, 287-302.

Kim, C.H., and King, T.E. (1983) A mitochondrial protein essential for the formation of the cytochrome c_1 -c complex. *J. Biol. Chem.* 258, 13543-13551.

Kleiber, J., Kalousek, F., Swaroop, M. and Rosenberg, L.E. (1990) The general mitochondrial matrix processing protease from rat liver: structural characterization of the catalytic subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 7978-7982.

Koll, H., Guiard, B., Rassow, J., Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. and Hartl, F.U. (1992) Antifolding activity of hsp60 couples protein import into the mitochondrial matrix with export to the intermembrane space. *Cell* 68, 1163-1175.

Kruft, V. (1992) Vergleichende Untersuchungen zur Struktur und Topographie von eubakteriellen und archaebakteriellen Ribosomen. Dissertation an der Freien Universität Berlin.

Kruft, V., Kapp, U. and Wittmann-Liebold, B. (1991) Characterization and primary structure of proteins L28, L33 and L34 from *Bacillus stearothermophilus* ribosomes. *Biochimie* 73, 855-860.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.

Li, Y., de Vries, S., Leonard, K. and Weiss, H. (1981) Topography of the iron-sulphur subunit in mitochondrial ubiquinol:cytochrome c reductase. *FEBS Lett.* 135, 277-280.

Linke, P. and Weiss, H. (1986) Reconstitution of ubiquinol-cytochrome-c reductase from *Neurospora* mitochondria with regard to subunits I and II. *Meth. Enzymol.* 126, 201-210.

Ljungdahl, P.O. and Trumpower, B.L. (1985) Microheterogeneity of core protein 2 in yeast cytochrome bc_1 complex purified by a new method. *Biophys. J.* 47, 196a.

Ljungdahl, P.O., Pennoyer, J.D. and Trumpower, B.L. (1986) Purification of cytochrome bc_1 complexes from phylogenetically diverse species by a single method. *Meth. Enzymol.* 126, 181-191.

van Loon, A.P.G.M. and Schatz, G. (1987) Transport of proteins to the mitochondrial intermembrane space: the "sorting" domain of the cytochrome c₁ presequence is a stop-transfer sequence specific for the mitochondrial inner membrane. *EMBO J.* 6, 2441-2448.

van Loon, A.P.G.M., de Groot, R.J., de Haan, M., Dekker, A. and Grivell, L.A. (1984) The DNA sequence of the nuclear gene coding for the 17 kd subunit VI of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase: a protein with an extremely high content of acidic amino acids. *EMBO J.* 3, 1039-1043.

Lottspeich, F. (1985) High performance liquid chromatography in microsequencing. *Trends Anal. Chem.* 4, 244-246.

Maarse, A.C. and Grivell, L.A. (1987) Nucleotide sequence of the gene encoding the 11-kDa subunit of ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 165, 419-425.

Maarse, A.C., Blom, J., Grivell, L.A. and Meijer, M. (1992) MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *EMBO J.* 11, 3619-3628.

Maeshima, M. and Asahi, T. (1978) Purification and characterization of sweet potato cytochrome c oxidase. *Arch. Biochem. Biophys.* 187, 423-430.

Maeshima, M., Hattori, T. and Asahi, T. (1987) Purification of complexes II and IV from plant mitochondria. *Meth. Enzymol.* 148, 491-501.

Mahler, H.R., Dawidowicz, K. and Feldman, F. (1972) Formate as a specific label for mitochondrial translational products. *J. Biol. Chem.* 247, 7439-7442.

Mannhaupt, G., Beyreuther, K. and Michaelis, G. (1985) Cytochrome b, the var 1 protein, and subunits I and III of cytochrome c oxidase are synthesized without transient presequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 150, 435-439.

Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.

Nakajima, T., Maeshima, M. and Asahi, T. (1984) The subunit composition of sweet potato cytochrome b-c₁ complex. *Agric. Biol. Chem.* 48, 3019-3025.

Needleman, S.B. and Wunsch, C.D. (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J. Mol. Biol.* 48, 443-453.

Neuburger, M., Journet, E.-P., Bligny, R., Carde, J.-P. and Douce, R. (1982) Purification of plant mitochondria by isopycnic centrifugation in density gradients of Percoll. *Arch. Biochem. Biophys.* 217, 312-323.

Neumann, D., Emmermann, M., Thierfelder, J.M., zur Nieden, U., Clericus, M., Braun, H.P., Nover, L. and Schmitz, U.K. (1993) HSP 68 - a DnaK-like heat-stress protein of plant mitochondria. *Planta* 190, 32-43.

Oda, K., Yamato, K., Ohta, E., Nakamura, Y., Takemura, M., Nozato, N., Akashi, K., Kanegae, T., Ogura, Y., Kohchi, T. and Ohyama, K. (1992) Gene organization deduced from the complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* mitochondrial DNA. *J. Mol. Biol.* 223, 1-7.

Ohta, S., Goto, K., Arai, H. and Kagawa, Y. (1987) An extremely acidic amino-terminal presequence of the precursor for the human mitochondrial hinge protein. *FEBS Lett.* 226, 171-175.

Ou, W.J., Ito, A., Okazaki, H. and Omura, T. (1989) Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. *EMBO J.* 8, 2605-2612.

Ouchterlony, Ö. (1958) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis I. *Progr. Allergy* 5, 1-78.

Ouchterlony, Ö. (1962) Diffusion-in-gel methods for immunological analysis II. *Progr. Allergy* 6, 30-154.

Oudshoorn, P., v. Steeg, H., Swinkels, B.W., Schoppink, P. and Grivell, L.A. (1987) Subunit II of yeast QH₂:cytochrome-c reductase. *Eur. J. Biochem.* 163, 97-103.

Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988) Improved tools for biological sequence comparison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 2444-2448.

Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) The mitochondrial protein import apparatus. *Ann. Rev. Biochem.* 59, 331-353.

Pfanner, N., Söllner, T. and Neupert, W. (1991) Mitochondrial import receptors for precursor proteins. *TIBS* 16, 63-67.

Pfeiffer, W.E., Ingle, R.T. and Ferguson-Miller, S. (1990) Structurally unique plant cytochrome c oxidase isolated from wheat germ, a rich source of plant mitochondrial enzymes. *Biochem.* 29, 8696-8701.

Phillips, J.D., Schmitt, M.E., Brown, T.A., Beckmann, J.D. and Trumpower, B.L. (1990) Isolation and characterization of QCR9, a nuclear gene encoding the 7.3-kDa subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex. *J. Biol. Chem.* 265, 20813-20821.

Pollock, R.A., Hartl, F.-U., Cheng, M.Y., Ostermann, J., Horwich, A. and Neupert, W. (1988) The processing peptidase of yeast mitochondria: the two co-operating components MPP and PEP are structurally related. *EMBO J.* 7, 3493-3500.

Prasad, T.K. and Hallberg, R.L. (1989) Identification and metabolic characterization of the *Zea mays* mitochondrial homolog to the *Escherichia coli* groEL protein. *Plant Mol. Biol.* 12, 609-618.

Prasad, T.K. and Stewart, C.R. (1992) cDNA clones encoding *Arabidopsis thaliana* and *Zea mays* mitochondrial chaperonin HSP60 and gene expression during seed germination and heat shock. *Plant Mol. Biol.* 18, 873-885.

Pratje, E. and Guiard, B. (1986) One nuclear gene controls the removal of transient presequences from two yeast proteins: one encoded by the nuclear the other by the mitochondrial genome. *EMBO J.* 5, 1313-1317.

Priest, J.W. and Hajduk, S.L. (1992) Cytochrome c reductase purified from *Crithidia fasciculata* contains an atypical cytochrome c₁. *J. Biol. Chem.* 267, 20188-20195.

Pring, D., Brennicke, A. and Schuster, W. (1993) RNA editing gives a new meaning to the genetic information in mitochondria and chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* 21, 1163-1170.

Riccio, P., Schägger, H., Engel, W.D. and von Jagow, G. (1977) bc₁-complex from beef heart. One-step purification by hydroxyapatite chromatography in Triton X-100, polypeptide pattern and respiration chain characteristics. *Biochim. Biophys. Acta* 459, 250-262.

Rieske, J.S. (1967) Preparation and properties of reduced coenzyme Q-cytochrome c reductase (complex III of the respiratory chain). *Meth. Enzymol.* 10, 239-245.

Rieske, J.S. (1976) Composition, structure, and function of complex III of the respiratory chain. *Biochim. Biophys. Acta* 456, 195-247.

Rieske, J.S. (1986) Experimental observations on the structure and function of mitochondrial complex III that are unresolved by the protonmotive ubiquinone-cycle hypothesis. *J. Bioenerg. Biomembr.* 18, 235-257.

Rieske, J.S. and Zaugg, W.S. (1962) The inhibition by antimycin A of the cleavage of one of the complexes of the respiratory chain. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 8, 421-426.

Rieske, J.S., Baum, H., Stoner, C.D. and Lipton, S.H. (1967) On the antimycin-sensitive cleavage of complex III of the mitochondrial respiratory chain. *J. Biol. Chem.* 242, 4854-4866.

Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M. and Waker, J.E. (1991) Presence of an acyl carrier protein in NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. *FEBS Lett.* 286, 121-124.

Sackmann, U., Zensen, R., Röhlen, D., Jahnke, U. and Weiss, H. (1991) The acyl-carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria is a subunit of NADH:ubiquinone reductase (complex I). *Eur. J. Biochem.* 200, 463-469.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Second Edition.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-termination inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467.

Schägger, H. and v. Jagow, G. (1983) Amino-acid sequence of the smallest protein of the cytochrome c_1 subcomplex from beef heart mitochondria. Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 364, 307-311.

Schägger, H., Borchart, U., Aquila, H., Link, T.A. and v. Jagow, G. (1985) Isolation and amino acid sequence of the smallest subunit of beef heart bc_1 complex. FEBS Lett. 190, 89-94.

Schägger, H., Link, T.A., Engel, W.D. and v. Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the bc_1 complex from beef heart. Meth. Enzymol. 126, 181-191.

Schägger, H., Borchart, U., Machleidt, W., Link, T.A. and v. Jagow, G. (1987) Isolation and amino acid sequence of the "Rieske" iron sulfur protein of beef heart ubiquinol:cytochrome c reductase. FEBS Lett. 219, 161-168.

Schägger, H., Hagen, T., Roth, B., Brandt, U., Link, T.A. and v. Jagow, G. (1990) Phospholipid specificity of bovine heart bc_1 complex. Eur. J. Biochem. 190, 123-130.

Schleyer, B., Schmidt, B. and Neupert, W. (1982) Requirement of a membrane potential for posttranslational transfer of proteins into mitochondria. Eur. J. Biochem. 125, 109-116.

Schmitz, U.K. and Lonsdale, D.M. (1989) A yeast mitochondrial presequence functions as a signal for targeting to plant mitochondria *in vivo*. Plant Cell 1, 783-791.

Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G. and Schatz, G. (1991) Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. EMBO J. 10, 247-254.

Schneider, H., Arretz, M., Wachter, E. and Neupert, W. (1990) Matrix processing peptidase of mitochondria. J. Biol. Chem. 265, 9881-9887.

Schulte, U., Arretz, M., Schneider, H., Tropschug, M., Wachter, E., Neupert, W. and Weiss, H. (1989) A family of mitochondrial proteins involved in bioenergetics and biogenesis. *Nature* 339, 147-149.

Schwartz, R.M. and Dayhoff, M.O. (1978) Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria, and chloroplasts. *Science* 199, 395-403.

Sidhu, A. and Beattie, D.S. (1982) Purification and polypeptide characterization of complex III from yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 7879-7886.

Siedow, J., Power, S., de la Rosa, F.F. and Palmer, P. (1978) The preparation and characterization of highly purified, enzymatically active complex III from baker's yeast. *J. Biol. Chem.* 253, 2392-2399.

Silman, H.I., Rieske, J.S., Lipton, S.H. and Baum, H. (1967) A new protein component of complex III of the mitochondrial electron transfer chain. *J. Biol. Chem.* 242, 4867-4875.

Stonehuerner, J., O'Brien, P., Geren, L., Millett, F., Steidl, J., Yu, L. and Yu, C.-A. (1985) Identification of the binding site on cytochrome c_1 for cytochrome c . *J. Biol. Chem.* 260, 5392-5398.

Terzi, E., Boyot, P., van Dorsselaer, A., Luu, B. and Trifilieff, E. (1991) Revision of the amino acid sequence of the smallest bc_1 complex subunit: use of fast atom bombardment mass spectrometry and mass-analysed ion kinetic energy spectrum analysis. *Biol. Mass Spectrom.* 20, 232-236.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.

Trumpower, B.L. (1990a) Cytochrome bc_1 complexes of microorganisms. *Microbiol. Rev.* 54, 101-129.

Trumpower, B.L. (1990b) The protonmotive Q cycle. *J. Biol. Chem.* 265, 11409-11412.

Tsunasawa, S., Stewart, J.W. and Sherman, F. (1985) Amino-terminal processing of mutant forms of yeast iso-1-cytochrome c. *J. Biol. Chem.* 260, 5382-5391.

Tzagoloff, A., Wu, M. and Crivellone, (1986) Assembly of the mitochondrial membrane system. *J. Biol. Chem.* 261, 17163-17169.

Vestweber, D. and Schatz, G. (1988) A chimeric mitochondrial precursor protein with internal disulfide bridges blocks import of authentic precursors into mitochondria and allows quantitation of import sites. *J. Cell Biol.* 107, 2037-2043.

Vidal, V., Ranty, B., Dillenschneider, M., Charpentreau, M. and Ranjeva, R. (1993) Molecular characterization of a 70 kDa heat-shock protein of bean mitochondria. *Plant J.* 3, 143-150.

Wakabayashi, S., Matsubara, H., Kim, C.H., Kawai, K. and King, T.E. (1980) The complete amino acid sequence of bovine heart cytochrome c₁. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 97, 1548-1554.

Wakabayashi, S., Takeda, H., Matsubara, H., Kim, C.H. and King, T. E. (1982) Identity of the heme-not-containing protein in bovine heart cytochrome c₁ preparation with the protein mediating c₁-c complex formation - a protein with high glutamic acid content. *J. Biochem.* 91, 2077-2085.

Wakabayashi, S., Takao, T., Shimonishi, Y., Kuramitsu, S., Matsubara, H., Wang, T., Zhang, Z. and King, T.E. (1985) Complete amino acid sequence of the ubiquinone binding protein (QP-C), a protein similar to the 14,000-dalton subunit of the yeast ubiquinol-cytochrome c reductase complex. *J. Biol. Chem.* 260, 337-343.

Wan, Y.P. and Folkers, J. (1978) Coenzyme Q and analogs for coenzymic activity. *Methods Enzymol.* 53, 591-599.

Watts, F.Z., Walters, A.J. and Moore, A.L. (1992) Characterization of PHSP1, a cDNA encoding a mitochondrial HSP70 from *Pisum sativum*. *Plant Mol. Biol.* 18, 23-32.

Weiss, H. (1987) Structure of mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase (complex III). *Curr. Top. in Bioenerget.* 15, 67-90.

Weiss, H. and Juchs, B. (1978) Isolation of a multiprotein complex containing cytochrome b and c₁ from *Neurospora crassa* mitochondria by affinity chromatography on immobilized cytochrome c. *Eur. J. Biochem.* 88, 17-28.

Weiss, H. and Kolb, J. (1979) Isolation of mitochondrial succinate: ubiquinone reductase, cytochrome c reductase and cytochrome c oxidase from *Neurospora crassa* using nonionic detergent. *Eur. J. Biochem.* 99, 139-149.

Weiss, H. and Ziganke, B. (1974) Cytochrome b in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 41, 63-71.

Weiss, H., Leonard, K. and Neupert, W. (1990) Puzzling subunits of mitochondrial cytochrome reductase. *TIBS* 15, 178-180.

Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. and Preis, D. (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* 197, 563-576.

Whelan, J., Dolan, L. and Harmey, M.A. (1988) Import of precursor proteins into *Vicia faba* mitochondria. *FEBS Lett.* 236, 217-220.

Whelan, J., O'Mahony, P. and Harmey, M.A. (1990) Processing of precursor proteins by plant mitochondria. *Arch. Biochem. Biophys.* 279, 281-285.

White, J.A. and Scandalios, G. (1988) Isolation and characterization of a cDNA for mitochondrial manganese superoxide dismutase (SOD-3) of maize and its relation to other manganese superoxide dismutases. *Biochim. Biophys. Acta* 951, 61-70.

Wingfield, P., Arad, T., Leonard, K. and Weiss, H. (1979) Membrane crystals of ubiquinone:cytochrome c reductase from *Neurospora* mitochondria. *Nature* 280, 696-697.

Wingfield, P., Graber, P., Turcatti, G., Movva, N.R., Pelletier, M., Craig, S., Rose, K. and Miller, C.G. (1989) Purification and characterization of a

methionine-specific aminopeptidase from *Salmonella typhimurium*. Eur. J. Biochem. 180, 23-32.

Witte, C., Jensen, R.E., Yaffe, M.P. and Schatz, G. (1988) MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease. EMBO J. 7, 1439-1447.

Yang, M., Jensen, R.E., Yaffe, M.P., Oppliger, W. and Schatz, G. (1988) Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes. EMBO J. 7, 3857-3862.

Yu, L. and Yu, C.A. (1982) The interaction of arylazido ubiquinone derivative with mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase. J. Biol. Chem. 257, 10215-10221.

Zanlungo, S., Litvak, S. and Jordana, X. (1991) Isolation and nucleotide sequence of the potato mitochondrial gene for apocytochrome b. Plant Mol. Biol. 17, 527-530.

Zimmermann, R. and Neupert, W. (1980) Transport of proteins into mitochondria. Eur. J. Biochem. 109, 217-229.

Zweck, A., Bechmann, G. and Weiss, H. (1989) The pathway of the quinol/quinone transhydrogenation reaction in ubiquinol:cytochrome-c reductase of *Neurospora* mitochondria. Eur. J. Biochem. 183, 199-203.

7. ANHANG

Abkürzungen

A	Adenosin
Ac	Acetat
ADP	Adenosindiphosphat
ANT	"Adenine Nucleotide Translocase"
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
AS	Aminosäure
BPB	Brom-Phenol-Blau
BSA	Rinderserumalbumin
C	Cytidin
cDNA	copy DNA (aus reverser Transkription von RNA)
COX	Cytochrom c Oxidase
CR	Cytochrom c Reduktase
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Aminosäuresequenz
Cyt	Cytochrom
DAB	3,3'-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid
DCCD	Dicyclohexylcarbodiimid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EtOH	Ethanol
FeS-Protein	Eisen-Schwefel-Protein
FPLC	"Fast Protein Liquid Chromatography"
g	Erdbeschleunigung
G	Guanosin
GIP	"General Insertion Protein"
GuHCl	Guanidiniumhydrochlorid
HPLC	"High Performance Liquid Chromatography"
HSP	"Heat Shock Protein"
IgG	Antikörper der Klasse G
IM	"Inner Membrane"
IMP	"Inner Membrane Protease"
IMS	"Intermembrane Space"
kb	Kilobasen
kd	Kilodalton

Lys C	<i>Lysobacter enzymogenes</i> Protease
Ma	Matrix
MAS	"Mitochondrial Assembly Mutation"
Me	Membran
MIP	"Mitochondrial Intermediate Protease"
MOM	"Mitochondrial Outer Membrane"
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	"Matrix Processing Peptidase"
mRNA	messenger-RNA
mt	mitochondrial(e)
MW	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus einer Aminosäuresequenz
OM	"Outer Membrane"
OPOE	Octyl-Polyoxyethylen
ORF	"Open reading frame"
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PEP	"Processing Enhancing Protein"
P _i	Anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTH	Phenylthiohydantoin-(Derivate von AS)
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PVP	Polyvinylpyrrolidone
Q	Quinon
QH ₂	Quinol
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	"rounds per minute"
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOD	Superoxiddismutase
SU	"Subunit"
T	Thymidin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TFA	Trifluoressigsäure
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
ün	über Nacht
xg	x-faches der Erdbeschleunigung

Abkürzungen für Maßeinheiten entsprechen den allgemein üblichen Regeln

Abkürzungen für Aminosäuren

A	Ala	Alanin	V	Val	Valin
R	Arg	Arginin	L	Leu	Leucin
N	Asn	Asparagin	K	Lys	Lysin
D	Asp	Asparaginsäure	M	Met	Methionin
C	Cys	Cystein	F	Phe	Phenylalanin
Q	Gln	Glutamin	P	Pro	Prolin
E	Glu	Glutaminsäure	S	Ser	Serin
G	Gly	Glycin	T	Thr	Threonin
H	His	Histidin	W	Trp	Typtophan
I	Ile	Isoleucin	Y	Tyr	Tyrosin

<u>Glossar</u>	Worterkklärungen für molekularbiologische Fachbegriffe im Sinne der Verwendung in der vorliegenden Dissertation:
Alignment	Ausrichtung von homologen Aminosäuresequenzen gemäß ihren Identitäten
Assay	experimenteller Ansatz zur Bestimmung enzymatischer Aktivitäten <i>in vitro</i>
blotten	Transferieren von Molekülen von Gelsystemen auf Filterträger
Eluat	Molekülgemisch, das aus einer Säule heraustritt
Enhancer	Verstärker
Flow-through	Anteil eines Molekülgemisches, der bei chromatographischer Auftrennung nicht an das verwendete Säulenmaterial bindet
Insert	klonierte DNA in einem Vektor
Open reading frame	offenes Leseraster einer DNA-Sequenz
Peak	"Gipfel" einer chromatographischen Molekülaufreinigung
Precursor	Vorläufer-Protein
Processing	"Reifung" eines Vorläufer-Proteins (Abtrennung der Leitsequenz)
Screening	Durchsuchen einer Genbank
Slot	Geltasche zum Auftragen eines Molekülgemisches bei der Gelelektrophorese
Subunit	Untereinheit
Targeting	zielgerichteter Transport von Molekülen in der Zelle
Turnover	Umsatz bei einer chemischen Reaktion

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

