

Biochemische Charakterisierung von mitochondrialen Teilproteomen und Proteinkomplexen in Pflanzen

Vom Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte

Dissertation

von

Wolf-Hubertus Werhahn

geboren am 28.07.1971 in Hannover

2003

Referent: Prof. Dr. Hans-Peter Braun
Koreferent: PD Dr. Bernhard Huchzermeyer
Tag der Promotion: 11.12.2002

*Diese Arbeit widme ich meinen Eltern, die mich stets
rückhaltlos unterstützt haben.*

Vorwort

Die vorliegende Dissertation wurde zwischen August 1998 und Oktober 2002 in der Abteilung Angewandte Genetik des Institutes für Zierpflanzenbau, Baumschule und Pflanzenzüchtung der Universität Hannover angefertigt. Dem Leiter dieser Abteilung, Herrn Prof. Dr. Udo Klaus Schmitz, danke ich herzlich für die guten Arbeitsbedingungen in seinem Labor.

Von vielen Seiten habe ich Hilfe erhalten, ohne die es mir nicht möglich gewesen wäre, diese Arbeit anzufertigen.

Dafür danke ich insbesondere

Herrn Prof. Dr. Hans-Peter Braun, der meine Arbeit mit sehr viel Einsatz und großer Fachkenntnis betreute. Seine Begeisterung für die wissenschaftliche Forschung wird mir stets Ansporn sein.

Frau Dagmar Lewejohann, auf deren Mitdenken und Einsatz während der gesamten Dauer meiner Arbeit in der Angewandten Genetik Verlaß war und Frau Gabi Kühne, deren Zeit bei uns leider viel zu kurz war.

Frau Astrid Petersmann; sie machte die Betreuung ihrer Diplomarbeit zu einem Vergnügen, sowohl menschlich, als auch fachlich

Herrn PD Dr. Bernhard Huchzermeyer, Frau Dr. Jutta Papenbrock und besonders Frau Nicole Hausmann für die gute Zusammenarbeit beim Isolieren von pflanzlichen Mitochondrien und bei der Überprüfung von deren Reinheit.

Herrn Dr. Lothar Jänsch, meinem Vorgänger bei der Untersuchung pflanzlicher TOM-Komplexe, der für diese Arbeit die massenspektrometrischen Analysen vornahm.

Herrn Dr. Volker Kruft für die große Sorgfalt, mit der er die Aminosäure-Sequenzierungen für diese Arbeit durchführte.

Und meinen Kollegen Frau Dr. Christina Mihr, Herrn Holger Eubel, Herrn Jens Dieterich und Herrn Marc Urban, mit denen die Arbeit im Labor und außerhalb immer viel Spaß machte.

Sowie der Universität Hannover, die meine Dissertation mit einem Stipendium gefördert hat

Teile dieser Arbeit sind in folgende Publikationen eingegangen:

Werhahn, W., Jansch, L. and Braun, H.-P. (2003)

„Identification of novel subunits of the TOM complex from *Arabidopsis thaliana*.“

Plant Physiol. Biochem. 41, 407-416

Hausmann, N., Werhahn, W., Huchzermeyer, B., Braun, H.P. and Papenbrock, J. (2003)

„How to document the purity of mitochondria prepared from green tissue of tobacco, pea and *Arabidopsis thaliana*.“

Phyton 43,215-229.

Werhahn, W. and Braun, H.P. (2002)

„Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from *Arabidopsis thaliana* by three-dimensional gel electrophoresis.“

Electrophoresis 23 (4), 640-646.

Kruft, V., Eubel, H., Werhahn, W., Jansch, L. and Braun, H.P. (2001)

„Proteomic approach to identify novel mitochondrial functions in *Arabidopsis thaliana*.“

Plant Physiol. 127, 1694-1710.

Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (2001)

„Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis thaliana*: identification of multiple forms of TOM20.“

Plant Physiol. 125, 943-954.

Kügler, M., Brumme, S., Jansch, L., Werhahn, W., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (1998)

„Characterization of plant mitochondria by blue native polyacrylamide gelelectrophoresis (BN-PAGE).“

In: Plant mitochondria: From gene to function, 273-276, Moller, I.M., Gardeström, P.,

Glimelius, K. and Glaser, E. (eds), Blackhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
<hr/>		
2	EINLEITUNG	3
<hr/>		
2.1	Mitochondrien: Abstammung und Funktion	3
2.2	Proteinimport in Mitochondrien	8
2.3	Die Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM)	13
2.4	Zielsetzung	17
3	MATERIAL & METHODEN	18
<hr/>		
3.1	Verwendete Materialien	18
3.1.1	Chemikalien	18
3.1.2	Versuchsorganismen	18
3.2	Anzucht von Versuchsorganismen	19
3.2.1	Anzucht von <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Pisum sativum</i> & <i>Nicotiana tabacum</i> Pflanzen	19
3.2.2	Kultivierung von <i>Arabidopsis thaliana</i> in einer Suspensionskultur	19
3.3	Mitochondrienpräparationen	20
3.3.1	Präparation von Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Pflanzen	20
3.3.2	Präparation von Mitochondrien aus <i>Arabidopsis thaliana</i> Zellkulturen	21
3.3.3	Präparation von Mitochondrien aus <i>Pisum sativum</i>	22
3.3.4	Präparation von Mitochondrien aus <i>Nicotiana tabacum</i>	23
3.3.5	Präparation von Mitochondrien aus Kartoffelknollen	24
3.4	Beurteilung der Sauberkeit mitochondrialer Fraktionen	25
3.4.1	Chlorophyll-Messung	25
3.4.2	Physiologische Messungen	25
3.4.2.1	Fumarase-Messung	25
3.4.2.2	Messung des Sauerstoffverbrauchs isolierter Mitochondrien	26
3.5	Trypsinieren von Mitochondrien	26
3.6	Präparation von äußeren Mitochondrienmembranen	27
3.7	Aufreinigung von Eiweißfraktionen	29
3.7.1	Eiweißfällung von Gesamtprotein für die IEF (TCA/Aceton)	29
3.7.2	Phenolextraktion und Fällung von Eiweißen für die IEF	29
3.8	Grundmethoden der Proteinanalyse	30
3.8.1	Proteinbestimmung	30
3.8.2	Tricin-SDS-PAGE	31

3.8.3	Isoelektrische Fokussierung (IEF)	32
3.8.4	Tricin-SDS-PAGE als zweite Dimension einer IEF	33
3.8.5	Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie	33
3.8.6	MALDI-TOF Massenspektrometrie	34
3.8.7	Coomassie-Färbung	36
3.8.8	Coomassie-colloidal Färbung	36
3.8.9	Silberfärbung	37
3.8.10	Western-Blotting	37
3.8.11	Immunfärbung	39
3.8.12	Proteinsequenzierung	39
3.9	Blue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)	41
3.10	Tricin-SDS-PAGE als zweite Dimension einer BN-PAGE	44
3.11	Elektroelution	45
3.12	3D-PAGE	45
3.13	Grundtechniken zur Analyse von DNA	47
3.14	Computer-Auswertungen	47
4	ERGEBNISSE	50
4.1	Überprüfung der Reinheit von Mitochondrienpräparationen aus grünem Pflanzengewebe	50
4.1.1	Biochemische und physiologische Verfahren zur Analyse von Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe	51
4.1.2	Gelelektrophoretische Verfahren zur Analyse von Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe	54
4.2	Analyse des mitochondrialen Proteoms von <i>Arabidopsis thaliana</i>	59
4.3	Analyse des Proteoms der äußeren Mitochondrienmembran von <i>Arabidopsis thaliana</i>	62
4.4	Analyse einzelner Proteinkomplexe mittels dreidimensionaler Gelelektrophorese	66
4.5	Charakterisierung der Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran	71
4.5.1	Die einzelnen Proteinuntereinheiten der Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran	75
4.5.2	TOM40	77
4.5.3	TOM20	78
4.5.4	TOM22	83
4.5.5	Die kleinen TOM-Proteine TOM5, TOM6 und TOM7	84

5	DISKUSSION	90
<hr/>		
5.1	Biochemische und physiologische Verfahren zur Analyse von Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe	90
5.2	Analyse des mitochondrialen Proteoms von <i>Arabidopsis thaliana</i>	91
5.2.1	Analyse einzelner Proteinkomplexe mittels dreidimensionaler Gelelektrophorese	92
5.3	Charakterisierung der Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran von <i>Arabidopsis</i>	93
5.3.1	Die Proteinuntereinheiten der Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran	95
5.3.1.1	TOM40	97
5.3.1.2	TOM20	98
5.3.1.3	TOM22	101
5.3.1.4	Die kleinen TOM-Proteine TOM5, TOM6 und TOM7	101
5.3.2	Proteintransport durch die äußere Mitochondrienmembran	104
6	LITERATUR	106
<hr/>		
7	ANHANG	121
<hr/>		

Schlagwörter:

Teilproteom, Mitochondrien, Proteinimport

Keywords:

subproteome, mitochondria, protein import

1 Zusammenfassung

Pflanzenmitochondrien zeichnen sich, im Vergleich zu Mitochondrien aus Tieren und Pilzen, durch zahlreiche Zusatzfunktionen aus. Folglich kommen in Pflanzenmitochondrien auch besonders viele unterschiedliche Proteine vor. Um pflanzenspezifische Funktionen näher zu charakterisieren und systematisch nach weiteren noch unbekanntem Funktionen von Mitochondrien in Pflanzenzellen zu suchen, wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein breit angelegtes proteinchemisches Projekt zur Charakterisierung von Pflanzenmitochondrien begonnen, das auf der Proteomtechnologie basiert

Eine Grundvoraussetzung für alle Proteomanalysen ist hochreines Ausgangsmaterial. Deshalb wurde zuerst die Isolierung von Mitochondrien aus grünem Pflanzengewebe und aus nicht-grünen Zellkulturen optimiert. Zur Überprüfung der Reinheit der Isolate wurde eine Methodenstrategie etabliert, die eventuelle Kontaminationen mit hoher Sicherheit anzeigt.

Das Gesamtproteom pflanzlicher Mitochondrien ist zu groß, um es als Ganzes zu charakterisieren. Deshalb wurde das Gesamtproteom in dieser Arbeit in definierte Subproteome unterteilt. Als Subproteome dienten dabei einerseits die äußere bzw. innere Mitochondrienmembran, andererseits wurden Proteinkomplexe als noch kleinere Subproteome präpariert. Zu letzterem Zweck wurde eine neue Methode (3D-PAGE) entwickelt, die auf einer Kombination von drei verschiedenen Gelelektrophoreseverfahren basiert. Mit dieser Methode können Proteinkomplexe nicht nur in ihre Untereinheiten, sondern Proteinkomplexuntereinheiten auch in Isoformen aufgetrennt werden

Ein Proteinkomplex, der bei Pflanzen viele Besonderheiten aufweist, ist die Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM). Dieser Proteinkomplex dient der Erkennung der vielen kernkodierte mitochondrialen Proteine sowie deren Transport durch die äußere Mitochondrienmembran. TOM von Arabidopsis wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation komplett charakterisiert. Im Unterschied zu bekannten TOM-Komplexen besitzt TOM von Arabidopsis nur ein Rezeptorprotein (Pilze haben bis zu fünf), obwohl der Proteinimport bei Pflanzen wegen der vielen verschiedenen Organellen, besonders genau geregelt werden muß. Zudem fehlt einer Untereinheit des TOM-Komplexes (TOM22) von Arabidopsis eine saure cytoplasmatische Domäne, der bei Pilzen und Tieren wichtige Funktionen beim Proteinimport zugeschrieben werden.

Abstract

Plant mitochondria have several additional functions if compared to mitochondria from animals and fungi. Therefore, plant mitochondria contain a large number of different proteins. A broad project to characterise the mitochondrial proteome from plants was started to analyse these plant specific functions and search for new functions. Basis of the project is the proteome technology.

One main requirement for proteome analyses are highly purified protein fractions. So, this work starts with the optimisation of isolation procedures for mitochondria from green plants and non-green cell suspension cultures. A new strategy to analyse the purity of isolated mitochondria was established. Using these methods, contaminations with other organelles can be detected with high confidence.

The total mitochondrial proteome from plants is too complex to be analysed at once. Hence defined subsets of proteins (subproteoms) were generated for further analysis. The chosen subproteomes were those of the outer and inner mitochondrial membrane and even smaller subproteomes based on protein complexes. A new method - which combines three different gel electrophoresis procedures (3 D-PAGE) - was established to prepare protein complexes. The 3 D-PAGE offers the possibility to characterise all proteins forming part of a protein complex, including all isoforms or modified forms of single proteins.

The preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane (TOM) differs significantly from its counterparts in animals and fungi. This complex recognises nuclear-encoded mitochondrial proteins and mediates their transport across the outer mitochondrial membrane. Here I report the complete characterisation of the TOM complex from *Arabidopsis thaliana*. The most notable feature of the Arabidopsis TOM complex is its single receptor protein. TOM complexes from fungi comprise up to five different receptor proteins. This is especially remarkable as plant cells contain a lot of different organelles, all of which import proteins in similar ways, so the protein import has to be highly regulated.

The TOM subunit TOM22 from animals and fungi has a acidic cytosolic domain which is predicted to play a major role in protein import. The TOM22 protein from Arabidopsis lacks this domain, so the protein import pathway into plant mitochondria seems to differ mechanistically from the pathways used in animals and fungi.

2 Einleitung

2.1 Mitochondrien: Abstammung und Funktion

Durch Mutation und Selektion entstand die Vielfalt der heutigen Zelltypen und Lebewesen. Durch die Zusammenlagerung von Lipiden und Proteinen formten sich zufällig membranartige Strukturen die abgegrenzte Reaktionsräume bildeten, in denen Polynukleotide und Polypeptide gefangen waren und aus denen sich vor ca. 3,7 Millionen Jahren die ersten sich selbst replizierenden Urzellen entwickelten. So ist zunächst die prokaryotische Zelle durch die Evolution entstanden: eine noch relativ einfache Zelle, umgeben von einer Lipiddoppelschicht ohne weitere Unterteilungen (z.B. Organellen). Durch die Membran war ein geschützter Reaktionsraum entstanden in dem einzelne Enzyme dicht beieinander lagen, ohne von zufälligen Strömungen getrennt zu werden. So konnten sich stabile Stoffwechselwege entwickeln, die nicht mehr durch Einflüsse von außerhalb gestört wurden. Erst jetzt war eine effiziente Energiegewinnung möglich, die es der Zelle ermöglichte, weitere Funktionen zu entwickeln und somit zunehmend komplexere Strukturen und Stoffwechselwege aufzubauen. Durch die Entwicklung von genetischem Erbmaterial - zunächst nur RNA, später auch die stabilere DNA - wurde die Zelle in die Lage versetzt, die für sie wichtigen Informationen zu speichern und an die Nachkommen weiter zu geben. Ob es eine Urzelle (die sog. Progenote) gab, aus der sich alle Zelltypen entwickelt haben, oder ob die drei Reiche („Regna“), in die die heutigen Organismen unterteilt werden, unterschiedliche Vorfahren haben ist Gegenstand aktueller Diskussion.

Die Regna Archaea und Eubacteria werden als Prokaryonten bezeichnet und damit den Eukaryonten - dem Regnum Eukaryota - gegenübergestellt. Das Regnum Eukaryota ist das jüngste der drei Reiche, es entstand vor ca. 1,2 bis 1,5 Milliarden Jahren. Die eukaryontischen Zellen sind im Gegensatz zu den prokaryontischen durch zweischichtige Lipid-Protein-Membranen - sog. Elementarmembranen - untergliedert, die die freie Diffusion größerer organischer Moleküle verhindern. Dadurch werden zahlreiche verschiedene Reaktionsräume oder Kompartimente gebildet. Chemische Reaktionen können in diesen Kompartimenten voneinander räumlich getrennt ablaufen, eine Spezialisierung dieser einzelnen Zellkompartimente mit komplexeren und effizienteren Stoffwechselwegen wurde so möglich. Die DNA der Eukaryonten - der Träger der Erbinformationen - befindet sich in einem

speziellen Zellkompartiment, dem Zellkern, nach dem das ganze Regnum benannt ist (*grch.*: eu: echt; karyon: Kern). Zu den als Organellen bezeichneten Zellkompartimenten zählen die Mitochondrien, die Chloroplasten und die Peroxisomen. Das Kennzeichen der Peroxisomen, die auch als Microbodies bezeichnet werden, ist ihr Gehalt an flavinhaltigen Oxidasen. Chloroplasten treten nur bei photoautotrophen Organismen auf. Sie sind die Orte der Photosynthese. In den Mitochondrien findet die zelluläre Atmung statt, weshalb sie umgangssprachlich als „Kraftwerke der Zelle“ bezeichnet werden. Sie erfüllen außerdem viele Stoffwechselfunktionen (Attardi und Schatz, 1988).

Laut Endosymbiontenhypothese (Schwartz und Dayhoff, 1978) stammen die Mitochondrien und Chloroplasten von Prokaryonten ab, die vor ca. 1,2 bis 1,5 Milliarden Jahren von einem amöboiden Urkaryonten phagozytiert wurden. Nach Sequenzvergleichen und Stammbaumanalysen wurde die Theorie entwickelt, daß Chloroplasten von Cyanobakterien und Mitochondrien von Purpurbakterien abstammen. Im Laufe der Evolution haben Wirtszelle und Symbiont ihren Stoffwechsel so weit aufeinander abgestimmt, daß es zu einem Autonomieverlust und somit zu einer Symbiose beider Zellen kam. Die Mitochondrien wurden zu einem Zeitpunkt in den Urkaryonten aufgenommen, als die sauerstofffreie Atmosphäre durch die photosynthetischen Cyanobakterien in eine sauerstoffreiche umgewandelt wurde. Für die Wirtszelle lagen die Vorteile dieser Symbiose wahrscheinlich darin, daß sie vor toxischen Sauerstoffverbindungen geschützt wurde und, daß durch die Respiration des Mitochondriums ihre Energieausbeute erhöht wurde (de Duve, 1996).

Zahlreiche morphologische und physiologische Ähnlichkeiten zwischen Mitochondrien und Prokaryonten stützen die Endosymbiontenhypothese. Mitochondrien gleichen in Größe und Form den Prokaryonten und vermehren sich aus sich selbst durch Teilung. Die innere Mitochondrienmembran enthält Cardiolipin und eine ATP-Synthase, die sonst nur von Prokaryonten bekannt sind. Sie soll aus der ursprünglichen Membran des phagozytierten Prokaryonten entstanden sein, während die äußere Membran sich durch den Phagozytose-Prozeß von der Wirtszelle abgeschnürt hat (John und Whatley, 1975). Mitochondrien haben ein eigenes Genom, das nicht mit Histonen assoziiert ist. Der genetische Code der Mitochondrien weicht in einigen Teilen vom „universellen“ genetischen Code ab. So bewirkt z.B. das Stop-Codon UGA in Hefe-Mitochondrien den Einbau von Tryptophan (Trp). Ihrer mRNA fehlen die für eukaryontische Transkripte typischen Cap-Strukturen und Poly-A-Schwänze. Die Translation findet an - für Prokaryonten typischen - 70S-Ribosomen statt und

beginnt mit Formyl-Methionin, was für Eubakterien typisch ist. Auch ihr Fettsäuresystem entspricht dem der Prokaryonten (Jordan et al., 1997; Schneider et al., 1997).

Mitochondrien sind sehr plastische Organellen von meist länglicher Form, die eine Länge von 2 bis 8 μm und einem Durchmesser zwischen 0,2 und 1 μm haben. Ihre Dichte beträgt 1,17 - 1,23 g pro cm^3 . Je nach Zelltyp und physiologischem Zustand der Zelle unterscheiden sie sich in Größe und Form. Sie sind von zwei unabhängigen Membransystemen umgeben, die sich deutlich in ihrer chemischen Zusammensetzung und Funktion unterscheiden. Diese Membranen stehen nicht mit den anderen Membranen der Zelle in Verbindung.

Mitochondrien sind also in zwei Kompartimente unterteilt: Den nicht plasmatischen Intermembranraum zwischen der äußeren (OM) und der inneren Membran (IM) und den plasmatischen Innenraum - die mitochondriale Matrix (s. Abb. 1).

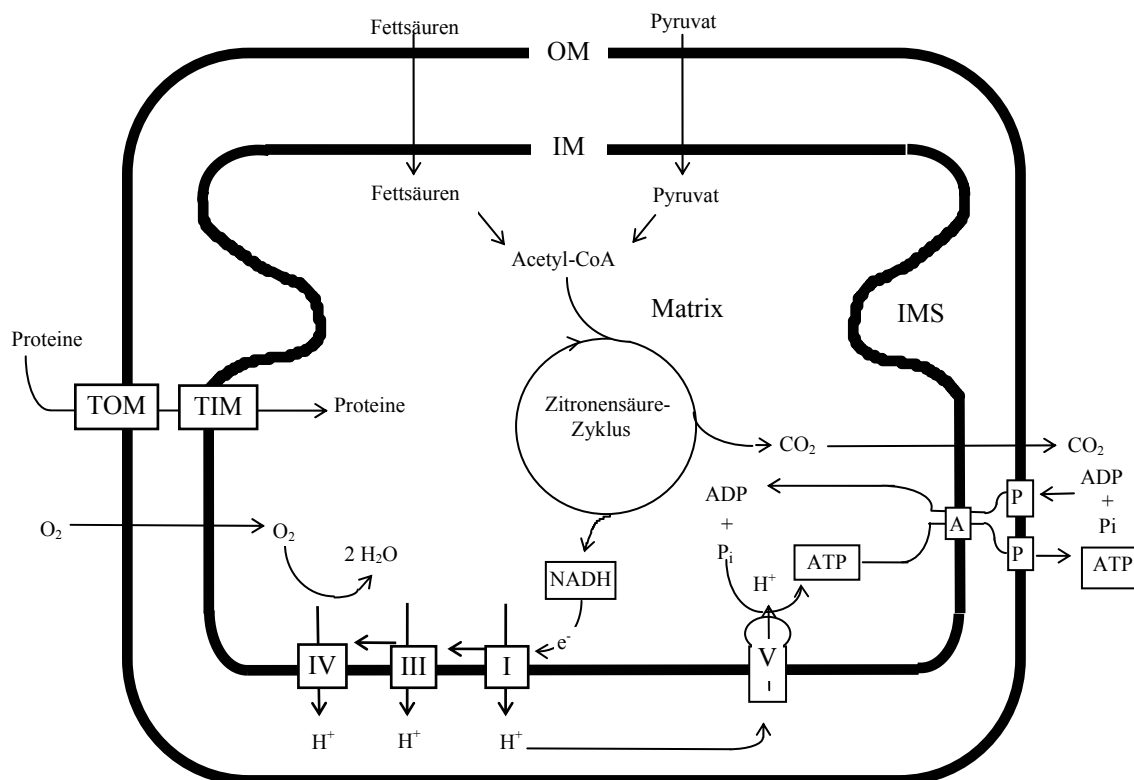


Abb. 1 Mitochondrium, Schema

(nach Jänsch, 1998a; modifiziert)

A: ADP-ATP-Translokator; IM: Innere Mitochondrienmembran; IMS: Intermembranraum; OM: Äußere Mitochondrienmembran; P: Porin; TIM: Präproteintranslokase der inneren Mitochondrienmembran; TOM: Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran; I, II, IV und V: Komplexe der Atmungskette

Die äußere Membran ist durchlässig für Ionen und kleine Proteine bis zu etwa 6 kDa. Das integrale Membranprotein Porin (~ 30 kDa) bildet Poren, durch welche sie diffundieren können. Porin ist das häufigste Protein der relativ proteinarmen äußeren Membran (Mihara and Sato, 1985).

Der Intermembranraum ist proteinarm und enthält unter anderem die Adenylat-Kinase, die die Reaktion $2 \text{ADP} \leftrightarrow \text{AMP} + \text{ATP}$ katalysiert.

Die innere Membran ist stark gefaltet und bildet zur Oberflächenvergrößerung in die Matrix ragende Cristae aus. Sie ist impermeabel für nahezu alle Ionen und polaren Moleküle und stellt die eigentliche Diffusionsbarriere zwischen Matrix und Cytoplasma dar. Der intensive Metabolitaustausch zwischen IMS und Matrix erfolgt durch selektive Transportprozesse mittels der zahlreichen Translokasen der inneren Membran (El Moulaj et al., 1997). Die innere Membran muß eine so geringe Permeabilität aufweisen, da über sie ein zur Energiegewinnung wichtiger Protonengradient aufrechterhalten wird.

Die wichtigste Funktion der Mitochondrien ist die ADP-Regeneration. Die in Stufen ablaufende Übertragung der Elektronen vom NADH und FADH_2 zum Sauerstoff führt dazu, daß Elektronen aus der Matrix herausgepumpt werden. Dabei wird eine protonenmotorische Kraft erzeugt, die sich aus einem pH-Gradienten und einem elektrischen Potential über die Membran zusammensetzt (Mitchel, 1961). ADP wird zu ATP phosphoryliert, wenn die Protonen durch die membranständige F_0F_1 -ATP-Synthase zurückfließen. Die Enzymkomplexe der Atmungskette sind im einzelnen: NADH-Dehydrogenase [NADH-Ubiquinon-Oxidoreduktase] (Komplex I), FADH_2 -Reduktase [FADH_2 -Ubiquinon-Oxidoreduktase] (Komplex II), Cytochrom c-Reduktase [Ubiquinon-Cytochrom c-Oxidoreduktase] (Komplex III), Cytochrom c-Oxidase [Cytochrom c- O_2 -Oxidoreduktase] (Komplex IV) und die F_0F_1 -ATP-Synthase (Komplex V).

In der mitochondrialen Matrix sind viele Stoffwechselwege lokalisiert, die Reduktionsäquivalente für die ATP-Synthese bereitstellen. Die wichtigsten Lieferanten von Reduktionsäquivalenten sind der Zitronensäurezyklus und die Fettsäureoxidation, aber auch Teile des Harnstoff-Zyklus und die oxidative Decarboxylierung tragen zur Bildung von Reduktionsäquivalenten bei. In den Matrixgranula finden sich Calcium- und Magnesiumionen. Das Chondriom liegt meist in mehreren Kopien in der Matrix vor, ebenso wie der Apparat zur Replikation, Transkription und Translation der mtDNA. Unabhängig von

der Chondriomgröße bei den verschiedenen Organismen besitzen sie den gleichen Informationsgehalt, es werden immer die gleiche Anzahl von Proteinen und RNAs codiert.

Um alle die beschriebenen Funktionen wahrnehmen zu können, benötigen die Mitochondrien von Hefe ca. 500 verschiedene Proteine, die größtenteils im Kerngenom kodiert sind und posttranslational in die Mitochondrien importiert werden (Rehling et al., 2001).

Pflanzliche Mitochondrien haben dagegen bis zu 3000 Proteine. Dies ist darin begründet, dass pflanzliche Mitochondrien viele zusätzliche Funktionen haben (Mackenzie and MacIntosh, 1999; Rasmusson et al., 1999). Sie sind nicht nur indirekt an der Photosynthese beteiligt – die Decarboxylierung von Glycin, ein wichtiger Schritt bei der Photorespiration, findet in den Mitochondrien statt (Raghavendra et al., 1998) -, sondern haben Enzyme und Synthesewege, die bei nicht-pflanzlichen Mitochondrien nicht existieren. So z. B. einen Sonderweg bei der Malat-Oxidation, der ein NAD-abhängiges Enzym verwendet, das in tierischen und pilzlichen Mitochondrien nicht vorkommt. Auch bei der Atmungskette von Pflanzen-Mitochondrien gibt es Sonderwege: eine zusätzliche Oxidase ermöglicht eine CN-unempfindliche Atmung und eine alternative NADH-Dehydrogenase kann sowohl internes als auch externes NAD oder NADH als Substrat verwenden (Vanlerberghe and McIntosh, 1997; Rasmusson et al., 1999). Die mitochondriale Prozessierungsprotease (MPP) ist bei höheren Pflanzen Teil des Cytochrom c-Reduktase-Komplexes, während sie bei Hefe und Säugetieren einen unabhängigen Proteinkomplex bildet (Braun et al., 1992). Die Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM) besteht aus weniger Untereinheiten, die dafür in mehreren Isoformen vorliegen, ganz besonders gilt dies für die Rezeptorproteine (siehe 2.3, Werhahn et al. 2001; Werhahn et al., 2003). Auch das Genom der pflanzlichen Mitochondrien weist Besonderheiten auf (Brennicke et al., 1999; Mackenzie and MacIntosh, 1999). Es ist vergleichsweise groß (siehe unten), die Transkripte werden editiert, bevor sie translatiert werden und einige Transkripte entstehen durch *trans*-splicing (Janska et al., 1998).

Die Mitochondrien von Blütenpflanzen besitzen neben den normalen auch kleinere DNA-Ringe, die durch intramolekulare Rekombination aus den regulären DNA-Ringen entstehen und nur einen Teil der genetischen Information besitzen. Zwischen verschiedenen Spezies variiert die Größe des mitochondrialen Genomes stark. Höhere Pflanzen haben ein relativ großes Chondriom (z.B. Mais mit 570 kb). Bei Hefen und Schimmelpilzen ist das Chondriom wesentlich kleiner (ca. 70 kb) und bei Säugetieren vergleichsweise winzig (ca. 16 kb).

2.2 Proteinimport in Mitochondrien

Im mitochondrialen Genom sind weniger als 10 % der in den Mitochondrien aktiven Proteine kodiert. Das heißt, daß mehr als 90% der mitochondrialen Eiweiße kernkodiert sind, an cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und posttranslational in die Mitochondrien importiert werden (Rehling et al., 2001; Endo and Kohda, 2002; Pfanner and Chacinska, 2002). Die meisten der Proteine, die beim Import von kernkodierten Proteinen in die Mitochondrien eine Rolle spielen, wurden zuerst bei *Saccharomyces cerevisiae* und *Neurospora crassa* charakterisiert (Kübrich et al., 1995; Lill et al., 1996). Um den gezielten Import von kernkodierten Proteinen in die Mitochondrien zu ermöglichen, sind diese Proteine oftmals mit Leitsequenzen (topogenen Signalen) ausgestattet. Proteine mit Leitsequenzen werden als Vorläuferproteine oder Präproteine bezeichnet. Die Leitsequenzen (Präsequenzen) für Proteine, die in die mitochondriale Matrix importiert werden sollen, liegen am N-Terminus der Präproteine. Sie bestehen aus 10 - 70 Aminosäuren, die in Membranen amphipatische α -Helices ausbilden können (von Heijne, 1990). Viele Proteine, die in die mitochondrialen Membranen integriert werden, tragen interne Transportsequenzen (Pfanner et al., 1987). In seltenen Fällen kommen sowohl N-terminale Leitsequenzen als auch interne Transportsequenzen vor (z. B. bei BSC1; Fölsch et al., 1996). Die Spezifität der Interaktion zwischen Protein-Importapparat und Leitsequenzen ist noch nicht genau verstanden, da viele zufällig generierte Sequenzen als Leitsequenzen fungieren können (Baker and Schatz, 1987; Schatz, 1987), sie scheint aber mehr von der drei-dimensionalen Struktur der Leitsequenz, als von ihrer Aminosäurenkomposition abzuhängen (siehe 2.3; Endo and Kohda, 2002).

Der Import von Präproteinen in Mitochondrien ist in Abb. 2 dargestellt und wird im folgenden schrittweise erläutert:

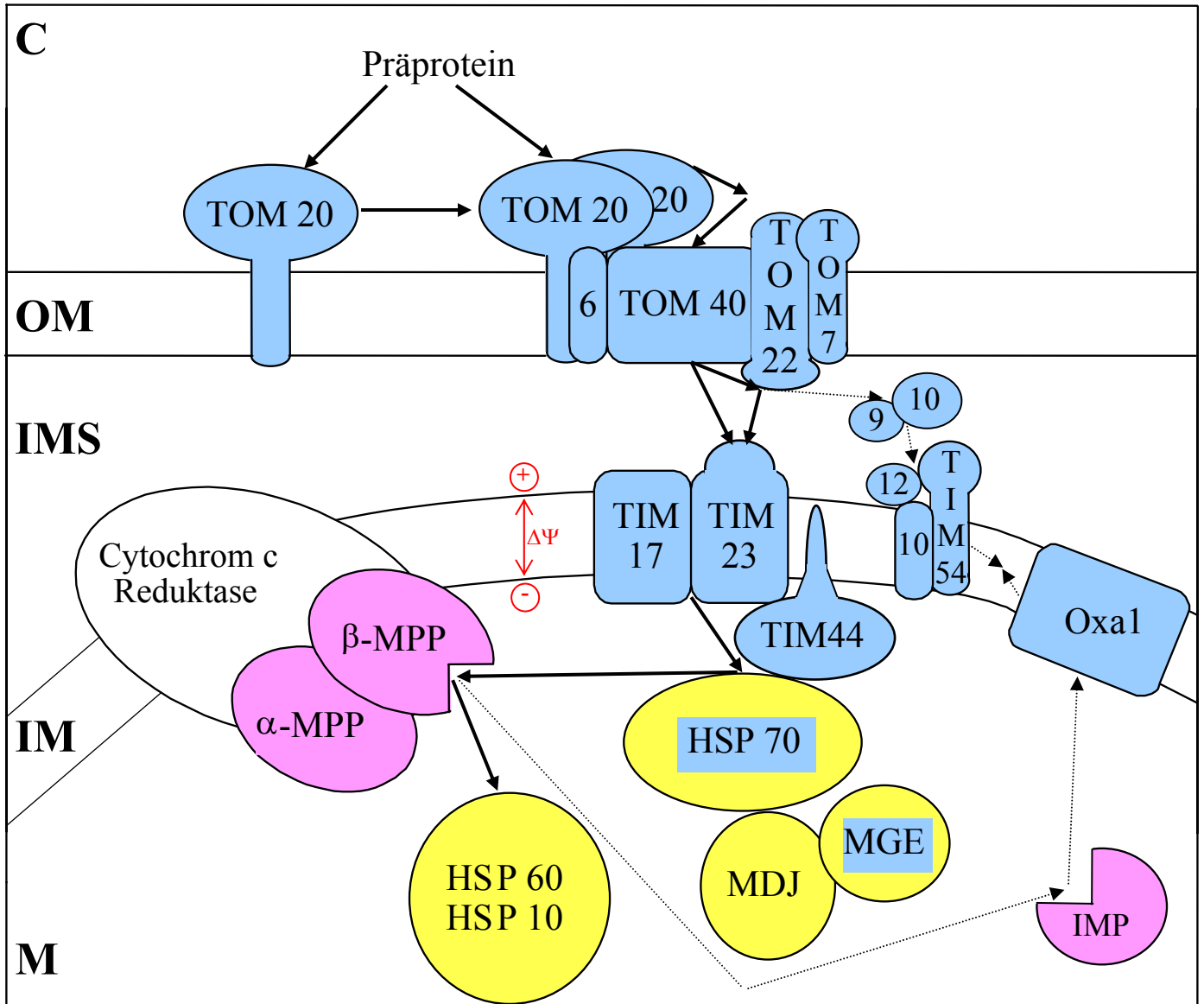


Abb. 2 Der Proteinimport-Apparat pflanzlicher Mitochondrien
 Der Importablauf ist durch die Pfeile gekennzeichnet. HSP: Hitzestreß-Protein, IM: Innere Mitochondrienmembran, IMP: Intermediate Peptidase, IMS: Intermembranraum, M: Mitochondriale Matrix, MDJ und MGE: Co-Chaperone, MPP: Mitochondriale Prozessierungsprotease, OM: Äußere Mitochondrienmembran, TIM: Präproteintranslokase der inneren Mitochondrienmembran, TOM: Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran. Blau: Proteine, die am Import beteiligt sind; lila, Proteine die an der Proteinreifung beteiligt sind; gelb: Proteine, die an der Proteinfaltung beteiligt sind.

Während des Transportes durch das Cytosol sind Hilfsproteine (Chaperone) mit den Präproteinen assoziiert (Beddoe and Lithgow, 2002). Viele Präproteine werden hergestellt, bevor die Ribosomen einem Mitochondrion begegnen. In diesem Fall können Faktoren wie HSP70 und HSP40 das Präprotein binden, während es noch translatiert wird und Aggregation, falsche Faltung und Proteolyse verhindern. Wenn die Synthese abgeschlossen ist, kann das neue Präprotein an MSF (Mitochondrial import stimulating factor) binden, was den Import in Mitochondrien fördert. MSF kann auch aggregierte Präproteine wieder in einen importkompetenten Zustand falten (Beddoe and Lithgow, 2002). Die Chaperone helfen nicht beim Finden der Mitochondrien, sondern nur beim Erkennen und Binden des TOM-Komplexes (engl.: „Preprotein-Translokase of the Outer Mitochondrial Membrane“). Wenn ein Ribosom, das ein mitochondriales Präprotein synthetisiert, auf ein Mitochondrium stößt, kann das Präprotein kotranslationell importiert werden, weil die mit dem Ribosom assoziierten Faktoren NAC (Nascent-associated polypeptide complex) und RAC (Ribosome-associated complex) das Präprotein in importkompetenter Form halten. Außerdem beeinflussen sie die Art, wie die Präsequenz den Rezeptorproteinen präsentiert wird.

Die Leitsequenz der zu importierenden Präproteine interagiert entweder über elektrostatische Kräfte mit der Lipiddoppelschicht (Zardeneta and Horowitz, 1992) oder mit speziellen Rezeptorproteinen der äußeren Mitochondrienmembran (Hoyt et al., 1991). Die Übertragung der Präproteine an die Rezeptoren erfordert cytosolisches ATP, da HSP70 und MSF sich nur unter ATP-Verbrauch von den Präproteinen lösen (Hajek and Bedwell, 1994; Wachter et al., 1994). Die Rezeptorproteine sind Teil des TOM-Komplexes, der auch die Importpore (engl.: GIP: „General Insertion Pore“) für Präproteine enthält (siehe 2.3). Der TOM-Komplex interagiert bei der Translokation von Proteinen an „Kontaktstellen“ mit dem TIM-Komplex (engl.: „Preprotein-Translokase of the Innner Mitochondrial Membrane“) der inneren Membran (Pfanner et al., 1994), so daß die Präproteine direkt in die Matrix importiert werden. TOM und TIM bilden aber keinen dauerhaften Kanal, sondern dissoziieren nach dem Import wieder (Schatz, 1993; Horst et al., 1996). Die Präproteine passieren die Translokase-Komplexe in entfaltetem Zustand (Rassow et al., 1989) und durchspannen dabei beide Membranen mit 45 - 50 Aminosäuren (Rassow et al., 1990).

Der TIM-Komplex, der für die Translokation durch die innere Membran zuständig ist, ist der sogenannte TIM23-Komplex, der aus den Untereinheiten TIM17, TIM23 und TIM44 besteht. Der Präproteinimportkanal besteht aus TIM17 und TIM23. Die N-terminale Hälfte von TIM23 dient als Rezeptor für Präproteine mit N-terminalen Präsequenzen. Sie durchspannt

während des Proteinimportes den Intermembranraum und sogar die äußere Membran (Donzeau et al., 2000). Durch die Bindung der Präsequenz kommt es zu einer vom Membranpotential abhängigen Konformationsänderung und damit zu einem Öffnen des Translokationskanals.

TIM17 und TIM23 stehen in Kontakt mit TIM44. Eine zentrale Funktion von TIM44 ist die dynamische Bindung an mitochondriales HSP70 (mt-HSP70; Gambill et al., 1993; Voos et al., 1993), das eine wichtige Rolle nicht nur bei der Translokation, sondern auch bei der Faltung der Proteine spielt. mt-HSP70 interagiert mit den Präproteinen. Von dieser Interaktion wird angenommen, daß sie eine gerichtete Bewegung der Polypeptidkette in die Matrix antreibt (Neupert et al., 1990). TIM44 bindet mt-HSP70 an den Importapparat und ermöglicht so den schrittweisen, gerichteten Transport der Präproteine durch die TOM- und TIM-Komplexe (Rassow et al., 1994). Die Interaktion von TIM44 und mt-HSP70 ist dynamisch, sie erfolgt in Zyklen von gegenseitigem Binden und Loslassen. Dieser Zyklus ist durch ATP-Hydrolyse gesteuert. Der Nukleotidaustausch-Faktor MGE spielt eine Schlüsselrolle bei der Dissoziation des TIM44-mt-HSP70-Komplexes (Westermann et al., 1995).

Es gibt zwei Modelle für den gerichteten Transport von Präproteinen durch die Mitochondrienmembranen, die beide auf der ATP-abhängigen zyklischen Bindung von mt-HSP70 an das Präprotein beruhen. Beim Modell der „Molekularen Ratsche“ (Schneider et al., 1994; Ungermann et al., 1994) wird angenommen, daß mt-HSP70 nur an das Präprotein bindet, ohne dabei eine Zugkraft auszuüben. Durch braunsche Molekularbewegung bewegt sich das Präprotein in den Translokase-Komplexen, kann aber wegen der Bindung an mt-HSP70 nicht zurückrutschen. Bewegt sich das Präprotein in die Matrix hinein, kann das mt-HSP70 an ein weiter in Richtung C-Terminus liegendes Stück des Präproteins binden. So bewegt sich das Präprotein langsam durch die Membranen. Das andere Modell, das des „Translokationsmotors“, postuliert eine aktive Zugkraft des mt-HSP70 auf Grund einer Konformationsänderung (Pfanner und Meijer, 1995; Glick, 1995; Horst et al., 1996). Neueste Untersuchungen von Okamoto et al. (2002) belegen, daß der Translokationsmotor nicht genügend Kraft entwickelt um den beobachteten Transport teilweise gefalteter Proteine zu bewirken – der Motor kann ~5 pN entwickeln, ~70 pN sind gefordert. Auch bei teilweise gefalteten Proteinen kommt es immer wieder zur spontanen Entfaltung von Teilbereichen, die dann in den Importkanal hineinrutschen. Okamoto et al. haben die Zeit, die ein solches

Protein für seinen Import benötigt, gemessen und kamen zu dem Ergebnis, daß mt-HSP70 Teil einer „Molekularen Ratsche“ ist und nicht aktiv Präproteine in die Mitochondrien zieht.

Proteine der inneren Mitochondrienmembran, die eine interne Leitsequenz besitzen, werden von einem anderen TIM-Komplex, dem sogenannten TIM54-Komplex (Carrier-Translokase), der aus den Untereinheiten TIM12, TIM18, TIM22 und TIM54 besteht, in die innere Membran importiert. Sie binden zuerst im Intermembranraum an die löslichen Proteine TIM9 und TIM10, werden an TIM12 weitergereicht und von dort zu TIM22 transferiert. TIM22 vermittelt dann die membranpotentialabhängige Insertion in die innere Membran (Rehling et al., 2001).

An der proteolytischen Reifung des Präproteins im Zuge des Imports können neben der „Mitochondrialen Prozessierungs-Protease“ (MPP; Kalousek et al., 1993; Braun und Schmitz, 1995) weitere Proteasen beteiligt sein. MPP besteht aus zwei Komponenten (α - und β -MPP) und spaltet N-terminale Leitsequenzen ab. Die „Mitochondriale Intermediate-Peptidase“ (MIP; Isaya et al., 1994) und die „Innere Membran-Protease“ (IMP) sind beim Import einiger Proteine für einen sekundären Prozessierungsschritt verantwortlich. Proteine, die zwei Leitsequenzen tragen und für die innere Membran bestimmt sind, werden zunächst in die Matrix importiert, wo die erste Leitsequenz von MPP abgeschnitten wird. IMP erkennt dann die zweite Leitsequenz und trennt sie ab. Über Oxa1 wird dann das Protein in die innere Membran importiert.

Die abschließende Faltung von importierten Proteinen in ihre native Konfiguration vermitteln mitochondriale Chaperone (Hartl, 1996), die als Chaperonine bezeichnet werden (Ellis, 1987; Ellis, 1994). Die Information für die Konformation eines Proteins liegt in seiner Aminosäuresequenz begründet. Bei kleinen Proteinen langt das mtHSP70-MDJ-MGE-System für die Faltung aus (Stuart et al., 1994; Rospert et al., 1996). MDJ und MGE werden als Co-Chaperone bezeichnet (Bolliger et al., 1994; Naylor et al., 1995). Die meisten Proteine bedürfen bei der Faltung allerdings der Assistenz des Chaperonin-Systems aus HSP60 und HSP10 (Cheng et al., 1989; Ostermann et al., 1989). HSP60 sorgt für eine korrekte Faltung bzw. stabilisiert eine translokationskompetente Konformation für den Rücktransport der Präproteine in/durch die innere Membran und den Einbau in Proteinkomplexe mit vielen Untereinheiten. Beim mitochondrialen Proteinimport agieren mtHSP70 und HSP60 nacheinander (Manning-Krieg et al., 1991).

Während des Importes werden die Proteine nach ihren submitochondrialen Bestimmungsorten - Matrix, innere Membran oder Intermembranraum - sortiert. Es existieren zwei Modelle, wie Proteine die innere Membran oder den Intermembranraum erreichen. Im „Stop-Transfer-Modell“ fungiert ein Teil der Leitsequenz als Stoppsignal und beendet die Translokation in der inneren Membran (Glick et al., 1992). Dem Modell der „konservativen Sortierung“ zufolge fungiert ein Teil der Leitsequenz als Exportsignal für einen Transport von der Matrix in die innere Membran hinein (Stuart und Neupert, 1996). Der Import einer Reihe von Proteinen folgt weder eindeutig dem „Stop-Transfer-Modell“ noch dem „konservativen Sortierungs-Modell“.

2.3 Die Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM)

Die Präprotein-Translokase der äußeren Mitochondrienmembran ist ein äußerst dynamischer Proteinkomplex, der sowohl für die spezifische Erkennung als auch für die Membran-Translokation von kernkodierten Präproteinen erforderlich ist. TOM wurde zuerst bei Pilzen charakterisiert. Es wurde festgestellt, daß TOM von Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) aus acht verschiedenen Untereinheiten besteht, die nach ihren Molekulargewichten als TOM72, TOM70, TOM40, TOM22, TOM20, TOM7, TOM6 und TOM5 bezeichnet werden (Pfanner et al., 1996; Pfanner and Meijer, 1997; Ryan and Pfanner, 1998). Ein Schema dieses Protein-Komplexes ist in Abbildung 3 A zu sehen. Ein früher beschriebenes Protein TOM37 ist laut Endo und Kohda (2002) nur ein peripheres Membranprotein, dessen Funktion unklar ist. TOM72 ist bisher nur bei Hefe bekannt (Schlossmann et al., 1996; Bömer et al., 1996). Es hat eine 53 %ige Aminosäure-Identität zu TOM70, scheint aber, wie verschiedene Deletionsversuche belegen, nicht am Proteinimport beteiligt zu sein (Endo and Kohda, 2002). Bei Pflanzen sind bisher weder TOM72, TOM37 noch TOM70 identifiziert worden (Abb. 3 B). Da TOM70 aber das Rezeptorprotein für Präproteine mit internen Leitsequenzen ist (Söllner et al., 1990; Hines and Schatz, 1993), kann nicht ausgeschlossen werden, daß TOM70 nicht doch auch bei Pflanzen vorkommt. Rezeptor für Präproteine mit N-terminaler Leitsequenz ist bei Pilzen ein Heterodimer aus TOM20 und TOM22. Da TOM22 von Pflanzen aber die cytosolische saure Domäne fehlt, die bei Pilzen als Rezeptordomäne angesehen wird, scheint bei Pflanzen TOM20 der einzige Rezeptor zu sein. Pflanzliches

TOM20 tritt in vier Formen auf, die nicht ähnlich genug sind, als das man von Isoformen sprechen könnte (Werhahn et al., 2001).

TOM40 und die drei kleinen Untereinheiten bilden wahrscheinlich eine Pore (engl.: General Insertion Pore, GIP) für die Translokation der Präproteine (Baker et al., 1990; Kiebler et al., 1990; Kassenbrock et al., 1993; Hönlinger et al., 1996; Dietmeier et al., 1997; Künkele et al., 1998) wobei bei Pflanzen die Identität der beiden kleinsten Proteine nicht genau bestimmt werden konnte. Sie gehören offensichtlich einer Proteinfamilie an und zeigen Homologien zu sowohl TOM5 als auch TOM6 (Werhahn et al., 2003).

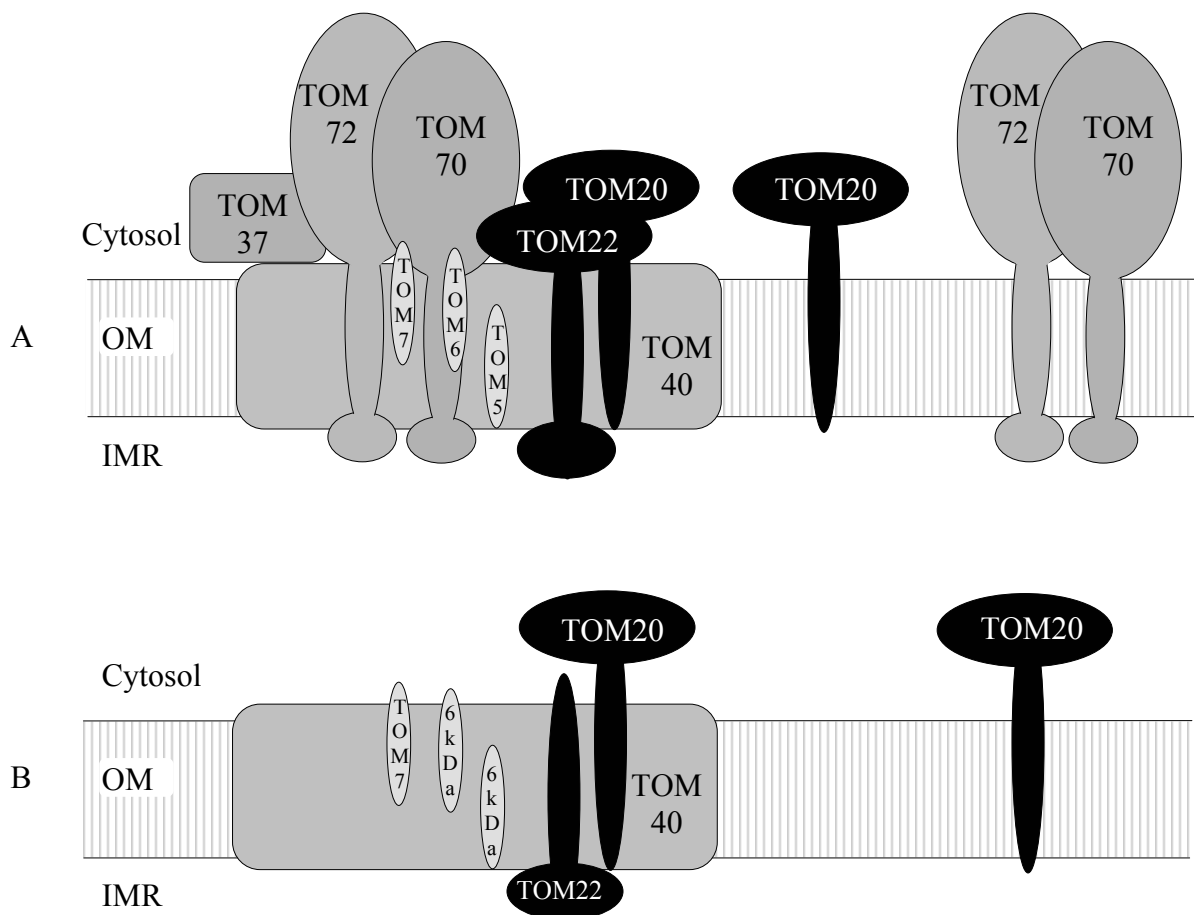


Abb. 3 Schematischer Vergleich des TOM-Komplexes von (A) *S. cerevisiae* und (B) *A. thaliana*. OM: Äußere Mitochondrienmembran, IMR: Intermembranraum

Bei Pilzen gibt es zwei Wege für den Proteinimport in Mitochondrien, wobei entweder HSP70 oder MSF den Proteintransfer aus dem Cytosol vermittelt (Neupert, 1997):

- 1.) Ein MSF-Präprotein-Komplex bindet erst an den TOM70/72 - TOM37-Subkomplex, wird dann unter ATP-Verbrauch an den TOM 20 - TOM22-Subkomplex weitergereicht und gelangt von dort in den Translokationskanal.
- 2.) Der größte Teil der Präproteine bindet lediglich an HSP70 und wird direkt vom TOM20 - TOM22-Subkomplex erkannt. Die Interaktion zwischen dem Rezeptor-Subkomplex und dem HSP70-Präproteinkomplex erfolgt ohne ATP-Verbrauch.

Das Präprotein bindet jedoch nicht nur an der cytosolischen Seite an den TOM-Komplex. Endo und Kohda (2002) beschreiben auch eine Bindung des Präproteins an die Intermembranraum-Seite des TOM-Komplexes. Auch scheinen die beiden Proteinimportwege nicht absolut zu sein. TOM20 kann an Proteine mit interner Leitsequenz ebenso binden, wie an solche mit N-terminaler Leitsequenz, ja sogar an Proteine ganz ohne Leitsequenz, während eine C-terminale Sequenz von TOM70 Leitsequenzen erkennt, sowohl interne als auch N-terminale (Endo and Kohda, 2002). Eine Deletion von TOM20 ist mittels einer Überexpression von TOM70 ausgleichbar.

TOM70 und TOM20 enthalten Tetratricco-Peptid-Motive (TPR-Motive; Haucke et al., 1996), die der Interaktion verschiedener Proteine dienen (Lamb et al., 1995). Bei Pflanzen scheinen die einzelnen TOM20-Proteine auch verschiedene Präproteine zu erkennen. Eine Knock-out Mutante nur eines TOM20-Genes zeigt schwere Wachstumsmängel.

Die Interaktion mit den Präproteinen erfolgt durch elektrostatische Wechselwirkungen (Kiebler et al., 1993; Haucke et al., 1995). Das TOM20-Protein weist eine hydrophobe Bindungsgrube auf, bestehend aus Met-Gruppen von hydrophoben Resten, die eine glatte konkave Oberfläche bilden. Diese Methionine interagieren lose mit Methioninen und Leucinen der Präproteine (NOE: nuclear Overhauser effects). Weil diese Bindung so lose ist – sie entspricht nicht dem Schlüssel-Schloß-Prinzip - können verschiedene Präsequenzen erkannt werden. Bindung an TOM20 erfolgt also hauptsächlich durch hydrophobe Interaktionen. Die beobachtete Bindung mittels ionischer Interaktion geschieht hauptsächlich an der Trans-Seite (IMS-Seite)

Die hydrophobe Grube von TOM20 ist viel flacher als die von Ffh, einem bakteriellen Signal Recognition Particle (SRP), das beim Proteinimport in das Endoplasmatische Reticulum eine Rolle spielt. In der Grube von TOM20 können bis zu 8 Aminosäuren erkannt werden (Präsequenzen haben meist > 20 AS). Das TOM20-Binde-Element kann entweder am C- oder N-Ende der Präsequenz liegen. Das gemeinsame Muster ist: OXXOO, wobei O hydrophobe

/aromatische Aminosäuren (Leu, Met, Trp, Cys, Ala, Tyr, Phe und Ile), X eine Aminosäure mit langer aliphatischer Seitenkette und oft einer polaren Gruppe am Ende, bedeutet. Als Motiv ist diese Abfolge zu vage, um als TOM20-Erkennungs-Signal zu gelten, sie ist aber ein guter Ausgangspunkt für weitere Forschungen (Endo and Kohda, 2002).

Obwohl die TOM20-Bindung über hydrophobe Wechselwirkung und nicht über ionische Interaktion läuft, sind die positiven Ladungen der Präsequenz essentiell für den Import: die amphiphile Helix und die positiven Ladungen sind unterschiedliche Erkennungssignale. Endo und Kohda (2002) nehmen an, daß TOM20 an die hydrophobe und TOM22 an die hydrophile Seite der amphiphilen Helix bindet. Die cytosolische saure Domäne, die bei TOM22 von Pilzen diese Bindung vornimmt, ist bei Pflanzen deletiert (Werhahn et al., 2003). TOM22 erstreckt sich durch die Membran bis in den Intermembranraum. Die Intermembranraumdomäne von TOM22 unterstützt den Transfer des Präproteins zum TIM-Komplex (Court et al., 1996). Die positiven Reste der Leitsequenz könnten an TOM22, TOM5 oder an TIM23 binden, auch eine Membranpotentialerkennung und/oder Matrix-Chaperonererkennung (mtHSP70) wäre möglich.

Carrier Proteine werden im Gegensatz zu Präsequenzproteinen nicht linear sondern als Loop importiert. Ob der TOM-Komplex auch für die Erkennung der internen Importsignale im Intermembranraum zuständig ist, ist unbekannt. Auch TOM5 scheint mittels seiner N-terminalen, sauren, cytosolischen Domäne Präproteine zu binden und so als Rezeptor zu dienen (Pfanner et al., 2002). Aber seine Hauptfunktion ist die Weitergabe der Präproteine von den Rezeptoren an die Importpore.

TOM40 ist die Hauptkomponente der Translokationspore (Rapaport et al., 1997). TOM40 ist ein internes Membranprotein, dessen Sekundärstruktur, wie die des Porins, viele β -Faltblätter aufweist. Mit TOM40 assoziiert sind die kleinen TOM-Untereinheiten. Auch sie sind integrale Membranproteine und scheinen Bestandteile der Pore zu sein (Söllner et al., 1992, Werhahn et al., 2003). TOM5 funktioniert als Bindeglied zwischen den Rezeptoren und der Translokationspore (Dietmeier et al., 1997). TOM6 und TOM7 beeinflussen die Interaktion der Rezeptoren mit der Pore, dabei haben sie komplementäre Funktionen. TOM6 unterstützt die Interaktion der Rezeptoren mit TOM40 und erleichtert die Übergabe der Präproteine an TOM40 (Alconada et al., 1995), während TOM7 die Interaktion des TOM20 - TOM22-Subkomplexes mit der Translokationspore destabilisiert (Hönlinger et al., 1996). Die

Anwesenheit von TOM6 ist nötig, damit TOM22 sich mit dem Kern-Komplex verbindet, der sonst nur TOM40, TOM7 und TOM5 enthält (Dekker et al. 1998).

Beim Menschen wurde eine TOM-Untereinheit gefunden, für die es kein Gegenstück in den Mitochondrien der bisher untersuchten Organismen gibt. Dieses 34 kDa-Protein (hTOM34) hat eine große (27 kDa) Domäne, die ins Cytosol reicht und besitzt ein 62 Aminosäuren langes Motiv, das sich in der TOM70-Familie wiederfindet. Dies deutet darauf hin, daß hTOM34 ein Rezeptorprotein ist.

2.4 Zielsetzung

Pflanzliche Mitochondrien haben viele Funktionen, die die Mitochondrien von Tieren und Pilzen nicht besitzen. Die große Zahl der für diese Funktionen benötigten Proteine erschwert Analysen des Gesamtproteoms von pflanzlichen Mitochondrien. Ziel der vorliegenden Dissertation ist es daher, kleine, klar definierte Teil-Proteome von Mitochondrien herzustellen und zu analysieren.

Dafür werden zuerst hochreine Mitochondrien aus Pflanzenzellen isoliert und die geeigneten Methoden zu sicheren Bestimmung der Reinheit der Isolate etabliert.

Zuerst werden die Teil-Proteome der inneren und äußeren Mitochondrienmembran untersucht, da diese viele pflanzenspezifische Funktionen aufweisen. Besonders die innere Mitochondrienmembran enthält sehr viele interessante Proteinkomplexe (z.B. Atmungsketten-Komplexe), von denen einige mit einer neuen Methode gesondert untersucht werden.

Ein besonders interessanter Proteinkomplex ist die Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM), da sich der pflanzliche Komplex stark von den TOM-Komplexen der Pilze und Tiere unterscheidet. Der TOM-Komplex von Arabidopsis wird in dieser Arbeit komplett charakterisiert.

3 Material & Methoden

3.1 Verwendete Materialien

3.1.1 Chemikalien

Chemikalien und andere Produkte folgender Firmen wurden verwendet:

Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden
Biorad, USA
Boehringer, Mannheim (jetzt Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)
Merck, Darmstadt
Serva, Heidelberg
Sigma, USA

Auf Hersteller spezieller Chemikalien und Versuchsmaterialien wird im Methodenteil verwiesen. Alle Medien, Puffer, Stamm- und Arbeitslösungen wurden mit bidestilliertem Wasser (H₂O-bidest.) angesetzt.

3.1.2 Versuchsorganismen

Im Rahmen dieser Dissertation wurde mit folgenden Versuchsorganismen gearbeitet:

- *Arabidopsis thaliana* var. Columbia & C24
- *Pisum sativum* var. Schöne Rheinländerin
- *Nicotiana tabacum* var. Samsun
- *Arabidopsis thaliana* als nicht-grüne Suspensionskultur
- Knollen von *Solanum tuberosum* (Varietäten Galena, Solara und Gloria)

3.2 Anzucht von Versuchsorganismen

3.2.1 Anzucht von *Arabidopsis thaliana*, *Pisum sativum* & *Nicotiana tabacum* Pflanzen

Die Samen von *Arabidopsis thaliana* var. Columbia stammen ursprünglich aus dem Arabidopsis stock center der Ohio State University. Die Pflanzen wurden für 2 - 3 Wochen unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht / 8 h Dunkel) bei 23°C / 21°C im Gewächshaus auf steriler Erde oder auf dem Substrat TKS1 (Floragard, Deutschland) gezogen. Wenn nötig, wurde für 16h am Tag zusätzliche Beleuchtung (Natriumdampf-Lampen, SON-T Agro 400, Philips) angeschaltet um einen konstanten Quantenfluß von 300 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ zu gewährleisten. *Pisum sativum* var. Schöne Rheinländerin wurde unter den selben Bedingungen für 18 Tage gezogen. *Nicotiana tabacum* var. Samsun wuchs unter den beschriebenen Bedingungen drei Wochen auf dem Substrat TKS1.

3.2.2 Kultivierung von *Arabidopsis thaliana* in einer Suspensionskultur

Arabidopsis thaliana wird als Suspensionskultur nach May und Leaver (1993) angezogen. Auf diese Weise werden undifferenzierte Kalluszellen gebildet, so daß bei der Präparation von Mitochondrien keine Gewebeunterschiede beachtet werden müssen.

Die Kultivierung findet bei Temperaturen zwischen 24 und 26°C statt. Um die Entwicklung reifer Chloroplasten, die sich präparativ nur schlecht von den Mitochondrien trennen lassen, zu unterbinden, werden die Kulturen im Dunkeln angezogen. Ein gleichmäßiger Sauerstoffeintrag in das Medium wird durch konstantes Schütteln gewährleistet. Zudem wird das Sedimentieren der Arabidopsis-Zellen durch das Schütteln verhindert.

Das verwendete Medium (30 g/l Saccharose, 1 mg/l 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure (gelöst in 1 ml 100 % EtOH), 0,5 mg/l Nicotinsäure, 0,5 mg/l Pyridoxin-HCl, 5 mg/l Thiamin-HCl, 5g/l myo-Inositol, 1 Tüte/l Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS)) ist ein Vollmedium, das ein optimales Wachstum ermöglicht.

In Erlenmeyerkolben werden verschiedene Volumina des Mediums autoklaviert und mit unterschiedlichen Mengen Zellen steril angeimpft:

Erlenmeyerkolben	Medium	Ampicillin (20 %ig)	<i>Arabidopsis thaliana</i>
300 ml	50 ml	25 µl	1 g
500 ml	100 ml	50 µl	2,5 g
1 l	200 ml	100 µl	4 g
2 l	400 ml	200 µl	7-8 g

Nach 7 - 10 Tagen Inkubation unter den oben genannten Bedingungen kann der größte Teil der Kulturen für die Mitochondrien-Präparation verwendet werden. Da die Massenzunahme der *Arabidopsis*-Zellen bis zu 800 % beträgt, ist nur ein kleiner Teil der Suspensionskulturen nötig, um für den nächsten Wachstumszyklus ausreichend viele Kulturen anzupflanzen.

3.3 Mitochondrienpräparationen

Zur Minimierung von Proteaseaktivitäten werden alle eingesetzten Lösungen und Geräte vorgekühlt. Die gesamte Präparation (einschließlich der Zentrifugationsschritte) erfolgt bei 4°C. Den Puffern werden die Proteaseinhibitoren EGTA (inhibiert Metalloproteasen) und/oder PMSF (inhibiert Serinproteasen) zugesetzt.

3.3.1 Präparation von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* Pflanzen

(nach Werhahn et al., 2000; Kruft et al., 2001 und Hausmann et al., 2003)

Die *Arabidopsis* Pflanzen werden wie unter 3.2.1 beschrieben angezogen.

Etwa 150 g Stängel und Blätter werden in 900 ml eiskaltem Aufschlußpuffer (450 mM Saccharose, 1,5 mM EGTA, 0,2 % [w/v] BSA, 0,6 % [w/v] PVP-40, 10 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 15 mM MOPS/ KOH, pH 7,4) mittels eines Ultra-Turrax (Modell T25, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) oder in einem Mörser zerkleinert. Um gröbste Pflanzenteile zu entfernen werden die zerkleinerten Pflanzen zuerst durch vier Lagen Mull und dann durch eine Nylonmembran mit 50 µm Poren gefiltert. Zellbruchstücke und einige Chloroplasten werden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 3500 xg (Sorvall SLA3000-Rotor) entfernt. Der Überstand wird zuerst fünf Minuten bei 3500 xg und dann fünf Minuten bei 6000 xg gewaschen. Eine mitochondrienreiche Fraktion wird durch 10 minütiges Zentrifugieren bei

17000 xg pelletiert, in Waschpuffer (300 mM Saccharose, 1mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM MOPS/ KOH, pH 7,2) resuspendiert und durch zwei vorsichtige Hübe in einem Dounce Homogenisator (B. Braun, Biotech International) homogenisiert. 3ml der Suspension werden auf drei-stufige Percollgradienten (6 Gradienten á 30 ml, die aus jeweils 10 ml einer 18 %igen über 10 ml einer 29 %igen und 10 ml einer 40 %igen Percoll-Lösung in 0,3 mM Saccharose, 10 mM MOPS/ KOH, pH 7,2 bestehen) aufgetragen und für 45 Minuten bei 70000 xg (Beckman SW-28-Rotor) zentrifugiert. Die Mitochondrien werden an der 29 % / 40 %-Interphase mit einer Pasteurpipette vorsichtig entnommen und durch zweimaliges Zentrifugieren in Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM Tricin-KOH [pH 7,2]) für 10 Minuten bei 14500 xg in einem Sorvall SS34-Rotor und einmaliges in einem Sorvall F-20/Micro-Rotor vom Percoll befreit und pelletiert. Das Pellet wird gewogen und in 1 – 1,5 ml Resuspensionspuffer aufgenommen.

3.3.2 Präparation von Mitochondrien aus *Arabidopsis thaliana* Zellkulturen

Die Zellkulturen werden wie unter 3.2.2 beschrieben angezogen. Die Mitochondrienpräparation wird wie in Werhahn et al. (2001) beschrieben durchgeführt.

700 g *Arabidopsis*-Zellen werden durch zwei Lagen Mull filtriert und in 1400 ml eiskaltem Aufschlußpuffer (450 mM Saccharose, 1,5 mM EGTA, 0,2 % [w/v] BSA, 0,2 % [w/v] PVP-40, 10 mM DTT, 0,2 mM PMSF, 15 mM MOPS/ KOH, pH 7,4) aufgenommen. Die Zellen werden durch dreimaliges Homogenisieren in einem Mixer (Waring blender) – jeweils 15 Sekunden, mit 30 Sekunden Pause – zerstört. In zwei Waschschritten (5 Minuten, 2700 xg, Sorvall SLA3000-Rotor) werden die groben Zellbruchstücke abzentrifugiert. Dann werden die Mitochondrien durch eine 10 minütige Zentrifugation bei 17000 xg pelletiert. Das mitochondrienhaltige Pellet wird in Waschpuffer (300 mM Saccharose, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM MOPS/ KOH, pH 7,2) vorsichtig mit dem Pinsel resuspendiert und durch zwei vorsichtige Hübe in einem Dounce Homogenisator (B. Braun, Biotech International) homogenisiert. Je 3ml der Suspension werden auf drei-stufige Percollgradienten (sechs Gradienten á 30 ml, die aus jeweils 10 ml einer 18 %igen über 10 ml einer 23 %igen und 10 ml einer 40 %igen Percoll-Lösung in 0,3 mM Saccharose, 10 mM MOPS/ KOH, pH 7,2 bestehen) aufgetragen und für 45 Minuten bei 70000 xg (Beckman SW-28-Rotor) zentrifugiert. Die Mitochondrien werden an der 23 % / 40 %-Interphase mit einer

Pasteurpipette vorsichtig entnommen und durch zweimaliges Zentrifugieren in Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM Tricin-KOH [pH 7,2]) für 10 Minuten bei 14500 xg in einem Sorvall SS34-Rotor vom Percoll befreit und pelletiert. Das Pellet wird gewogen und in Resuspensionspuffer resuspendiert, so daß eine Endkonzentration von 0,1 g Mitochondrienfrischgewicht pro ml entsteht.

Aus 700 g Arabidopsis-Zellen (Frischgewicht) kann 1g Mitochondrien – und somit ca. 100 mg mitochondriales Protein - isoliert werden.

3.3.3 Präparation von Mitochondrien aus *Pisum sativum*

Die Pflanzen werden wie unter 3.2.1 beschrieben angezogen. Die Präparation beruht auf der von Day et al. (1985) beschriebenen Methode und wurde nach Hausmann et al. (2003) modifiziert.

300 g Erbsenblätter werden in einem Mixer (Waring blender) in 300 ml eiskaltem Aufschlußpuffer (0,3 M Mannitol, 25 mM Pyrophosphat, 10 mM KH_2PO_4 [pH 7,6], 1 mM EDTA, 0,2 % [w/v] BSA, 0,5 % [w/v] PVP-40, 4 mM Cystein) zerkleinert und erst durch 4 Lagen Mull und dann durch eine Nylonmembran mit 50 μm Poren filtriert. Anschließend wird das Filtrat bei 2000 xg für 10 Minuten zentrifugiert (Sorvall GSA-Rotor) und so grob von Chloroplasten befreit. Der Überstand wird für 20 Minuten bei 12000 xg zentrifugiert. Das bei dieser Zentrifugation entstehende mitochondrienhaltige Pellet wird in 100 ml Resuspensionspuffer (0,3 M Mannitol, 10 mM KH_2PO_4 [pH 7,2], 2 mM Glycin, 0,1 % [w/v] BSA) resuspendiert und dann bei 1500 xg für 5 Minuten zentrifugiert, wobei die Thylakoide pelletieren. Der Überstand wird wieder für 20 Minuten bei 12000 xg zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wird in 10 ml Resuspensionspuffer aufgenommen. Je 1,5 ml der Mitochondriensuspension werden nun auf 32 ml einer Lösung aufgetragen, die 0,3 M Saccharose, 10 mM KH_2PO_4 [pH 7,2], 0,1 % [w/v] BSA, 28 % [v/v] Percoll und einen linearen PVP-25-Gradienten von 0 - 10 % [w/v] enthält. Während der 45 minütigen Zentrifugation bei 40000 xg (Beckman SW28-Rotor) baut sich ein linearer Percollgradient auf. Die Mitochondrien bilden eine gelblich-weiße Bande nahe des Röhrchenbodens und werden mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgesaugt. Um das Percoll zu entfernen werden die Mitochondrien mindestens 1 : 5 mit Resuspensionspuffer verdünnt und zweimal bei 15000 xg für 20 Minuten gewaschen (Sorvall SS34-Rotor).

Aus 300 g Erbsenblättern können ca. 10 mg mitochondriales Protein isoliert werden.

3.3.4 Präparation von Mitochondrien aus *Nicotiana tabacum*

Die Pflanzen werden wie unter 3.2.1 beschrieben angezogen. Die Präparation beruht auf der von Chaumont et al. (1994) beschriebenen Methode und wurde nach Hausmann et al. (2003) modifiziert.

8 bis 10 g Tabakblätter werden mittels eines Ultra-Turrax (Modell T25, Janke & Kunkel, Staufen, Deutschland) in 35 ml eiskaltem Aufschlußpuffer (0,33 M Saccharose, 50 mM Tris-HCl [pH 8,0], 0,2 % [w/v] BSA, 0,4 % [v/v] β -Mercaptoethanol) zerkleinert. Nach Filtrationen durch 2 Lagen Mull und eine Nylonmembran mit 50 μ m Poren wird 1ml des Homogenates abgenommen und für 5 Minuten in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert, um so einen groben cytosolischen Überstand und ein grobes organellares Pellet zu erhalten. Das restliche Homogenat wird 30 Sekunden bei 4500 xg in einem Sorvall SS34-Rotor zentrifugiert. Das Pellet wird in 2 ml Suspensionpuffer (0,4 M Mannitol, 10 mM KH_2PO_4 , 0,2 % [w/v] BSA, pH 7,2) aufgenommen. Je 1ml dieser Suspension wird auf einen zwei-stufigen Percoll-Gradienten (4 ml einer 80 %igen Percoll-Lösung und 5 ml einer 40 %igen Percoll-Lösung in 250 mM Saccharose, 0,2 % [w/v] BSA) aufgetragen und 10 Minuten bei 14400 xg in einem Beckman SW40-Rotor zentrifugiert. Die Interphase enthält die Chloroplasten während die Mitochondrien im Überstand sind. Aus diesem mitochondrienreichen Überstand werden die Mitochondrien durch Zentrifugation für 12 Minuten bei 27000 xg (Sorvall SS34-Rotor) pelletiert. Das Pellet wird in 2 ml Suspensionpuffer aufgenommen, auf einen weiteren zwei-stufigen Percoll-Gradienten (3 ml 45 %ige Percoll-Lösung und 4,5 ml 21 %ige Percoll-Lösung in 250 mM Saccharose, 0,2 % [w/v] BSA) aufgetragen und 30 Minuten bei 78500 xg zentrifugiert (Beckman SW40-Rotor). Die mitochondrienreiche Interphase wird mit einer Pasteur-Pipette vorsichtig abgesaugt und in Suspensionpuffer ohne BSA gewaschen (5 Minuten, 14000 rpm, Eppendorf-Zentrifuge).

Aus 8 - 10 g Tabakblättern können ca. 5 mg mitochondriales Protein isoliert werden.

3.3.5 Präparation von Mitochondrien aus Kartoffelknollen

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

Zwei Kilogramm Kartoffeln werden geschält und in grobe Stücke geschnitten. In zwei Litern des physiologischen Aufschlußpuffers (0,4 M Mannitol, 1 mM EGTA, 25 mM MOPS, 0,1 % BSA, 15 mM β -Mercaptoethanol, 0,05 mM PMSF) werden sie dann in einem Waring Commercial Blender durch drei Intervalle bei höchster Drehzahl zerkleinert. Die Intervalle sollten von einer kurzen Pause unterbrochen sein, um die Sedimentation größerer Stücke zuzulassen. Das Lysat wird mittels einer Obstpresse durch doppelgellige Gaze gedrückt und so von den größten Zellbruchstücken befreit.

Anschließend wird der gelbbraune Kartoffelsaft durch eine fünfminütige Zentrifugation bei 3500 xg (Sorvall 6.14-Rotor) von Zellkernen, Zellbruchstücken und Amyloplasten gereinigt. Durch eine Zentrifugation des Überstandes bei 18000 xg (Sorvall 6.14-Rotor) für 30 Minuten wird eine mitochondrienreiche Fraktion sedimentiert. Das Pellet besteht aus zwei deutlich unterscheidbaren Fraktionen. In der oberen, gelben Fraktion befinden sich aufgebrochene Organellen, Proteine und Pigmente, während sich die Mitochondrien in der unteren, braunen Fraktion anreichern. Die obere Fraktion läßt sich durch leichtes Schwenken in einem geringen Volumen des Resuspensionspuffers (0,4 M Mannitol, 1 mM EGTA, 10 mM KH_2PO_4 , 0,2 mM PMSF) abtrennen und mittels einer Pasteurpipette verwerfen.

Die weitere Aufreinigung der Mitochondrien erfolgt über sechs drei-stufigen Percoll-Gradienten (je 12 ml einer 14 %igen, 12 ml einer 26 %igen und 6 ml einer 45 %igen Percoll-Lösung in Resuspensionspuffer). Das mitochondrienreiche Pellet wird in \leq 18 ml Resuspensionspuffer aufgenommen und mit zwei sanften Hüben in einem Dounce-Homogenisator (B. Braun, Biotech International) dispergiert. Maximal 3 ml des Homogenisats werden auf einen Percoll-Stufengradienten aufgetragen.

Die Mitochondrien sammeln sich aufgrund ihrer Dichte an der Phasengrenze von 26 %iger und 45 %iger Percoll-Lösung, wenn 45 Minuten mit 32500 xg (Beckman SW 28-Rotor) zentrifugiert wird. Die Mitochondrienbande wird mit einer Pasteurpipette vorsichtig abgenommen und durch drei zehnmütige Zentrifugationsschritte in Resuspensionspuffer bei 18000 xg (Sorvall 8.24-Rotor) von störendem Percoll gereinigt. Der letzte Reinigungsschritt wird zur Bestimmung des Naßgewichts der Mitochondrien durch Differenzwägung benutzt.

Sollen äußere Mitochondrienmembranen präpariert werden (s. 3.6), so erfolgt die Präparation direkt im Anschluß an die Bestimmung des Naßgewichts der Mitochondrien. Ansonsten wird

die Endkonzentration der Mitochondriensuspension mit Resuspensionspuffer auf 0,1 g / ml eingestellt. Die Mitochondrien werden in flüssigem Stickstoff (N₂) eingefroren und bei -80°C gelagert.

Aus 2 kg Kartoffeln lassen sich etwa 0,8 bis 1 g Mitochondrien isolieren. Mitochondriales Gesamtprotein hat ca. 10 % Gewichtsanteil am Naßgewicht isolierter Mitochondrien.

3.4 Beurteilung der Sauberkeit mitochondrialer Fraktionen

3.4.1 Chlorophyll-Messung

Eine Methode Verunreinigungen mitochondrialer Fraktionen mit Chloroplasten festzustellen besteht darin, die Fraktionen auf Chlorophyll zu untersuchen. Für die Chlorophyll-Messung wurde die von Arnon (1949) beschriebene Methode verwendet.

3.4.2 Physiologische Messungen

Um die Reinheit isolierter Organellen zu überprüfen wurde die Aktivität von spezifischen Markerenzymen gemessen.

3.4.2.1 Fumarase-Messung

Die photometrische Messung der mitochondrialen Fumarase (EC 4.2.1.2) erfolgt nach der von Berkemeyer et al. (1998) beschriebenen Methode mit einigen Modifikationen. Der Reaktionspuffer enthält – bei einem Gesamtvolumen von 3 ml - 300 µM KH₂PO₄ und 150 µM L-Malat bei einem pH von 7,4 und einer konstanten Temperatur von 25°C. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 20 µl einer Suspension isolierter Mitochondrien gestartet. Die Fumarat-Produktion wird durch Messen der Absorption bei 240 nm in einem Spectrophotometer (Uvicon, Bio-Tek Instruments, Neufahrn, Deutschland) überwacht. Bei den Berechnungen wird der Absorptionskoeffizient $E_{240} = 2,44 \text{ cm}^2 \mu\text{mol}^{-1}$ benutzt.

3.4.2.2 Messung des Sauerstoffverbrauchs isolierter Mitochondrien

Der respiratorische Sauerstoffverbrauch isolierter Mitochondrien wird mit einer Clark-Elektrode bei 25°C gemessen. Gemäß Day et al. (1985) wird die Sauerstoffkonzentration in Luft-gesättigtem Wasser als 240 µM angenommen. Das Reaktionsmedium enthält 0,3 M Mannitol, 5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10 mM Phosphatpuffer (KH₂PO₄, eingestellt auf pH 7,2) und 0,1 % [w/v] BSA. Die Elektrode wird bei allen Experimenten mit 2 ml Reaktionsmedium und 50 µl isolierten Mitochondrien gefüllt.

Im ersten Test werden Mitochondrien anhand ihres Sauerstoffverbrauchs detektiert. Dazu werden dem Reaktionsmedium und den Mitochondrien 1mM ADP zugesetzt, bevor die Stimulation der Respiration der Mitochondrien durch Zugabe von Succinat (Endkonzentration: 10 mM) gemessen wird. Die Intaktheit der Mitochondrien wird gemäß Neuburger et al. (1982) überprüft, indem der oben beschriebenen Reaktionsmischung reduziertes Cytochrom c zugegeben wird und dessen stimulierender Effekt auf die Atmung der Mitochondrien gemessen wird.

Um die Verunreinigung mit Peroxisomen zu überprüfen, wird der Glycolat-Oxidase (EC 1.1.3.15) -abhängige Sauerstoffverbrauch gemessen. Dazu werden der Reaktionsmischung in der Clark-Elektrode zuerst 0,3 mM KCN und dann Glycolat (Endkonzentration: 10 mM) zugegeben (Day et al., 1985).

3.5 Trypsinieren von Mitochondrien

Das Trypsinieren von Mitochondrien setzt voraus, daß zuerst Mitochondrien präpariert wurden (s. 3.3). Dabei darf weder der Waschpuffer noch der Resuspensionspuffer PMSF enthalten, weil PMSF Trypsin inhibiert. Dem Aufschlußpuffer kann PMSF zugesetzt werden, die Konzentration sollte jedoch reduziert werden.

Aufgereinigte und ausgewogene Mitochondrien werden in 1 ml Resuspensionspuffer (400 mM Mannitol, 1 mM EGTA, 10 mM Tricin, pH 7,2) pro 0,1 mg Mitochondriengewicht aufgenommen. Es werden 25 µl Trypsin (10 mg/ml in Resuspensionspuffer) pro mg mitochondriales Protein zugegeben, gemischt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Der Trypsinverdau wird durch Zugabe von 1µl Trypsin-Inhibitor (100 mg/ml in Resuspensionspuffer) pro µl Trypsin gestoppt. Nach 2 minütiger Inkubation bei

Raumtemperatur werden die Mitochondrien pelletiert (Zentrifugation bei 14500 xg und 2°C für 10 Minuten in einem Sorvall SS34-Rotor). Anschließend folgt die Präparation von äußeren Mitochondrienmembranen (s. 3.6), wobei nun wieder allen Lösungen PMSF zugeben wird.

3.6 Präparation von äußeren Mitochondrienmembranen

Bei dieser Präparation wird die geringere Dehnbarkeit der äußeren im Verhältnis zu der inneren Mitochondrienmembran ausgenutzt. Zuerst werden die Mitochondrien zum Schwellen gebracht, so daß die äußere Membran straff gespannt ist. Dann wird im Homogenisator Druck auf die Mitochondrien ausgeübt. Dadurch werden die äußeren Membranen, die sich nicht weiter dehnen können, abgesprengt, während die inneren Membranen, die aufgrund ihrer wesentlich größeren Oberfläche dehnbarer sind, unversehrt bleiben. Abschließend werden die äußeren Membranen durch eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation von den Mitoplasten (d.i. Mitochondrien ohne äußere Membran) getrennt. Die äußeren Membranen können durch eine zweite diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation zusätzlich von löslichen Proteinen befreit werden.

Alle verwendeten Geräte und Lösungen werden vorgekühlt. Die Präparation findet auf Eis statt. Die äußeren Mitochondrienmembranen werden direkt im Anschluß an die Isolierung der Mitochondrien aus den frischen Mitochondrien gewonnen. Das ausgewogene Mitochondrienpellet (siehe 3.3) wird in 6 ml Schwellpuffer (5 mM K-phosphat, pH 7,2 [pH-Wert einstellen durch Titrieren von KH_2PO_4 mit $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$], 0,2 mM PMSF) aufgenommen und auf Eis inkubiert. Die Inkubation dauert für Kartoffel-Mitochondrien acht und für Arabidopsis-Mitochondrien sechs Minuten. Anschließend wird mit Schwellpuffer aufgefüllt (s. Tab. 1) und weitere 4 Minuten auf Eis inkubiert. Durch zwanzig sanfte Hübe des Teflonstößels in einem Dounce Homogenisator (B. Braun, Biotech International) werden die äußeren Membranen von den geschwollenen Mitochondrien abgesprengt („Pottern“).

Tabelle 1: Schwellungspuffervolumen in Abhängigkeit von der Mitochondrienmenge

Mitochondriengewicht (g)	Gesamtvolumen (ml)
< 0,3	6
< 0,45	9
< 0,6	12
< 0,75	15
≥ 0,75	18

Je 3 ml der Suspension werden nun auf einen Saccharosegradienten (1 ml 60 %ige, 4 ml 32 %ige und 1,5 ml 15 %ige Saccharoselösung in 10 mM MOPS, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF) aufgetragen und für 60 Minuten bei 2°C und 130000 xg (Beckman SW40-Rotor) zentrifugiert. Die äußeren Membranen sammeln sich an der Phasengrenze von 15 %iger und 32 %iger Saccharose-Lösung an. Die Mitoplasten bilden eine Bande an der Grenze zwischen der 32 %igen- und der 60 %igen-Phase.

Die Banden werden mit einer Pasteurpipette entnommen. Sie werden entweder sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Sollen die präparierten Membranen besonders sauber sein (nicht mit löslichen Proteinen verunreinigt), so kann man sie mittels eines zweiten diskontinuierlichen Saccharosegradienten (Auftriebsgradient) weiter reinigen. Dazu wird das Volumen der Membranfraktion bestimmt.

Die Saccharosekonzentration der Fraktion wird auf 25 % geschätzt. Mit 70 %iger Saccharoselösung (in 10 mM MOPS, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF) wird die Membranlösung auf 50 % Endkonzentration gebracht. In Zentrifugenröhrchen (Ultra-Clear™ Centrifuge Tubes, 14 x 95 mm; Beckman, USA) werden Saccharosegradienten gegossen. Dazu werden 5ml 50 % Saccharose-Membranfraktions-Lösung mit 5ml 32 % Saccharoselösung und 1,5 ml 0 % Saccharoselösung (10 mM MOPS, 1 mM EDTA, 0,2 mM PMSF) überschichtet und für 5 Stunden bei 2°C und 243000 xg (Beckman SW40-Rotor) zentrifugiert. Die 32 % - 0 %-Interphase enthält die von löslichen Proteinen befreiten Membranen. Sie wird mit einer Pasteurpipette entnommen und entweder sofort weiterverwendet oder in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die Ausbeute liegt bei ca. 0,5 mg Protein der äußeren Membran pro 100 mg mitochondriales Gesamtprotein.

3.7 Aufreinigung von Eiweißfraktionen

3.7.1 Eiweißfällung von Gesamtprotein für die IEF (TCA/Aceton)

(nach Tsugita und Kamo, 1999)

Für den Zellaufschluß wird die gewünschte Menge an Frischmaterial ausgewogen, bei -80°C eingefroren und auf flüssigem Stickstoff im Kühlraum bei 4°C gemörsert oder in der Schüttelmühle bei -80°C zerkleinert. Der so gewonnene Proteinpuder kann eingefroren oder sofort im Anschluss weiter verarbeitet werden.

Für die eigentliche Eiweißfällung werden 500 mg des Puders in 5 ml Aceton mit 10 % [w/v] TCA und 20 mM DTT aufgenommen und für 45 Minuten bei -20°C inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 35000 xg (Kontron A 24.24-Rotor). Das Pellet wird gewogen, in Lösung B (20 mM DTT, 1 mM PMSF in Aceton; pro Gramm 10faches Volumen in ml) resuspendiert und für 1 h bei -20°C inkubiert. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 Minuten bei 35000 xg wird das Pellet wieder in Lösung B (pro Gramm 10faches Volumen in ml) gewaschen und pelletiert (15 Minuten, 35000 xg). Das Pellet wird für mindestens 1 h unter dem Abzug getrocknet und dann bei -80°C gelagert.

3.7.2 Phenolextraktion und Fällung von Eiweißen für die IEF

(nach Hurkman and Tanaka, 1986 und Meyer et al., 1988, modifiziert)

Der Zellaufschluss erfolgt wie unter 3.7.1 beschrieben. 200 μg des Proteinpuders werden in 500 μl Extraktionspuffer (700 mM Saccharose, 500 mM Tris, 50 mM EDTA, 100 mM KCl, 2 % [v/v] β -Mercaptoethanol, 2 mM PMSF) aufgenommen und für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach Zugabe von 500 μl Phenol wird die Lösung für 30 Minuten bei Raumtemperatur geschüttelt und dann für 10 Minuten bei 5000 xg und 4°C zentrifugiert (Eppendorf Zentrifuge). Die proteinhaltige Phenolphase wird abgenommen und in einem Äquivolumen Extraktionspuffer gewaschen (10 Minuten, 5000 xg, 4°C). Um die Eiweiße aus dem Phenol zu fällen, wird die Phenolphase mit dem 4 - 5 fachen ihres Volumens 0,1 M Ammoniumacetat in Methanol für mindestens 4 Stunden, besser aber über Nacht, bei -20°C inkubiert. Das Präzipitat wird dreimal mit der Ammoniumacetatlösung gewaschen und einmal in Aceton. Dazu wird es jeweils für 5 Minuten bei 35000 xg und 4°C zentrifugiert. Das

Eiweißpellet wird bei Raumtemperatur unter dem Abzug getrocknet und dann entweder bei – 80 °C eingeforen oder gleich für die IEF vorbereitet.

3.8 Grundmethoden der Proteinanalyse

3.8.1 Proteinbestimmung

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wurden die Methoden von Bradford (1976) und Lowry et al. (1951) verwendet. Als besonders für die Analyse von Proben mit hohem Membranproteinanteil geeignet erwies sich die BCA-Methode (BCA = Bicinchoninic Acid) nach Stoscheck (1990). Die Lipide in den Membranfragmenten, die bei den beiden anderen Proteinbestimmungen zu nicht-linearen Meßergebnissen führen, stören bei der BCA-Methode nicht.

In alkalischen Lösungen wird in Gegenwart von Proteinen Cu^{2+} zu Cu^+ reduziert. Cu^+ bildet mit BCA einen lila-farbenen Komplex, der in alkalischen Medien stabiler ist als der Folin-Komplex (Lowry-Test). Deshalb ist der Test weniger störanfällig, als der Lowry-Test. Das Arbeiten in alkalischer Lösung erleichtert den Nachweis von Membranproteinen, die im Bradford-Test (saure Bedingungen) in der Regel nicht in Lösung gehen. Der Messbereich reicht von 0,2 bis 50 μg .

Die Indikator-Reagenz setzt sich aus 100 Volumenteilen Lösung 1 (25,75 mM Na-Bicinchoninat (BCA), 188 mM Na_2CO_3 , 5,67 mM Na-Tartrat, NaOH, 0,1 M NaHCO_3 , pH 11,25) und 2 Volumenteilen Lösung 2 (160 mM $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ -Lösung) zusammen. 1 ml der Indikator-Reagenz werden mit 20 μl Probe gemischt, 30 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert und nach dem Abkühlen der Proben innerhalb von 1 Stunde im Photometer gemessen (Wellenlänge: 562 nm).

3.8.2 Tricin-SDS-PAGE

(nach Schägger and von Jagow, 1987)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine klassische Methode zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht. Die Proteine erhalten durch das anionische Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) eine gleichmäßige negative Ladung, so daß sich ihre Wanderungsgeschwindigkeit in einem elektrischen Feld annähernd umgekehrt proportional zum dekadischen Logarithmus ihres Molekulargewichtes verhält.

SDS ist ein amphiphiles Molekül, das einen polaren Rest trägt und sich zu sphärischen Micellen zusammenlagert. Amphiphile Moleküle, zu denen viele Membranlipide und Detergenzien gehören, zeigen in Abhängigkeit von ihrer kritischen micellaren Konzentration (CMC: höchste erreichbare Monomerenkonzentration) in wäßrigem Milieu eine übermolekulare Selbstorganisation. Unterhalb der CMC liegen die Moleküle als Monomere vor, oberhalb der CMC treten verstärkt Aggregate (Micellen) auf. Die CMC hängt von der Struktur der Lipide oder Detergenzien, der Salzkonzentration, der Temperatur und dem pH-Wert ab.

Mit steigender Konzentration werden Biomembranen lysiert, Komponenten selektiv aus ihnen herausgelöst und schließlich die Lipiddoppelschicht zerstört. Es entstehen Lipid-Protein-Detergenz-, Protein-Detergenz- und Lipid-Detergenz-Micellen. Die hohe CMC von SDS ist für seine guten Detergenzeigenschaften verantwortlich, da für die gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen Monomere benötigt werden. SDS bildet mit löslichen und Membranproteinen stabförmige, negativ geladene Komplexe in konstanten Massenverhältnissen. Die Länge der Komplexe ist der Molekularmasse ungefähr proportional. Darauf beruht die Bestimmung von Molekularmassen von Polypeptiden durch Tricin-SDS-PAGE.

Die Porengröße des Gels wird durch die Acrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad bestimmt, wobei der Vernetzungsgrad durch die Bisacrylamidkonzentration festgelegt wird. Durch die Parameter (T) % und (C) % wird die Zusammensetzung des Gels angegeben: Der T-Wert steht für die Gesamtkonzentration an Acrylamid und Bisacrylamid in % (w/v), der C-Wert für das prozentuale Verhältnis von Bisacrylamid zum Gesamtacrylamid.

Das hier verwendete Tricingel ist ein diskontinuierliches Gel, das aus Trenn- und Probengel besteht. Zusätzlich kann zwischen diese beiden Gele zu Lasten des Trenngels ein Spacergel gegossen werden.

Das Spacergel dient der zusätzlichen Trennung von großen und kleinen Proteinen, was schließlich zu einer besseren Auftrennung besonders der kleineren Proteine führt.

Ein Vorteil dieser Methode ist die gute Trennung kleiner Proteine zwischen 1 und 50 kDa. An der Grenze von Proben- zu Spacergel werden die Proteine in engen Banden konzentriert; der Mechanismus dafür ist bisher unbekannt. Proteine, die größer als 30 kDa sind, werden bereits im Spacergel voraufgetrennt, wodurch ein sanfter Übertritt ins Trenngel ermöglicht und letztendlich Überladungseffekte reduziert werden.

Als Gelapparatur dient das Protean II-Modell von Biorad, USA. Die Geldimensionen betragen 20 x 16 cm, die Geldicke je nach Anwendung 0,1 oder 0,15 cm. Die Herstellung des Gels erfolgt wie in Schägger and von Jagow (1987) beschrieben.

Die Proben werden 1 : 1 mit 2 x Probenpuffer (10 % SDS, 30 % Glycerin, 100 mM Tris, 4 % β -Mercaptoethanol, 0,006 % Bromphenolblue) gemischt und in die Taschen gefüllt. Leere Taschen werden mit 1 x Probenpuffer gefüllt. Als Größenstandart dienen die "Rainbow-Marker" RPN 755 und 756 von Amersham, GB.

Die Elektrophorese erfolgt in einem 1 mm-Gel bei 30 mA und maximal 500 V, in einem 1,5 mm-Gel bei 45 mA und maximal 500 V für 16,5 h bei Raumtemperatur.

3.8.3 Isoelektrische Fokussierung (IEF)

Die isoelektrische Fokussierung (IEF) wurde mit dem IPGphor-System (Amersham-Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) unter Verwendung von Immobiline DryStrip Gelstreifen (18 cm) gemäß den Anweisungen des Herstellers (Berkelman and Stensted, 1998) durchgeführt. Meist wurden dabei Gelstreifen mit einem nicht linearen Gradienten von pH 3 bis pH 10 verwendet.

Mitochondrien (100 μ g Protein) oder aus Blau-nativen Gelen elektroeluiertes Protein (10 μ g) werden in 10 μ l Lysis-Lösung (8 M Harnstoff, 4 % [v/v] Triton X-100, 40 mM Tris, 50 mM DTT, 0,1 mM PMSF) gelöst und eine Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt, bevor 340 μ l Rehydrierungspuffer (8 M Harnstoff, 2 % [v/v] Triton X-100, 0,5 % [v/v] IPG-Puffer, 20 mM DTT, sehr wenig Bromphenolblue) zugegeben werden. Die Lösung kommt mit dem

Gelstreifen in den Gelträger und wird mit IPG-Coverfluid, einem Mineralöl, das Evaporation und das Ausfallen des Harnstoffs verhindert, überschichtet. Während der zwölfstündigen Rehydrierung bei 30 V nimmt der Gelstreifen mit dem Rehydrierungspuffer auch das Protein auf. Die Fokussierung erfolgt in vier Schritten: bei 500 V (1 Stunde), 500 – 1000 V (1 Stunde), 1000 – 8000 V (4 Stunden) und 8000V (6 Stunden). Meist folgt dann als zweite Dimension eine Tricin-SDS-PAGE.

Sollen die Gele massenspektrometrisch untersucht werden, so wird in der Lysislöung und im Rehydrationspuffer das Triton X 100 durch den gleichen Prozentanteil CHAPS ersetzt.

3.8.4 Tricin-SDS-PAGE als zweite Dimension einer IEF

Ein Tricin-SDS-Gel mit den Dimensionen 20 cm x 20 cm x 1 mm wird wie in 2.8.2 beschrieben gegossen, allerdings mit nur Trenn- und Spacergel. Dabei soll das Spacergel bis ca. 2 cm unterhalb des Randes der inneren Glasplatte reichen. Der Gelstreifen aus der IEF wird für zweimal 15 Minuten unter Schütteln in 50 mM Tris-HCl [pH 8,8], 6 M Harnstoff, 30 % [v/v] Glycerin, 2 % [w/v] SDS und einer Spur Bromphenolblue inkubiert. Das erste Mal wird unmittelbar vor Gebrauch 1 % [w/v] DTT zugegeben, das zweite Mal 4,8 % [w/v] Iodacetamid. Der Gelstreifen wird dann kurz in Gelpuffer (3M Tris, 0,3 % SDS, pH 8,45) gewaschen, auf dem Gel positioniert und mit 0,5 % Agarose und etwas Bromphenolbau in Gelpuffer übergossen und so auf dem Gel befestigt. Der Gellauf erfolgt bei 30 - 35 mA pro mm Geldicke und maximal 500 V für 18 – 20 Stunden.

3.8.5 Probenvorbereitung für die Massenspektrometrie

Alle Schritte sind mit in Wasser gewaschenen Handschuhen durchzuführen, um Kontaminationen mit Keratin und PEG zu vermeiden. Des weiteren sollte der Arbeitsplatz möglichst frei von Staubeintrag (offenes Fenster, u.s.w.) sein.

Aus einem zweidimensional IEF/ Tricin-SDS-Gel oder BN/ Tricin-SDS-Gel werden mit einer abgeschnittenen blauen Pipettenspitze einzelne Proteinspots ausgestochen. Wurde nicht die colloidale Coomassie-Färbung (s. 3.8.8) angewandt, werden die Gelstückchen 2 x 15 min in ddH₂O gewaschen. Dann werden die Gelstückchen zuerst für 30min in 250 µl 25 mM

Ammoniumbicarbonat geschüttelt, dann 2 x 30 Minuten in 50 % Acetonitril, 25 mM Ammoniumbicarbonat. Die Überstände werden verworfen und die Gelstückchen in einer Vakuumzentrifuge (Univapo 150H, Unieqip) getrocknet. Auf einer sehr sauberen Glasplatte werden die Gelstückchen in 10 – 20 µl Verdaulösung (20 µg Trypsin laut Herstellerangaben aktivieren und 1 : 100 mit 50 mM Ammoniumbicarbonat verdünnen) quellen lassen, in ca. 1 mm² große Stückchen zerteilt, in ein Eppendorfgefäß überführt, knapp (10 – 30 µl) mit Verdaulösung überschichtet und bei 37°C für mindestens 4 Stunden – besser über Nacht – inkubiert. Die Peptide werden durch 30 minütiges Schütteln der Gelstückchen - zuerst in 100 µl 50 mM Ammoniumbicarbonat und dann zweimal in je 100 µl 60 % [v/v] Acetonitril, 0,5 % [v/v] Ameisensäure - aus den Gelstückchen gelöst. Die gesammelten Überstände werden in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Peptide werden in 12 µl 5 % Methanol, 0,5 % [v/v] Ameisensäure gelöst (1 Minute im Ultraschallbad, vortexen und anzentrifugieren oder alternativ: vortexen, zentrifugieren, vortexen, zentrifugieren), und mit vorbehandelten C₁₈ ZipTips (C₁₈ ZipTip mit 10 µl 60 % [v/v] Methanol, 0,5 % [v/v] Ameisensäure waschen [3 x auf und ab]. Danach mit 10 µl 5 % [v/v] Methanol, 0,5 % [v/v] Ameisensäure equilibrieren [4 bis 5 x auf und ab].) 10 x langsam auf- und abpipettiert, mit 10 µl 5 % [v/v] Methanol, 0,5 % [v/v] Ameisensäure gewaschen (5 x auf und ab) und mit 10 µl 60 % [v/v] Methanol, 0,5 % [v/v] Ameisensäure eluiert (3 x auf und ab).

3.8.6 MALDI-TOF Massenspektrometrie

MALDI-TOF ist die Abkürzung für Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of Flight.

Die gereinigte, trypsinierte Probe wird in einem Verhältnis von 1 : 10⁴ bis 1 : 10⁵ mit gelösten Matrix-Molekülen vermischt und auf einen metallischen Probenhalter aufgetragen. Der Probenhalter besitzt ca. 50 abgetrennte Areale für verschiedenen Proben plus zwei weitere für die Standards. Die Matrix besteht in der Regel aus kleinen organischen Molekülen wie 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) oder 3,5-Dimethoxy-4-hydroxyzimtsäure (Sinapinsäure). Durch Verdunstung des Lösungsmittels bilden sich Cokristalle aus Matrix- und Probenmolekülen. Aufgabe der Matrix ist es, den Übergang der Probenmoleküle von der festen in die gasförmige Phase (Sublimation) zu erleichtern, und für die notwendige Ionisation der Probenmoleküle zu sorgen. Dazu wird der Cokristall mit einem kurzem Laser-Impuls

beschossen. Die Wellenlänge des Lasers wird dabei so gewählt, daß sie dem Absorptionsmaximum der Matrixmoleküle entspricht. Durch die auf diese Weise eingebrachte Energie wird das Gitter in dem beschossenen Bereich instabil, Matrixmoleküle lösen sich aus dem Verband heraus und mit ihnen ebenfalls einige der Probenmoleküle. Gleichzeitig erfolgt eine Ionisierung dieser Probenmoleküle durch die Matrix. Da die Energie bei der MALDI-TOF nicht direkt in die Probenmoleküle geleitet, sondern in erster Linie von der Matrix aufgenommen wird, ist sie eine schonende Methode, mit der auch temperaturempfindliche Proteine analysiert werden können.

Nachdem die Probenmoleküle aus der Matrix herausgelöst und ionisiert wurden, werden sie von einem elektronischen Feld in Richtung des Detektors (bei Geräten mit linearer Driftstrecke) bzw. des Ionenspiegels beschleunigt. Die Ionen werden dabei entsprechend ihres Masse/Ladungsverhältnis (m/z -Verhältnis) auf eine unterschiedliche Geschwindigkeit beschleunigt. Da bei diesem Ionisationsverfahren praktisch nur einfach geladene Ionen entstehen (was sich deutlich aus den entstehenden Massenspektren ablesen läßt), hängt ihre Endgeschwindigkeit also nur noch von ihrer Massenträgheit ab. Das Durchqueren der sich anschließenden feldfreien Driftstrecke bis zum Detektor dauert daher bei Ionen hoher Masse länger als bei solchen, die eine geringere Masse besitzen. Auf diesem Effekt beruht die Analyse in einem Flugzeit (Time-of-Flight)-Massenspektrometer.

Ein typische MS-Spektrum für ein Peptid oder ein Protein besteht in der Regel aus vielen Peaks, da sich eine unterschiedliche Anzahl von Isotopen in den einzelnen Molekülen befindet, wobei das wichtigste von ihnen ^{13}C ist. Man erhält ein Spektrum, in dem sich die Peaks um 1 Da voneinander unterscheiden. Hieran kann man auch erkennen, daß es sich um einfach geladene Ionen handeln muß, da sich bei zweifach geladenen Ionen auch Peakabstände von 0,5 Da ergeben müßten.

In der Auswertung bezieht man sich bei Peptiden auf die monoisotopische Masse (nur das häufigste Isotop jedes Elementes geht in die Berechnung mit ein), bei großen Peptiden und Proteinen bezieht man sich jedoch auf die Durchschnittsmasse (average mass), bei deren Berechnung alle Isotope eines Elementes unter Berücksichtigung ihrer Häufigkeit einfließen.

Die MS wird von Dr. Lothar Jänsch, GBF, Abt. Zellbiologie, Braunschweig, durchgeführt.

3.8.7 Coomassie-Färbungen

In Acrylamidgelen aufgetrennte Proteine können durch eine Färbung mit Coomassie Blue nachgewiesen werden. Der Farbstoff Coomasie Blue ($C_{45}H_{44}N_3NaO_7S_2$) bindet dabei an die Proteine. Die Gele werden für mindestens zwei Stunden - je nach Geldicke und Gelkonzentration - in einer Färbelösung (0,25 % [w/v] Coomassie Blue G250, 45 % Methanol, 9,2 % Essigsäure) inkubiert. Dabei wird das gesamte Gel blau gefärbt. Deshalb wird es anschließend in Entfärber (35 % Methanol, 7,5 % Essigsäure) so lange entfärbt, bis sich die Proteinbanden klar vom Hintergrund abheben. Der Entfärber wird wiederholt gewechselt und zwar dann, wenn die Farbe von Gel und Entfärber durch Diffusion des Coomassie Blue gleich geworden ist.

3.8.8 Coomassie-colloidal Färbung

Die Coomassie-colloidal Färbung ist etwa doppelt so sensitiv wie die sonst übliche Wasser/Methanol/Essigsäure-Methode (3.8.7), der Hintergrund wird deutlich reduziert. Zudem kann das Gel mit Wasser entfärbt werden, was für eine Probenaufbereitung für die Massenspektrometrie von Vorteil ist.

Die Färbelösung wird am Vortag der Färbung aus 98 % [v/v] Lösung A (2 % [w/v] *ortho*-Phosphorsäure (85 % H_3PO_4), 10 % [w/v] Ammoniumsulfat) und 2 % [v/v] Lösung B (5 % [w/v] Coomassie Blue G250) angesetzt und über Nacht kräftig geschüttelt. Das Gel wird 30 Minuten in einer Fixierungslösung (40 % Ethanol, 10 % Essigsäure) geschwenkt und dann für mindestens 3 Stunden - besser aber über Nacht - in 80 % Färbelösung und 20 % Methanol gefärbt. Bei 40 – 45°C halbiert sich Färbungsdauer. Das Gel wird mit viel H_2O -bidest. entfärbt. Bei starker Hintergrund-Färbung kann zum Entfärben auch 20 % Methanol verwendet werden.

3.8.9 Silberfärbung

(nach Heukeshoven and Dernick, 1988, modifiziert)

Neben der Coomassie-Färbung bietet sich zum Nachweis von Proteinen in Polyacrylamidgelen die empfindlichere Silberfärbung an. Mit ihr ist der Nachweis nur 0,5 ng Protein pro Bande möglich.

Silberionen binden bei einem pH-Wert über 10,5 durch Komplexbildung an die Proteine in der Gelmatrix. Die komplexierten Silberionen werden im Entwicklungsschritt reduziert und erscheinen dadurch braun.

Das Gel wird zunächst zwei Stunden in einer Fixierungslösung (50 % Methanol, 10 % Essigsäure) geschwenkt, dann weitere zwei Stunden in einer Inkubationslösung (30 % Ethanol, 0,8 M Natriumacetat, 0,2 % [w/v] Natriumthiosulfat, 0,5 % Glutaraldehyd). Es folgen drei Waschschrte á zwanzig Minuten in H₂O-bidest.. Die Bindung des Silbers an die Proteine erfolgt während einer dreißigminütigen Inkubation in Silbernitratlösung (0,1 % [w/v] Silbernitrat, 0,01 % Formaldehyd). Das überschüssige Silbernitrat wird durch gründliches Spülen (30 Sekunden) mit H₂O-bidest. entfernt. Dann wird das Gel solange in Entwickler (2,5 % [w/v] Na₂CO₃, 0,1 % Formaldehyd, pH 10,9 mit NaHCO₃-Pulver einstellen) inkubiert, bis das Proteinmuster deutlich zu sehen ist. Das Entwickeln wird durch Schwenken in Stopplösung (0,05 M EDTA) beendet.

3.8.10 Western-Blotting

(nach Towbin et al., 1979)

Um elektrophoretisch in einem Gelsystem aufgetrennte Proteine und Proteinkomplexe ohne Veränderung des Trennmusters weiteren Analysen zugänglich zu machen, können diese mittels Western Blotting auf - je nach Zielsetzung unterschiedliche - Membrantypen transferiert werden. Dabei macht man sich wieder die Eigenladung der Proteine und ihre Wanderung im elektrischen Feld zunutze. Die Proteine binden kovalent an die Membran, so daß das jeweilige Bandenmuster erhalten bleibt. Anschließend können die Proteine auf den Membranen mit unterschiedlichen Methoden angefärbt oder ausgeschnitten und sequenziert werden.

Nach Abschluß einer Gelelektrophorese werden Gel und Filter (Nitrocellulosefilter BA 83, Schleicher und Schuell, Dassel) „sandwich-artig“ zwischen Schaumstoffschwämmen und Whatman-Filtern fixiert. Der Transfer der Proteine vom Gel auf den Filter erfolgt im Naßblotverfahren in einem mit Transferpuffer (150 mM Glycin, 20 % Methanol, 20 mM Tris-HCl [pH 8,8]) gefüllten Puffertank (Trans Blot Cell, 18 x 24 x 9,5 cm, Elektrodenabstand 8 cm, Biorad, USA) entweder bei 200 mA für 6 Stunden oder bei 120 mA über Nacht.

Falls eine Aminosäuresequenzierung von aus präparativen Gelen transferierten Proteinen erfolgen soll, werden die Proteine auf PVDF-(Polyvinylidenfluorid-) Membranen (Roth, Karlsruhe) transferiert. Die PVDF-Membranen zeichnen sich durch hohe Bindekapazität und Proteinundurchlässigkeit aus. Das Gel wird dreimal 10 Minuten in Transferpuffer (20 mM Tris-HCl [pH 8,8], 20 % Methanol, 0,04 % SDS, 1 mM Dithiotreitol) vorinkubiert. Die auf Gelgröße zugeschnittene PVDF-Membran wird jeweils eine Minute in Methanol und in Transferpuffer inkubiert. Der Transfer erfolgt bei 500 mA und 4°C in sechs Stunden unter ständigem Rühren. Im Anschluß werden die Membranen dreimal 10 Minuten in H₂O-bidest. gespült. Um bestimmte Proteinbanden identifizieren und ausschneiden zu können, wird der Blot mit Ponceau S gefärbt (s. unten). Der getrocknete Blot kann sowohl vor als auch nach dem Färben bei -20°C gelagert werden.

An Membranfilter gebundene Proteine können durch Färben mit Ponceau S (Sigma, USA) sichtbar gemacht werden. PVDF-Membranen müssen mit Methanol gesättigt sein, bevor sie mit der wäßrigen Ponceau-Lösung angefärbt werden können.

Die Membranen werden drei mal zehn Minuten in H₂O-bidest. gewaschen, um das SDS, welches aus dem Transferpuffer stammt, zu entfernen. Dann werden sie fünf bis zehn Minuten in Ponceau-Lösung (1 % Essigsäure, 0,3 % [w/v] Ponceau S) gefärbt. Durch kurzes zwei- bis dreimaliges Spülen mit H₂O-bidest. wird der unspezifisch bindende Farbstoff entfernt. Ein komplettes Entfärben oder Nachfärben ist jederzeit möglich. Die Immunreaktivität der Proteine bleibt von dieser Behandlung unbeeinflusst.

3.8.11 Immunfärbung

(nach Hsu et al., 1981)

Mittels spezifischer Antikörperreaktionen können einzelne Proteine zuvor aufgetrennter und geblotteter Proteingemische identifiziert werden. Eine besonders sensitive Methode basiert auf einer über das Avidin-Biotin-System verstärkten Farbreaktion. Primäre Antikörper werden dabei von biotinylierten sekundären Antikörpern erkannt, an die Avidin bindet. Avidin wiederum besitzt insgesamt vier Bindungsstellen. An die drei freien Stellen können biotinylierte Peroxidasen binden, die DAB mit H_2O_2 als Oxidationsmittel zu einem dunklen Niederschlag oxidieren können.

Für eine Immunfärbung müssen die Western-Blots für 30 Minuten in TTBS (100 mM Tris-HCl [pH 7,4], 155 mM NaCl, 0,1 % Tween 20) abgesättigt werden. Dann wird entsprechend den Anweisungen im Vectastain-ABC-Kit (Vector Inc., USA) verfahren: Der Western-Blot wird zusammen mit dem primären Antikörper (Verdünnung 1 : 1000 in 20 ml TTBS) für mindestens zwei Stunden - besser über Nacht – luftblasenfrei in eine Plastikfolie eingeschweißt und leicht geschüttelt. Dann wird für jeweils zwei Stunden erst mit dem sekundären Antikörper (1 Tropfen pro 20 ml TTBS) und dann mit dem Avidin-Peroxidasekomplex (je ein Tropfen pro 20 ml TTBS) unter Schütteln inkubiert. Nicht spezifisch gebundene Moleküle werden zwischen den einzelnen Inkubationsschritten mit TTBS (3 x 10 Minuten) gewaschen. Mit der Entwicklungslösung (0,3 mM $NiCl_2$, 0,003 % H_2O_2 , 1,5 mM DAB, 100 mM Tris-HCl [pH 7,4]), die für maximal 10 Minuten verwendbar ist, werden die vom primären Antikörper erkannten Proteine sichtbar gemacht.

3.8.12 Proteinsequenzierung

Eine N-terminale Sequenzierung eines Proteins gibt in der Regel nur Aufschluß über einen Teil der Proteinsequenz. Zudem sind einige Proteine N-terminal blockiert, so daß sie nicht nach dem Prinzip der zyklischen Proteindegradierung (Edman, 1950) sequenziert werden können. Die Analyse interner Aminosäure-Sequenzen erfordert eine definierte Fragmentierung des Proteins. Dabei finden sequenzspezifische Endoproteinasen Verwendung. Die dabei entstehenden Peptide können im Anschluß an eine HPLC-Auftrennung einzeln

sequenziert werden. Die HPLC-Auftrennungen und Aminosäuresequenzierungen für die vorliegende Arbeit wurden von Dr. Volker Kruft, Applied Biosystem GmbH, durchgeführt.

Enzymatische Proteinspaltung:

(nach Graak et al., 1991 und Grohmann et al., 1991)

Proteine, die durch Western-Blotten auf eine PVDF-Membran transferiert, mit Ponceau S gefärbt und so sichtbar gemacht wurden, werden mit einem Skalpell aus der Membran ausgeschnitten. Sie werden in je 1 ml PVP-40-Lösung (0,2 % Polyvinylpyrrolidon 40 in MetOH) für 30 Minuten inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend werden die Membranstücke viermal mit 1 ml H₂O-bidest. und einmal mit 1 ml Reaktionspuffer (100 mM Tris-HCl [pH 8,0]) gewaschen. Es folgt die Verdauung des Proteins mit 0,15 U Endoproteinase Lys C (Sequencing Grade; Boehringer Mannheim GmbH) oder Trypsin (Sequencing Grade; Boehringer Mannheim GmbH) in 350 µl Reaktionspuffer für 15 Stunden bei 37°C. Die Überstände werden dekantiert. Die auf den Membranstücken verbliebenen Peptide werden durch zweimaliges, 15 minütiges Waschen mit 350 µl 80 %iger Ameisensäure von den Membranen gelöst, anschließend werden die Membranstücke mit 350 µl H₂O-bidest. gewaschen. Überstand, Ameisensäure-Fractionen und Waschwasser werden vereinigt und in einer Vakuumzentrifuge (Univapo 150H, Unieqip) auf weniger als 200 µl eingengt.

HPLC-Auftrennung:

(nach Kruft et al., 1991 und Kruft, 1992)

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 pro Minute aufgetrennt. Die Detektion der Proteine erfolgt mit Hilfe eines Durchflußphotometers bei 220 nm. Das Eluat wird in 60 Sekunden-Fractionen unterteilt.

Proteinsequenzierung:
(nach Lottspeich, 1985)

Die Aminosäuresequenzen von Proteinen (gebunden an PVDF-Membranstreifen) und Peptiden (eingeeingte und in 30 µl Trifluoressigsäure neu aufgenommene HPLC-Fractionen) werden nach dem Prinzip der zyklischen Proteindegradierung vom N-Terminus her (Edman, 1950) mit einem automatischen Proteinsequenzierer (Modell 477A, Applied Biosystem GmbH, USA) bestimmt. Phenylthiohydantoin-Aminosäuren werden über eine "High Performance Liquid Chromatographie" (HPLC) mit dem Modell 120A von Applied Biosystem, USA, aufgetrennt. Durch manuelle Datenauswertung werden die Aminosäuren identifiziert und ihrer Elutionsreihenfolge entsprechend angeordnet.

3.9 Blue Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

(nach Schägger and von Jagow, 1991, modifiziert nach Werhahn et al., 2001)

Die Blue Native-PAGE ist ein Verfahren zur nativen Auftrennung von Membranproteinen entsprechend ihrer Gesamtmolekulargewichte in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel. Prinzipiell ist eine native gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen gemäß ihrer Gesamtladung möglich. Membranproteine weisen jedoch meist nur eine geringe Eigenladung auf. Zudem maskieren die für die Solubilisierung eingesetzten nicht-ionischen Detergenzien die Proteinladung. Das Hauptproblem bei der Isolation von Membran-Proteinkomplexen ist ihre Tendenz zu aggregieren und nach der Solubilisierung aus Membranen zu denaturieren. Aus diesem Grund stören bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von Membranproteinen im Trenngel anwesende Detergenzien.

Bei der Blue Native-PAGE werden diese Probleme vermieden, da außer einem neutralen Detergenz zur Solubilisierung der Proteine aus den Membranen keine weiteren Detergenzien nötig sind. Bei der Solubilisierung werden die Membranen je nach Art und Konzentration des Detergenz in ihrer Struktur zerstört und micelliert. Die Membranproteine bleiben dabei in hydrophobem Kontakt mit den Lipiden und/oder Detergenzmolekülen.

Die Neuerung bei der Blue Native-PAGE ist, daß Coomassie Blue im Proben- und Kathodenpuffer enthalten ist. In Abwesenheit von Detergenzien bindet Coomassie Blue aufgrund seiner geringen Wasserlöslichkeit eng an die meisten Membranproteine und hält die gebundenen Proteine so in Lösung. Die negative Eigenladung des Coomassie Blue stellt die

Grundlage für die unidirektionalen Wanderung der mit dem Farbstoff assoziierten Proteine im elektrischen Feld dar. Nebeneffekt der Verwendung von Coomassie Blue ist die Färbung der Proteine während der Elektrophorese, wodurch die anschließende Detektion erleichtert wird. Die Aminocaprinsäure (ACA) ersetzt in der Blue Native-PAGE die sonst bei Gelelektrophoresen üblichen Salze, deren Einsatz größtenteils zur Präzipitation von Coomassie Blue und der mit dem Farbstoff verbundenen Proteine führt.

Mit Proben- und Trenngel basiert die BN-PAGE auf dem Tricingelsystem. Für die Untersuchungen der vorliegenden Dissertation wurde ein 4,5 - 16 %iges Acrylamid-Gradientengel als Trenngel eingesetzt, das eine gute Auftrennung von Proteinen und Proteinkomplexen im Bereich von 100 kDa bis 1000 kDa erlaubt. Neben dem Acrylamidgradienten wird auch ein Glyceringradient benutzt, um die Diffusion der Acrylamidmoleküle nach dem Gießen und bis zur vollständigen Polymerisation möglichst gering zu halten. Alle Arbeitsschritte werden bei 4°C durchgeführt.

Gießen eines Gradientengels:

Für die Auftrennung muß ein Acrylamid-Gradientengel hergestellt werden. Als Gelapparatur dient das Protean II-Modell von Biorad, USA. Die Geldimension beträgt 20 x 16 x 0,15 cm mit 10 Taschen. Das Trenngel wird als lineares Acrylamid-Gradientengel von 4,5 % (Polyacrylamid, T = 4,5 % / C = 3 %, 250 mM ACA, 25 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4°C) bis 16 % (Polyacrylamid, T = 16 % / C = 3 %, 250 mM ACA, 20 % Glycerin, 25 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4°C) mit einem Gradientenmischer bei 4°C gegossen. Dabei beginnt das Gel mit einem 1 cm hohen kontinuierlichen 4,5 %igen Abschnitt, der die Aggregation besonders großer Proteinkomplexe minimiert. Das Gel polymerisiert bei Raumtemperatur in 45 bis 70 Minuten. Anschließend wird das Probengel (Polyacrylamid, T = 4 % / C = 3 %, 250 mM ACA, 25 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4°C) gegossen, das für seine vollständige Polymerisation mehrere Stunden benötigt. Das Gel kann mit ungezogenem Kamm über Nacht bei 4°C gelagert werden.

Probenvorbereitung:

Die BN-PAGE wurde in dieser Dissertation zur Auftrennung von Proteinkomplexen von Mitochondrien, Mitoplasten, Chloroplasten und äußeren mitochondrialen Membranen genutzt.

Mitoplasten (s. 3.6) werden 1 : 1 mit Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol, 1 mM EGTA, 0,2 mM PMSF, 10 mM Tricin-KOH [pH 7,2]) verdünnt. Isolierte Organellen (max. 1 mg Protein pro BN-Spur) werden pelletiert (Eppendorf-Zentrifuge, 5 Minuten, Mitochondrien und Mitoplasten 15000 xg, Chloroplasten 1250 xg) und in 75 µl ACA 750 (750 mM Aminocapronsäure [ACA], 50 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,0 bei 4°C) resuspendiert. Die Solubilisierung erfolgt durch Zugabe einer 10%-n-Dodecylmaltosid-Lösung (trivial: Laurylmaltosid), so daß eine Endkonzentration von 1 – 2,5 % entsteht (bei Chloroplasten bis zu 3,5 %). Alternativ kann auch Digitonin der gleichen Konzentration verwendet werden. Durch eine weitere Zentrifugation für 30 Minuten bei 15000 xg werden nicht lösliche Bestandteile pelletiert. Der Überstand wird in Eppendorfgefäße mit 15 µl Serva (750 mM ACA, 5% Serva Blue 250 G) überführt, so das eine Serva-Endkonzentration von 0,6 – 1,2 % entsteht. Es müssen mindestens 250 µg Gesamtprotein pro BN-Spur vorbereitet werden, soll eine Coomassie Blue-Färbung des Gels erfolgen. Für eine zweite Geldimension werden 1000 µg Gesamtprotein pro BN-Spur angesetzt.

Äußere Mitochondrienmembranen (s. 3.6) werden 1 : 4 mit Gradientenpuffer (10 mM EDTA, 0,2 mM PMSF, 100 mM MOPS-KOH [pH 7,2]) verdünnt und durch eine Ultrazentrifugation (Beckman SW40-Rotor) für 90 Minuten bei 100000 xg und 2°C pelletiert. Das Probenmaterial für eine Gelspur (100 µg Protein) wird in 75 µl ACA 750 (750 mM Aminocapronsäure [ACA], 50 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,0) resuspendiert. Anschließend erfolgt die Solubilisierung der Membranen mit 75 µl einer 10 %igen Digitoninlösung (10 % [w/v] Digitonin, 750 mM ACA, 0,5 mM EDTA, 50 mM Bis-Tris, pH 7,0). Nicht solubilisierte Bestandteile werden durch eine Zentrifugation bei 50000 xg (Sorvall F-20/Micro-Rotor) und 2°C für 20 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wird in Eppendorfgefäße mit 15 µl Serva (750 mM ACA, 5% Serva Blue 250 G) überführt, so das eine Serva-Endkonzentration von 0,6 – 1,2 % entsteht.

In nicht benutzte Geltaschen wird Probenpuffer (750 mM ACA, 0,25 % Serva Blue 250 G) eingefüllt, um eine gleichmäßige Lauffront zu erzeugen.

Gellauf:

30 Minuten vor dem geplanten Gellauf wird dem Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 0,1% [w/v] Serva Blue 250 G, 15 mM Bis-Tris, pH 7,0) 0,03 % Laurylmaltosid hinzugefügt (nur wenn mit Laurylmaltosid solubilisiert wurde). Kathoden- und Anodenpuffer (50 mM Bis-Tris, pH 7,0) werden zur Vorinkubation mindestens 20 Minuten vor dem Gelstart in die entsprechenden Tanks der Laufvorrichtung gefüllt. Der Probeneinlauf erfolgt bei 100 V für 45 Minuten. Die Stromstärke darf dabei maximal 15 mA betragen. Die Auftrennung bei 15 mA und maximal 500 V dauert 11 Stunden. Nach der Auftrennung der Proteinkomplexe im nativen Gradientengel können diese entweder sofort mit Coomassie gefärbt werden, oder man analysiert ihre Zusammensetzung unter denaturierenden Bedingungen in einer weiteren Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2. Dimension).

3.10 Tricin-SDS-PAGE als zweite Dimension einer BN-PAGE

Als Gelapparatur dient das Protean II-Modell von Biorad, USA. Die Geldimensionen betragen 20 x 16 x 0,1 cm. Aus einem Blau nativen Gel (1. Dimension, s. 3.9) werden einzelne Gelspuren ausgeschnitten und in einer Denaturierungslösung (1 % β -Mercaptoethanol, 1 % SDS) für 45 Minuten inkubiert. Zur Analyse von chloroplastidären Proteinkomplexen wird die Denaturierungslösung in den letzten fünf Minuten auf 60°C erwärmt. Da β -Mercaptoethanol die Polymerisation von Polyacrylamid stark hemmt, müssen die Gelstreifen gründlich mit H₂O-bidest. gespült werden, bevor sie auf einer Glasscheibe der Gelgießeinrichtung in Höhe der sonst vorhandenen Geltaschen quer zur Laufrichtung des Gels plaziert werden. Auch einzelne ausgeschnittene Proteinbanden sollten so plaziert werden. Trenn- und Spacergel werden am Gelstreifen vorbei wie in 2.8.2 beschrieben gegossen. Nach deren Polymerisation wird der Gelstreifen in das Probengel (Polyacrylamid, T = 10 % / C = 3 %, 500 mM ACA, 10 % Glycerin, 0,1 % SDS, 50 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4°C) eingegossen, so daß er knapp überschichtet ist. Auf Grund von β -Mercaptoethanol-Resten müssen die APS- und TEMED-Mengen um mindestens 25 % der sonst üblichen Mengen erhöht werden. Unvollständig polymerisiertes Probengel oberhalb des Gelstreifens wird entfernt. Die Elektrophorese erfolgt bei 30 mA und maximal 500 V für 16,5 h bei Raumtemperatur.

3.11 Elektroelution

(nach Schägger, 1995, modifiziert)

Die Elektroelution von nativen Proteinen und Proteinkomplexen wird bei 4°C durchgeführt. Die verwendete Apparatur (Electro-Eluter/Concentrator, Modell ECU-040 von CBS Scientific Co., Del Mar, CA) entspricht der in Hunkapillar et al. (1983) beschriebenen. Um möglichst wenig Protein durch unspezifische Bindungen an die Elutionskammer und die Dialysemembranen (ca. 2 kDa Ausschlußgröße) zu verlieren, werden diese vor dem Gebrauch für fünf bis zehn Minuten in Elutionspuffer (25 mM Tricin, 7,5 mM Bis-Tris [pH 7,0], 0,1 mM PMSF) inkubiert, dem 1 % [v/v] Ethanolamin zugesetzt wurde. Der Ladeschacht einer Elutionskammer wird mit bis zu neun aus einem BN-Gel ausgeschnittenen Proteinbanden beladen. Während der Elution (4-6 Stunden bei 350 V oder über Nacht bei (100 -) 150 V) wandern die Proteine in den Sammelschacht, wo sie sich in den untersten 0,2 – 0,5 ml Elutionspuffer sammeln, die durch die Assoziation der Proteine mit Coomassie Blue gut zu erkennen sind. Für eine Analyse des Eluates durch eine SDS-PAGE, sollte es zuvor einer auf Phenol / Diäthylather-basierenden Proteinkonzentration (Roti-Collect, Roth) unterzogen werden. Bei diesem Verfahren werden außerdem Salze, die die Elektrophorese behindern, minimiert. Soll das Eluat mittels IEF analysiert werden, bietet sich die im folgenden Kapitel (3.12) beschriebene Proteinfällung an.

3.12 3D-PAGE

(nach Werhahn and Braun, 2002)

Die 3D-PAGE besteht aus einer leicht modifizierten BN-PAGE (1. Dimension, s. 3.9) mit anschließender Elektroelution (s. 3.11), Proteinfällung und dann einer IEF (2. Dimension) mit anschließender Tricine-SDS-PAGE (3. Dimension, beide unmodifiziert; s. 3.8.3 & 3.8.4).

1. Dimension: BN-PAGE

Wegen des Materialverlustes ist es nötig in der ersten Dimension mehrere Spuren mit identischen Proben zu beladen. Die daraus ausgeschnittenen Proteinkomplexe können dann zusammen elektroeluiert werden. Die Kathodenpuffer I & II sind unbedingt zu verwenden, da

sie nicht nur das Erkennen von Banden ohne zusätzliche Färbung ermöglichen, sondern auch weil Coomassie-assoziierte Proteine in der IEF nicht getrennt werden können.

Das native Gel wird gegossen wie für die BN-PAGE beschrieben und auch der Gellauf findet wie beschrieben statt, aber statt des Kathodenpuffers wird Kathodenpuffer I (50 mM Tricin, 0,03 % [w/v] Serva Blue 250 G, 15 mM Bis-Tris, pH 7,0) verwendet, der nur 1/3 des Coomassies des Standard-Kathodenpuffers enthält. Nach einem Drittel der Laufzeit – also nach 3:55 h, wenn 45' Proben-Einlauf und 11 h Trennungszeit gewählt werden – wird der Kathodenpuffer I durch 350 ml Kathodenpuffer II (50 mM Tricin, 1ml Kathodenpuffer I, 15 mM Bis-Tris, pH 7,0) ersetzt. Wenn zur Solubilisierung Laurylmaltosid verwendet wurde, ist auch den Kathodenpuffern 0,03 % Laurylmaltosid zuzusetzen.

Elektroelution:

Weil Kathodenpuffer mit wenig Coomassie verwendet wurden, sind auf dem BN-Gel die Proteinkomplexe auch ohne zusätzliche Färbung gut zu sehen. Sollte das nicht der Fall sein kann eine halbe oder ganze Spur abgeschnitten und mit Coomassie gefärbt werden (s. 3.8.7) oder zweidimensional mittels eines Tricine-SDS-Gels aufgetrennt werden (s. 3.10), um dann zur Auffinden, bzw. zur Identifizierung von Proteinkomplexen zu dienen. Das Eluat ist wahrscheinlich hellblau.

Die Elektroelution wird gemäß 3.11 durchgeführt.

Proteinfällung:

Es wird soviel 10 %ige TCA-Lösung zum Eluat geben, daß die TCA-Konzentration 3 – 4 % beträgt, anschließend folgt eine Inkubation auf Eis für 10 Minuten. Nach Zentrifugation für 10 Minuten bei 13000 xg und 2°C wird, wenn möglich, das Gewicht des Pellets bestimmt (es ist wahrscheinlich so leicht, daß der Meßfehler zu groß wird). Das Pellet wird in Waschlösung [20 mM DTT, 1mM PMSF in Aceton] (pro Gramm 10faches Volumen in ml, bzw. 100 - 200 µl) resuspendiert und für 1 h bei –20° C inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 35000 xg und 2°C und Resuspendieren des Pellets in Waschlösung (pro Gramm 10faches Volumen in ml, bzw. 100-200 µl), sowie eine weitere Zentrifugation für 15 Minuten bei 35000 xg und 2°C. Das Pellet wird für mindestens 1 h unter dem Abzug getrocknet. Das Eiweißpulver wird bei –80° C eingefroren.

2. Dimension IEF und 3. Dimension Tricine-SDS-PAGE :

erfolgen gemäß den Protokollen 3.8.3 und 3.8.4.

3.13 Grundtechniken zur Analyse von DNA

Sofern nicht anders aufgeführt, werden Charakterisierungen von Plasmid-DNA wie Restriktionsanalysen, elektrische Auftrennung in Agarose-Gelen und andere Grundtechniken der molekularen Genetik gemäß Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

Plasmid-DNA aus einzelnen *Escherichia coli*-Kolonien wird über Anionenaustausch-Chromatographie (Quiagen-Säulen) gemäß der Vorschrift des Herstellers (Quiagen, Düsseldorf) isoliert.

Doppelsträngige Plasmid-DNA wird mittels der Didesoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al. (1977) von der Firma Replicon, Berlin auf ALF-Sequencern (Pharmacia, USA) durchgeführt.

3.14 Computer-Auswertungen

Der Vergleich von zweidimensionalen Gelen erfolgt mit dem Programm ImageMaster 2D Elite (Amersham Pharmacia Biotech).

Anfangs wurde für Datenbanksuchen und Sequenzvergleiche das GCG-Programmpaket (Devereux et al., 1984) verwendet, später Programme, die in Internet kostenlos zur Verfügung stehen. Viele verwendete Programme sind auf dem ExPASy (Expert Protein Analysis System) Server (<http://www.expasy.ch/>) des Swiss Institute of Bioinformatics und bei Molecular Biology Shortcuts (MBS) zu finden. MBS firmiert jetzt unter JustBio (<http://www.justbio.com/>).

Zur Identifikation von Aminosäure- und Nukleotidsequenzen werden mittels der Programme FASTA, TFASTA, TFASTX3, BLAST und TBLSTN Datenbanken bei The Arabidopsis

Information Resource (<http://www.arabidopsis.org/>), beim Kazusa DNA Research Institute (<http://www.kazusa.or.jp/en/>), bei The Institute For Genomic Research (<http://www.tigr.org/>), am munich information center for protein sequences (<http://mips.gsf.de/>), an der The Organelle Genome Database (<http://megasun.bch.umontreal.ca/gobase/>) und am National Center for Biotechnology Information, Bethesda, USA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) durchsucht. FASTA sucht, nach der Methode von Pearson and Lipman (1988), nach Ähnlichkeiten zwischen einer Ausgangssequenz und einer beliebigen Gruppe von Sequenzen des gleichen Typs. TFASTA und TFASTX3 leiten von einer Aminosäuresequenz Nukleinsäuresequenzen ab und suchen nach der selben Methode nach Ähnlichkeiten dieser abgeleiteten Sequenzen zu einer beliebigen Gruppe von Nukleinsäuresequenzen. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) und TBLASTN vergleichen Sequenzen nach der Methode von Altschul et al. (1990), wobei TBLASTN eine zu identifizierende Aminosäuresequenz zuerst in die Nukleinsäuresequenz übersetzt und dann mit Nukleinsäure-Datenbanken vergleicht. Einige ESTs wurden beim Arabidopsis Biological Resource Center (<http://aims.cps.msu.edu/>) bestellt. Protein- und DNA-Sequenzen werden mit dem MBS – SeqCleaner von Datenbankmarkierungen und ähnlichem befreit. Die Translation von Nukleinsäuresequenzen erfolgt mit dem Programm TRANSLATE (ExpASy) oder mit dem MBS – Quick Protein Translator. Molekulare Massen und isoelektrische Punkte von Proteinen werden mittels des Compute pI/Mw tool (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html) berechnet.

Multiple Alignments werden mit den Programmen PILEUP (GCG-Programmpaket), ClustalW (<http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/>) oder SIM + LALNVIEW (ExpASy) erstellt und mit GeneDoc (<http://www.cris.com/~ketchup/genedoc.shtml>) ausgewertet. Abstammungsverhältnisse werden schnell mit TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview>) oder gründlicher mittels der Programme SEQBOOT, PROTDIST, NEIGHBOR, CONSENSUS und DRAWGRAM aus dem Phylip-Programmpaket bestimmt. Hydrophobizitätsprofile werden mit dem DNA Strider-Programmpaket erstellt. Für Proteine kodierende Regionen genomischer DNA werden durch das Programm GeneBuilder (<http://www.itba.mi.cnr.it/webgene/>), wenn möglich durch Vergleich mit bekannten homologen Sequenzen, vorhergesagt. Die subzelläre Lokalisation von Proteinen wird mit

Hilfe der Programme MITOPROT (<http://www.mips.biochem.mpg.de/cgi-bin/proj/medgen/mitofilter/>) und TargetP v1.01 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) bestimmt.

4 Ergebnisse

4.1 Überprüfung der Reinheit von Mitochondrienpräparationen aus grünem Pflanzengewebe

In grünen Pflanzenzellen kommen zahlreiche Chloroplasten vor, die teilweise eine ähnliche Größe, eine ähnliche Dichte sowie ähnliche Sedimentationseigenschaften wie typische Pflanzenmitochondrien aufweisen. Die Form, Größe und Dichte der Chloroplasten ist bei verschiedenen Pflanzenarten unterschiedlich (Kirk and Tilney-Bassett, 1978; Pyke, 1999). Zudem variiert die Dichte der Chloroplasten in Abhängigkeit vom Licht: Während des Tages ist der Calvin-Zyklus aktiv, und es wird oftmals Stärke gebildet, die nachts wieder abgebaut werden kann; als Folge gibt es circadiane Schwankungen bei der Dichte von Chloroplasten. Darüber hinaus können in Pflanzenzellen neben den Chloroplasten noch weitere Plastidentypen vorkommen (Proplastiden, Amyloplasten, Chromoplasten, Leukoplasten, ...) mit physikalischen Eigenschaften, die ebenfalls denen der Mitochondrien ähneln können. Daher ist die Isolierung von hochgradig sauberen Mitochondrienfraktionen aus grünen Zellen nur schwer durchführbar und die verwendete Methode muß an die Art der Pflanze, das verwendete Gewebe und dessen physiologischen Zustand angepaßt werden. (In vielen Forschungsprojekten zu Pflanzenmitochondrien wird daher nicht-grünes bzw. etioliertes Pflanzengewebe als Ausgangsmaterial für Mitochondrienisolationen bevorzugt, was jedoch den Nachteil hat, daß die Rolle der Mitochondrien im photosynthetischen Stoffwechsel der Pflanzenzelle nicht untersucht werden kann (Millar et al., 2001)).

In der Literatur sind mehrere Methoden beschrieben, wie Mitochondrien aus grünem Pflanzengewebe isoliert werden können, die jedoch fast alle von drei bis vier „Grundmethoden“ abgeleitet sind. Alle diese Methoden beruhen auf einer Kombination von differentiellen Zentrifugationen und Percoll-Dichtegradienten-Zentrifugationen (Douce et al., 1987; zusammengefaßt in Millar et al., 2001). Von Day et al. (1985) wurde eine Methode zur Isolierung von Mitochondrien aus Erbsen entwickelt, die oft zitiert und auch für die Isolierung von Mitochondrien aus anderen Pflanzen verwendet wird. Dabei wird ein linearer PVP-25-Gradient, der mit einem selbstaufbauenden linearen Percollgradienten kombiniert ist, verwendet (s. 3.3.3). Chaumont et al. (1994) gelang die Isolierung von Mitochondrien aus Tabak, indem sie zwei aufeinanderfolgende Percoll-Stufengradienten einsetzten (s. 3.3.4), und

Berkemeyer et al. (1998) verwendeten einen kontinuierlichen Percollgradienten, um Mitochondrien aus Arabidopsis-Blättern zu isolieren.

Da für die Durchführung von Proteomanalysen in ganz besonderem Maße Mitochondrienfraktionen mit hoher Reinheit vorliegen sollten, wurden in einem ersten Teil der vorliegenden Dissertation verschiedene publizierte Protokolle zur Mitochondrienisolierung aus unterschiedlichen Pflanzen getestet und die Reinheit der generierten Fraktionen mit biochemischen, physiologischen und gelelektrophoretischen Verfahren untersucht.

4.1.1 Biochemische und physiologische Verfahren zur Analyse von Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe

Die Reinheit von Organellenpräparationen kann zum Beispiel durch die Vermessung der Aktivität von Leitenzymen für unterschiedliche Kompartimente der Zelle durchgeführt werden oder durch physiologische Messungen mit einer Sauerstoffelektrode, bei denen isolierte Mitochondrien mit Substraten versorgt werden und anschließend die respiratorische Sauerstoffabnahme gemessen wird.

Alle Methoden zur Isolation von Mitochondrien aus Erbsen, Tabak und Arabidopsis wurden mindestens sechs mal wiederholt. Die physiologischen Meßergebnisse in Tabelle 2 sind aus je zwei typischen Isolationen gemittelt. Als erstes wurde nach der Isolation der Mitochondrien die Proteinausbeute gemessen. Dafür wurde die BCA-Methode (BCA = Bicinchoninic Acid) nach Stoscheck (1990) (s. 3.8.1) gewählt, mittels derer der Proteingehalt der Fraktionen, die viele Membranfragmente enthielten, zuverlässig bestimmt werden kann. Membranlipide, die bei anderen Proteinbestimmungen (Bradford, 1976 und Lowry et al., 1951) zu nicht-linearen Meßergebnissen führen, stören bei der BCA-Methode nicht.

Um Verunreinigungen mitochondrialer Fraktionen mit Chloroplasten festzustellen, wurden die Fraktionen auf Chlorophyll untersucht. Für die Chlorophyll-Messung wurde die von Arnon (1949) beschriebene Methode verwendet (s. 3.4.1). Allerdings können so Verunreinigungen mit Plastiden, die kein Chlorophyll enthalten, und mit unreifen Chloroplasten (Proplastiden) nicht festgestellt werden.

Im ersten Enzymtest wurden Mitochondrien anhand ihres Sauerstoffverbrauchs detektiert. Dazu wurde durch Zugabe von Succinat die Respiration der Mitochondrien stimuliert und

dann der Sauerstoffverbrauch gemessen (s. 3.4.2.2). Die Intaktheit der Mitochondrien wird gemäß Neuburger et al. (1982) überprüft, indem den Mitochondrien reduziertes Cytochrom c zugegeben wird und dessen stimulierender Effekt auf die Atmung der Mitochondrien gemessen wird. Nur wenn die Mitochondrienmembranen beschädigt sind, kann das Cytochrom c Elektronen an die innere Mitochondrienmembran übertragen und die Respiration stimulieren. Durch die beschädigten Mitochondrienmembranen können lösliche Matrix-Proteine verloren gehen. Als Leitenzym für die mitochondriale Matrix diente die Fumarase (s. 3.4.2.1). Um Verunreinigung der Mitochondrienfraktionen mit Peroxisomen zu überprüfen, wurde der Glycolat-Oxidase abhängige Sauerstoffverbrauch nach Zugabe von Kaliumcyanid gemessen (s. 3.4.2.2).

Tabelle 2: Biochemische und physiologische Charakterisierung mitochondrialer Fraktionen, die aus grünem Pflanzengewebe aufgereinigt wurden

Pflanze	Methode	Frisch-Gewicht	Protein ^a Ausbeute	Chlorophyll zu Protein	O ₂ -Verbrauch			Fumarase
					Succinat	Reduziertes Cytochrom c	Glycollat	
		[g]	[mg]	[µg mg ⁻¹]	[nmol O ₂ (min mg Protein) ⁻¹]			gebildetes Malat [nmol (min mg Protein) ⁻¹]
Erbse	Day et al. (1985)	130	0,975	1,0	804,5	144,5	0,00	83,5
Tabak	Chaumont et al. (1994)	8	0,170	10,2	0,00	1453,0	0,00	nicht bestimmt
	Day et al. (1985)	92	0,375	8,7	1039,0	1352,0	422,6	11,7
Arabidopsis	Kruft et al. (2001)	75	0,142	0,0	685,0	388,0	208,5	2,9

a: BCA-Methode

Laut den physiologischen Daten ist die Mitochondrienisolation aus Erbsen nach Day et al. (1985) die beste der getesteten Methoden. Der Chlorophyllgehalt der Mitochondrienfraktion war niedrig. Eine Analyse der Thylakoidmembranproteine zeigt - ausgehend von einem Protein zu Chlorophyll-Verhältnis von 10 (Andersson and Anderson, 1985) - daß die Verunreinigung mit Thylakoid-Proteinen bei ca. einem Prozent liegt. Wie der hohe Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Succinat zeigt, waren viele Mitochondrien in der Fraktion, deren Atmungskette gut funktionierte. Die sehr geringe Sauerstoffproduktion bei Stimulation mit reduziertem Cytochrom c zeigt, daß die Mitochondrien intakt waren, was auch von der hohen Fumarase-Aktivität unterstützt wird. Es war kein Glycolat-Oxidase abhängiger Sauerstoffverbrauch festzustellen, was zeigt, daß die untersuchte Fraktion peroxisomenfrei war.

Wie unser Versuch zeigt, ist es recht einfach, die verschiedenen Organellen der Zellen von grünen Erbsenblättern zu trennen, so daß Erbsen oft für Untersuchungen des pflanzlichen Metabolismus verwendet werden (Nash and Wiskich, 1983). Für viele andere Anwendungen sind aber andere Pflanzen besser geeignet. Tabak z.B. kann leicht transformiert werden und das Genom von Arabidopsis ist mittlerweile komplett sequenziert und es gibt viele interessante Arabidopsis-Mutanten.

Die Mitochondrien-Isolate aus Tabak enthalten zwar keine aktiven Peroxisomen, aber der hohe Chlorophyllgehalt zeigt eine starke Verunreinigung mit Chloroplasten an (ca. 10 %). Die sehr große Atmungsaktivität nach Zugabe von reduziertem Cytochrom c macht deutlich, daß die Mitochondrien bei der Präparation zerstört wurden (Succinat dient als Substrat am Anfang der Atmungskette.) Da die Succinat-Zugabe die mitochondriale Atmung überhaupt nicht stimuliert, läßt sich schließen, daß nicht nur die Mitochondrien als Ganzes, sondern sogar die innere Mitochondrienmembranen zerstört wurden. Nur noch Teile der Atmungskette sind funktionsfähig und können durch reduziertes Cytochrom c aktiviert werden. Es scheint als wäre es nur gelungen, Bruchstücke von Mitochondrien zu isolieren, die für die meisten weiteren Versuche nutzlos sind.

Arabidopsis dient in dieser Dissertation als Modell-Pflanze. Es wurden mehrere Methoden zur Mitochondrienisolation getestet: (i) eine von Berkemeyer et al. (1998) entwickelte Methode für Arabidopsis-Mitochondrien, (ii) die Day et al. (1985) –Methode, ursprünglich für Erbse publiziert, und (iii) eine Methode, die im Rahmen der vorliegenden Dissertation neu entwickelt wurde (Kruft et al., 2001). Es ergeben sich folgende Resultate: Das Protokoll von Berkemeyer et al. erwies sich bei allen Versuchen als völlig ungeeignet. Die beiden anderen Methoden lieferten Mitochondrien mit intakter Atmungskette, wie der hohe Sauerstoffverbrauch beim Succinat-Test zeigt. Der Zustand der Mitochondrien läßt sich nicht eindeutig feststellen. Die nach Day et al. isolierten Mitochondrien verbrauchten nach Zugabe von Cytochrom c sehr viel Sauerstoff, was auf zerstörte Mitochondrienmembranen hinweist; andererseits zeigt die Fumarase-Aktivität, daß noch mitochondriale Matrix-Proteine im Isolat waren. Wahrscheinlich ist ein Großteil der Mitochondrien zerstört worden und nur ein geringer Teil intakt geblieben, was auch die deutlich geringere Malat-Produktion - im Vergleich zu den mit der selben Methode aus Erbsen isolierten Mitochondrien - erklärt. Die selbst entwickelte Methode liefert genau das entgegengesetzte Ergebnis. Reduziertes Cytochrom c regte die Atmung nur wenig an, was darauf hindeutet, daß der größte Teil der Mitochondrien intakt ist. Andererseits wurde im Fumarase-Test nur sehr wenig Malat gebildet

– die nach Day et al. isolierten Mitochondrien bildeten viermal soviel – was eigentlich bedeutet, daß der größte Teil der Matrix-Proteine bei der Isolation verlorengegangen ist, und nur ein kleiner Teil der Mitochondrien intakt war. Hier sollte dem Succinat-Test die größere Aussagekraft zugesprochen werden, da beim Fumarase-Test nur ein einziges Enzym der mitochondrialen Matrix getestet wird, das auch aus anderen Gründen eine reduzierte Aktivität aufweisen kann. Da auch die Verunreinigung der Mitochondrien mit Chloroplasten und Peroxisomen bei der selbst entwickelten Methode geringer ist – Chlorophyll kann hier gar nicht nachgewiesen werden – kann sie als die beste der getesteten Methoden zur Aufreinigung von Arabidopsis-Mitochondrien bezeichnet werden.

4.1.2 Gelelektrophoretische Verfahren zur Analyse von Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe

Die in 4.1.1 beschriebenen Methoden zur Überprüfung der Reinheit von isolierten Mitochondrien haben alle den Nachteil, daß für jede vermutete Kontamination der Mitochondrien ein eigener Test durchgeführt werden muß. Außerdem wird die An- oder Abwesenheit eines bestimmten Organellentyps in dem Mitochondrien-Isolat nur anhand einzelner Enzymaktivitäten aus einzelnen suborganellaren Fraktionen bestimmt. Dies macht die verwendeten Verfahren zu einer nicht absolut zuverlässigen Methode, um die Reinheit der

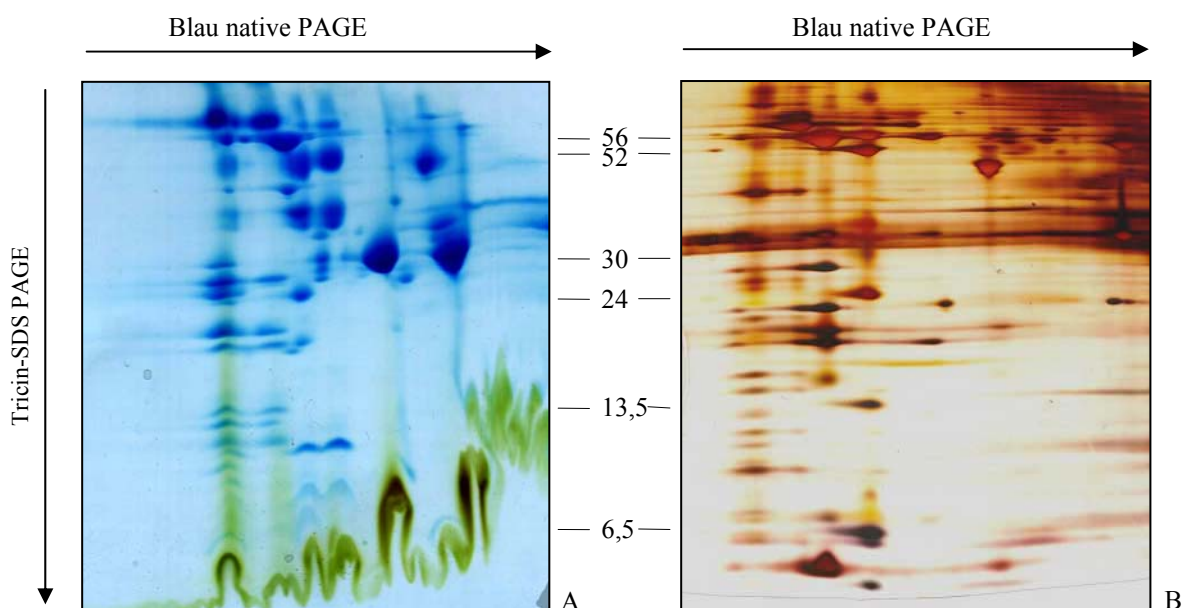


Abb. 4 Vergleich der Untereinheitenzusammensetzung von Proteinkomplexen aus Chloroplasten (A) und Mitochondrien (B) von Arabidopsis mit Hilfe der zweidimensionalen BN/ SDS-PAGE. Das Chloroplastengel ist Coomassie-blue gefärbt, das Mitochondriengel ist silber-gefärbt. Die Zahlen zwischen den Gelen stehen für die molekularen Massen von Standard Proteinen (in kDa).

isolierten Mitochondrien zu überprüfen, wie auch die widersprüchlichen Ergebnisse bei der Untersuchung der Intaktheit der nach der selbst entwickelten Methode aufgereinigten Arabidopsis-Mitochondrien zeigen. Der durchgeführte Chlorophyll-Test läßt zwar Aussagen zur Anwesenheit von Chloroplasten im Isolat zu, kann aber keine Angaben zu möglichen Verunreinigungen mit anderen Plastiden, die kein Chlorophyll enthalten (Proplastiden, Etioplasten...), liefern.

Optimal wäre ein Verfahren, das es ermöglicht, alle im Isolat befindlichen Organellen zu identifizieren. Die Blau-native Gellelektrophorese (BN-PAGE) dient der Auftrennung von Proteinkomplexen, die in einer zweiten denaturierenden Geldimension in ihre Untereinheiten zerlegt und anhand des von diesen gebildeten Musters identifiziert werden können. Da Mitochondrien und Chloroplasten mit sehr unterschiedlichen Proteinkomplexen bestückt sind (s. Abb. 4), wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation ein Verfahren verwendet, um die Reinheit von Mitochondrienpräparationen mit 2D BN/ SDS-PAGE zu testen.

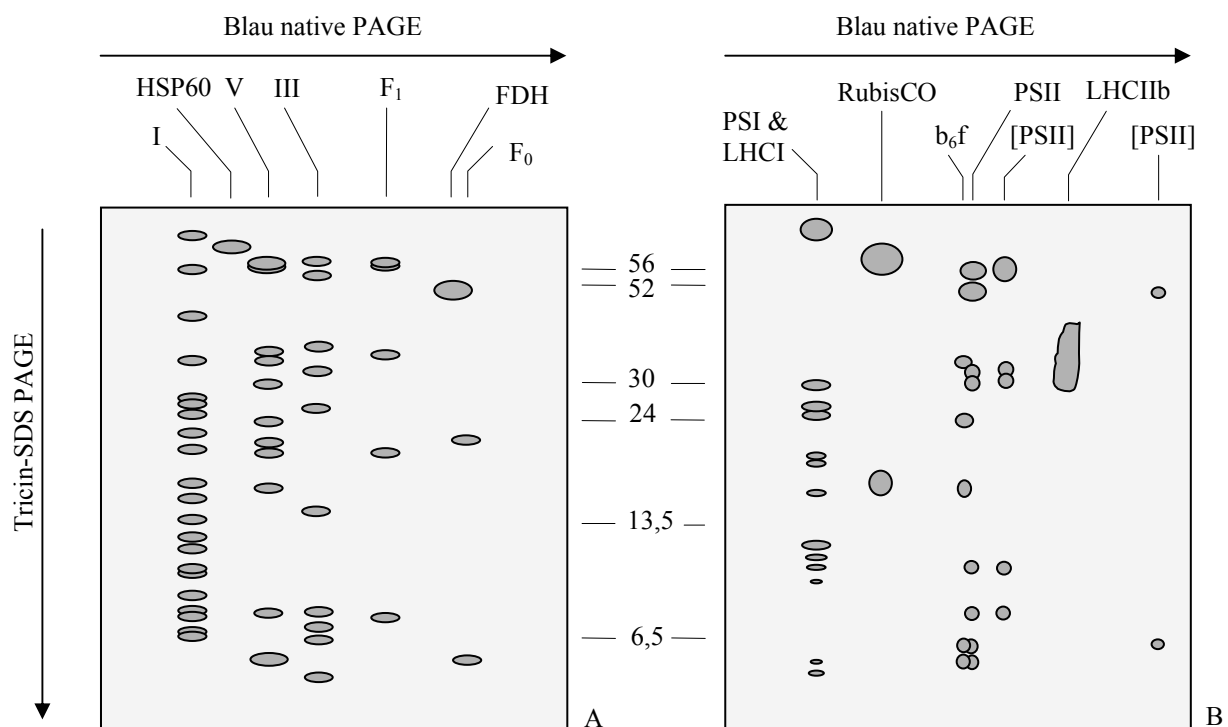


Abb. 5 Schematische Darstellung organellarer Proteinkomplexe nach Auftrennung mittels zweidimensionaler BN/SDS-PAGE. (A) Mitochondriale Proteinkomplexe, (B) chloroplastidäre Proteinkomplexe. Die Schemata wurden nach Gelen erstellt, die in Jänsch et al. (1996) und Kügler et al. (1997) veröffentlicht wurden. Die Bezeichnungen oberhalb der Schemata identifizieren die Proteinkomplexe: I: NADH-Dehydrogenase; HSP60: Hitzestress-Protein 60; V: F₀F₁-ATP-Synthase-Komplex; III: Cytochrome c-Reduktase; F₁, F₀: F₁ und F₀ Teile des ATP-Synthase-Komplexes; FDH: Format-Dehydrogenase; PSI: Photosystem I; LHCI: Light harvesting Komplex I; RubisCO: Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase; b₆f: Cytochrome b₆f-Komplex; PSII: Photosystem II; [PSII]: Subkomplex des Photosystems II; LHCIIb: Light harvesting Komplex IIb. Die Zahlen zwischen den Gelen stehen für die molekularen Massen von Standard Proteinen (in kDa).

In Abbildung 5 sind die Proteinkomplexe von Arabidopsis-Chloroplasten und -Mitochondrien idealisiert dargestellt. Bei den Mitochondrien nehmen die Proteinkomplexe der Atmungskette, die in der inneren Mitochondrienmembran sitzen, den größten Platz ein. Die MPP-Untereinheiten der Cytochrom c-Reduktase gehören zu den häufigsten mitochondrialen Proteinen. Als Protein der mitochondrialen Matrix ist HSP60 (Hitze-streßprotein 60) ein guter Marker für die Intaktheit der Mitochondrien. Bei den Chloroplasten kann RubisCO (Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase) diese Funktion übernehmen. Die Photosysteme und die Lichtsammelkomplexe sind dagegen membrangebundene Proteinkomplexe. Der b_6f -Komplex der Elektronentransportkette kann als Indikator für Plastiden im allgemeinen dienen, weil er auch in Etioplasten vorkommt (Herrmann et al., 1992). Zur Analyse der Reinheit und Intaktheit von Mitochondrien- oder Chloroplastenfraktionen langt also ein zweidimensionales BN-Tricin/ SDS-Gel völlig aus (s. Abb. 6).

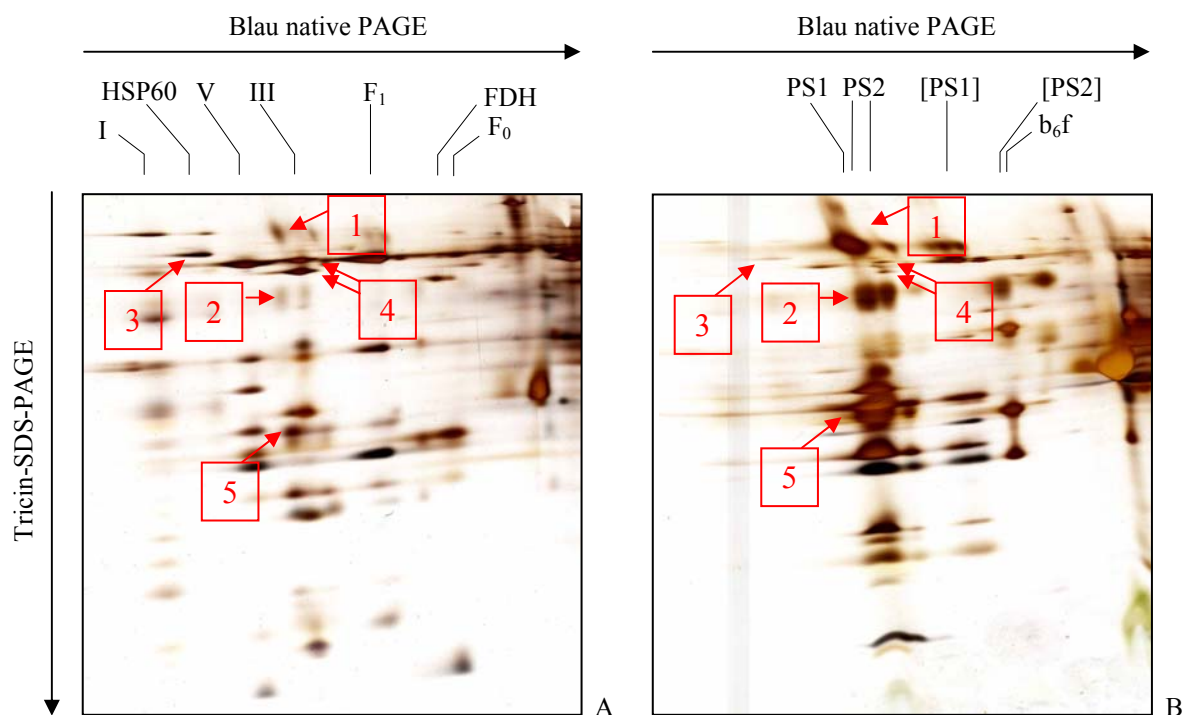


Abb. 6 Dokumentation der Reinheit organellarer Fraktionen aus grünem Gewebe (Blätter und Stengel) von Arabidopsis-Pflanzen. Die Mitochondrien wurden nach Krufft et al. (2001) mit Hilfe einer Percoll-Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Eine mitochondrienhaltige Fraktion wurde an der 29%/45%-Interphase den Percollgradienten entnommen und eine thylakoidhaltige Fraktion an der 18%/29%-Interphase. Die Proteinkomplexe beider Fraktionen wurden mittels zweidimensionaler BN/SDS-PAGE aufgetrennt und silber-gefärbt. A: Mitochondrien; B: Thylakoide. Oberhalb der Gele sind die Bezeichnungen der Proteinkomplexe angegeben (s. Abb. 5). Die Zahlen auf den Gelen kennzeichnen folgende Proteine: 1, die PsaA/B Proteine des Photosystems I (ca. 80 kDa); 2, die CP47/43 Proteine des Photosystems II (ca. 45 kDa); 3, mitochondriales HSP60 (ca. 60 kDa); 4, die MPP-Untereinheiten der Cytochrom c-Reduktase (ca. 55 kDa); 5, das Lichtsammel-Chlorophyll-Protein des Photosystems I (ca. 22 kDa). Die Identifikationen stammen ursprünglich aus Jansch et al. (1996) [mitochondriale Proteine] und aus Kügler et al. (1997) [chloroplastidäre Proteine].

Demnach enthält die mitochondriale Fraktion zu über 90% mitochondriale Proteine, allerdings sind auch Proteine der häufigsten chloroplastidären Photosysteme I und II (1, 2 und 5 in Abb. 6) schwach zu erkennen. Ebenso enthält die chloroplastidäre Fraktion fast ausschließlich chloroplastidäre Proteine; allerdings sind auch hier Verunreinigungen mit löslichen (HSP60, 1 in Abb. 6) und membrangebundenen (die MPP-Untereinheiten der Cytochrom c-Reduktase, 4 in Abb. 6) mitochondrialen Proteinen vorhanden.

Abbildung 7 zeigt eine 2D BN/ SDS-PAGE-Auswertung für Mitochondrienfraktionen aus Erbsen (A) und Tabak (B), die nach den Protokollen von Day et al. (1985) bzw. Chaumont et al. (1994) hergestellt wurden.

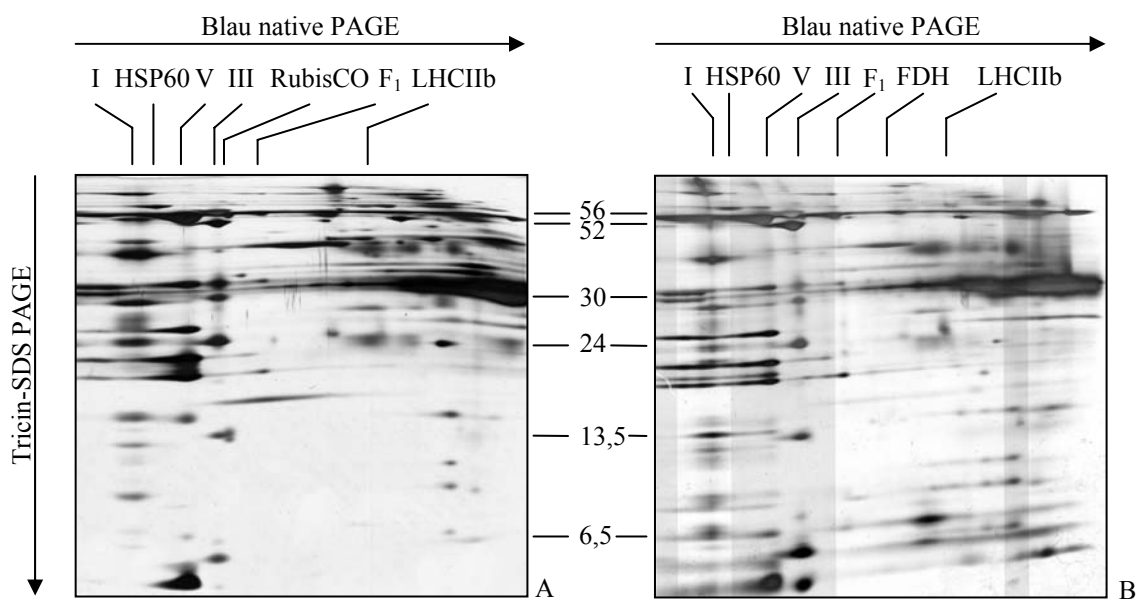


Abb. 7 Dokumentation der Reinheit von Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von Erbse (A) und Tabak (B) isoliert wurden. Die Bezeichnungen über den Gelen identifizieren die Proteinkomplexe (s. Abb. 5). Die Zahlen zwischen den Gelen stehen für die molekularen Massen von Standard Proteinen (in kDa).

In Abbildung 7A sind die Mitochondrien anhand der Atmungsketten-Komplexe leicht zu identifizieren. Die Anwesenheit von HSP60 belegt, daß die aufgetrennten Mitochondrien intakt sind. Die häufigsten Proteinkomplexe der Chloroplasten, RubisCO und LHCIib (Light harvesting complex Iib), sind jedoch schwach zu erkennen. Die Komplexe der Elektronentransportkette (Photosystem I & II, b_6f -Komplex) sind dagegen nicht sichtbar. Dennoch ist die Verunreinigung der isolierten Erbsen-Mitochondrien mit Plastiden als gering (2-5 %) anzusehen, was in Einklang mit den biochemischen und physikalische Messungen zur Reinheit der Mitochondrienfraktionen steht.

Die in Abbildung 7B aufgetrennten Tabak-Mitochondrien sind ähnlich sauber wie die Erbsen-Mitochondrien. Außer einem sehr schwachen LHCIib-Spot sind keine plastidären

Proteinkomplexe zu entdecken. Auch hier belegt die Anwesenheit von HSP60 die Intaktheit der Mitochondrien. Das letztere Ergebnis steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der physiologischen Analysen.

Abbildung 8 ist eine Dokumentation der Reinheit der Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von Arabidopsis isoliert wurden. In Teil A sind die Mitochondrien nach dem Protokoll von Day et al. (1985) und in Teil B nach dem selbst entwickelten Protokoll aufgereinigt worden. Beide Methoden ermöglichen die Aufreinigung von fast völlig reinen Mitochondrien. Die Komplexe der Atmungskette sind alle deutlich erkennbar. Die Anwesenheit von HSP60 belegt zudem, daß die Mitochondrien intakt sind. In den nach der eigenen Methode aufgetrennten Mitochondrien ist aber deutlich mehr HSP60 zu erkennen als in den nach Day et al. aufgereinigten. An plastidären Proteinkomplexen sind nur RubisCO und LHCIIb schwach zu erkennen, während die Komplexe der beiden Photosytem und der b₆f-Komplex komplett fehlen. Maximal 5 % der Proteine auf den Gelen sind plastidären Ursprungs. Bei den physiologischen Analysen der Mitochondrien ergab sich ein Widerspruch bezüglich der Intaktheit der nach der selbst entwickelten Methode isolierten Mitochondrien. Die gelelektrophoretische Analyse bestätigt – wie erwartet - die Ergebnisse des Fumarase-Tests. Die Chlorophyllmessung bei den nach der eigenen Methode aufgetrennten Mitochondrien ergab, daß die Mitochondrien Chloroplasten-frei seien, was nicht bestätigt werden konnte.

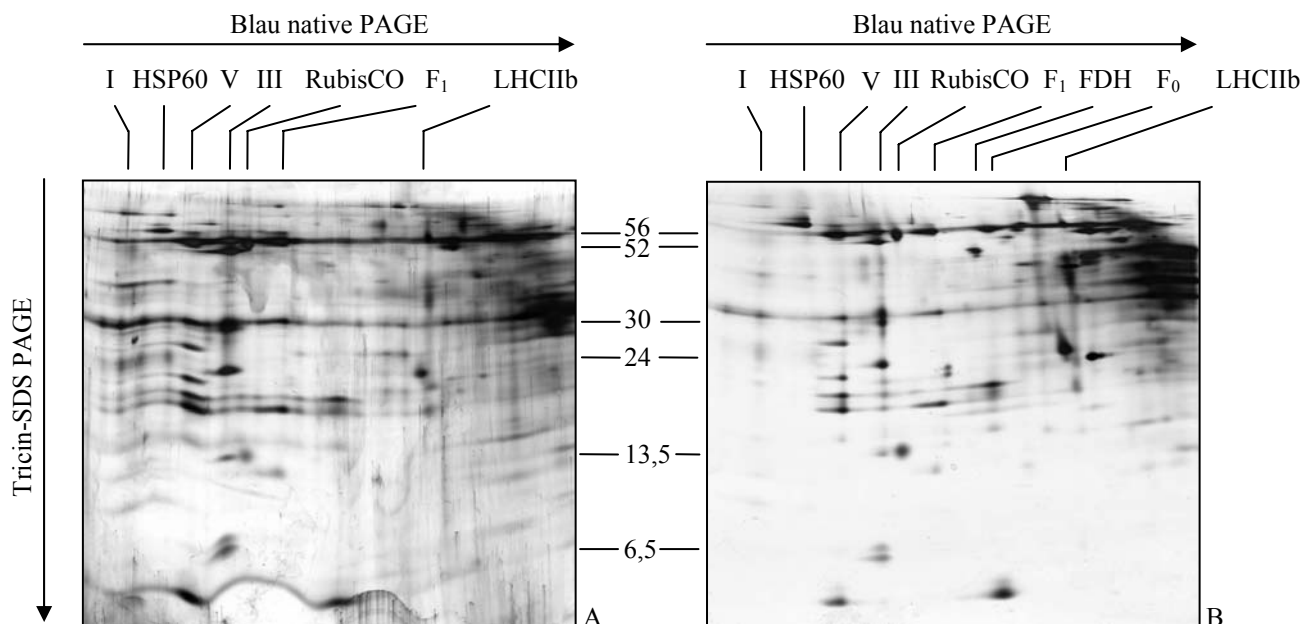


Abb. 8 Dokumentation der Reinheit von Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von Arabidopsis isoliert wurden. Die Mitochondrien wurden nach Day et al. 1985 (A) und Kruft et al. 2001 (B) präpariert. Die Bezeichnungen über den Gelen identifizieren die Proteinkomplexe (s. Abb. 5). Die Zahlen zwischen den Gelen stehen für die molekularen Massen von Standart Proteinen (in kDa).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß sowohl biochemisch-physiologische Messungen als auch gelelektrophoretische Verfahren geeignet sind, die Reinheit von mitochondrialen Fraktionen zu beurteilen. Allerdings ermöglicht die 2D BN/ SDS-PAGE ein umfassenderes und damit zuverlässigeres Bild vom Zustand der Mitochondrien. Es werden nicht nur einzelne Markerproteine, sondern das gesamte Proteinkomplex-Proteom der untersuchten Organellen analysiert, so daß die Fehlerquellen viel geringer sind. Sowohl membrangebundene als auch lösliche Proteine können in die Beurteilung des Zustandes der Mitochondrien einbezogen werden. Außerdem kann auf einem einzigen Gel sowohl die Anwesenheit als auch der Zustand aller Organellen, deren Proteinkomplex-Muster bekannt ist, untersucht werden. Der Nachteil dieser Analysemethode liegt in dem hohen Zeitaufwand, auch können Peroxisomen möglicherweise nicht nachgewiesen werden.

Die Isolierung von sauberen, pflanzlichen Mitochondrien aus grünem Gewebe ist sehr schwierig. Es ist nicht gelungen, absolut reine Mitochondrien darzustellen. Damit stellen die Mitochondrienfraktionen aus grünen Zellen kein ideales Ausgangsmaterial dar, um nachfolgend Proteomanalysen durchzuführen. In der vorliegenden Dissertation wurde daher teilweise auf Mitochondrienisolate aus nicht-grünen *Arabidopsis*-Suspensionszellkulturen zurückgegriffen, die sich als ideales Ausgangsmaterial erwiesen, um hochgradig saubere Mitochondrien zu generieren (s. 3.3.2 und Abb. 9).

4.2 Analyse des mitochondrialen Proteoms von *Arabidopsis thaliana*

Um die vielfältigen Funktionen, die Mitochondrien in Pflanzen innehaben, zu verstehen und auch um bisher unbekannt Funktionen der Mitochondrien zu entdecken, ist es notwendig, mitochondriale Proteine umfassend zu charakterisieren. Dazu wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine Proteom-Strategie verfolgt.

Die wichtigste Voraussetzung für Proteomanalysen ist, daß das Ausgangsmaterial absolut frei von Proteinen anderer Organellen oder des Cytoplasmas ist. Wie im vorherigen Kapitel gezeigt, ist es nicht möglich, absolut saubere Mitochondrien aus grünem pflanzlichen Gewebe zu isolieren. Deshalb dienen nicht-grüne *Arabidopsis*-Suspensions-Zellkulturen als Ausgangsmaterial. Abbildung 9 zeigt eine Auftrennung der Proteinkomplexe von *Arabidopsis*-Mitochondrien aus nicht-grünen Zellkulturen mittels zweidimensionaler BN/ SDS-PAGE.

Die aufgetrennten Proteinkomplexe konnten alle den Mitochondrien zugeordnet werden (s. Schema in Abb. 9). Keines der häufigsten Chloroplasten-Proteine (s. Abb. 5 & 6) ist erkennbar, was zeigt, daß die Mitochondrien nicht mit fremden Proteinkomplexen verunreinigt sind. Als Markerprotein für die mitochondriale Matrix dient neben Hsp60 auch die Format-Dehydrogenase. Die starken Spots beider Proteine belegen, daß die Mitochondrien intakt sind.

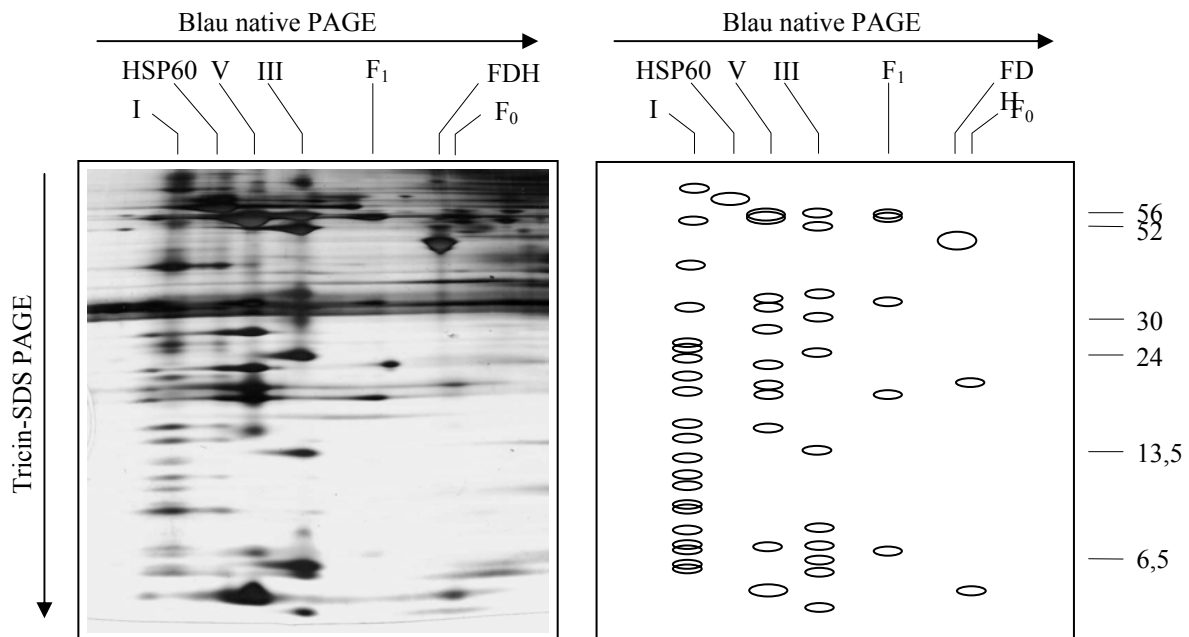


Abb. 9 Auftrennung der mitochondrialen Protein-Komplexe von *Arabidopsis thaliana* aus nicht-grüner Suspensions-Zellkultur mittels zweidimensionaler BN/SDS-PAGE. Das Gel wurde silber-gefärbt. Rechts ist das Gel schematisch dargestellt. Für die Bezeichnung der Protein-Komplexe siehe Abb. 5. Ganz rechts sind die molekularen Massen von bekannten Proteinen in Kilodalton angegeben. Abb. nach Kruft et al. (2001).

Die zweidimensionale BN/ SDS-PAGE ist als Instrument zur Überprüfung der Reinheit von Mitochondrien gut geeignet, aber für Proteomanalysen ist die zweidimensionale IEF/ SDS-PAGE die Methode der Wahl (Kruft et al., 2001). Mittels 2D IEF/ SDS-PAGE werden nicht nur Proteinkomplexe und ihre Untereinheiten, sondern alle Proteine aufgetrennt. Bei der BN/ SDS-PAGE werden die Untereinheiten der Proteinkomplexe nur linear nach ihrer Größe aufgetrennt, so daß sich Protein-Isoformen und manchmal sogar nur Proteine ähnlicher Größe überlagern können. Bei der IEF/ SDS-PAGE werden die Proteine erst nach ihrem isoelektrischen Punkt und dann nach ihrer Größe aufgetrennt. Dadurch können auch Proteine, die eine sehr ähnliche Größe haben und in der BN/ SDS-PAGE fast nicht zu trennen sind, als unterschiedliche Proteine identifiziert werden (z.B. die vier Formen von TOM20, s. 4.5.3). Die aufgetrennten Proteine können auf unterschiedliche Weise identifiziert werden:

(i) die Proteine werden aus dem 2D-Gel auf eine Membran übertragen (geblottet) und dann ausgeschnitten und sequenziert (Edmann-Abbau), (ii) geblottete Proteine können mittels spezifischer Antikörper identifiziert werden oder (iii) Proteinspots werden aus dem Gel ausgestochen, mit Trypsin verdaut und massenspektrometrisch anhand der Größe der Fragmente identifiziert (MALDI/ TOF-MS). Die letzte Methode kann nur bei Organismen, deren komplettes Genom bekannt ist, alle Proteine identifizieren, was Arabidopsis als erste komplett sequenzierte Pflanze zum optimalen Versuchsobjekt macht.

Auf einem 2D IEF/ SDS-Gel mit Arabidopsis-Mitochondrien aus nicht-grünen Zellkulturen (s. Abb. 10) sind ca. 650 Proteinspots zu sehen, bei veränderten Lysis-Bedingungen, IEF-Gradienten oder Färbe-Methoden sogar bis zu 800 (Kruft et al., 2001). Zudem gibt es vermutlich noch einmal so viele Proteine, die nicht dargestellt werden können, weil sie (i) zu hydrophob sind, um in der IEF aufgetrennt zu werden, (ii) zu basisch um auf den erhältlichen immobilisierten pH-Gradientengelen aufgetrennt zu werden, (iii) in zu geringer Menge in Mitochondrien vorkommen, um mittels der verwendeten Färbemethoden sichtbar gemacht zu werden (z.B. Transkriptionfaktoren), (iv) die gleiche Masse und den gleichen isoelektrischen Punkt haben wie ein anderes Protein und so von diesem nicht zu trennen sind oder (v) in nicht-grünen Zellen aus Zellkulturen nicht exprimiert werden, weil sie gewebespezifische oder von der Photosynthese abhängige Funktionen haben.

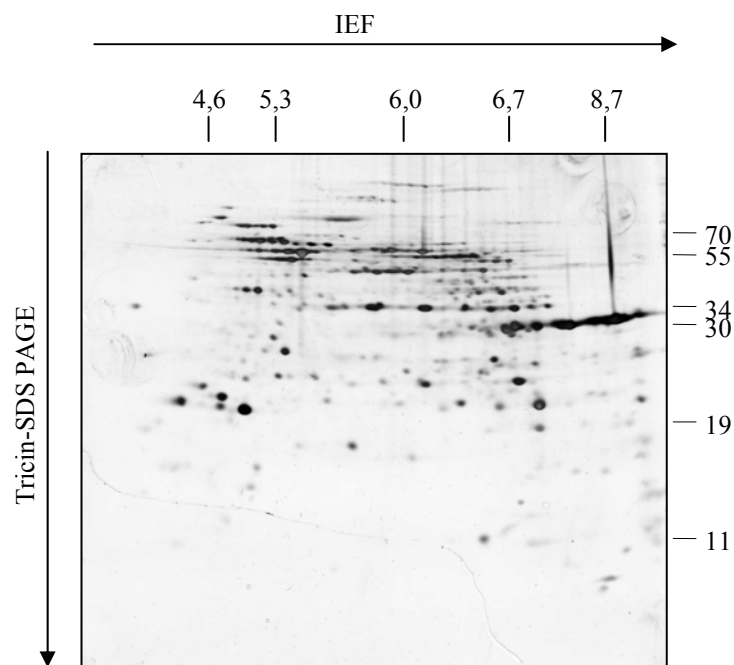


Abb. 10 Zweidimensionale Auftrennung mitochondrialer Proteine von Arabidopsis-Mitochondrien aus nicht-grünen Suspensions-Zellkulturen. Die Proteine wurden in der ersten Dimension auf einem nicht-linearen immobilisierten pH-Gradienten von pH 3 - 10 (IPG-Drystrip von Amersham-Pharmacia) aufgetrennt. Die Zahlen oberhalb des Geles geben die pH-Werte an. In der zweiten Dimension wurden die Proteine in einem Tricin-SDS-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Die Zahlen rechts stehen für die molekularen Massen von Standard Proteinen. Das Gel wurde silber-gefärbt.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß die Analyse des mitochondrialen Proteoms durch das Auftrennen der Proteine in zweidimensionalen IEF/ SDS-Gelen möglich ist, aber ein umfangreiches Unterfangen darstellt. Ein Problem ist dabei, daß in einzelnen Gelregionen die Spotdichte hoch ist, so daß sich verschiedene Proteine überlagern. Außerdem sind niemals alle Proteine sichtbar, da die Expression unterschiedlicher Eiweiße sehr stark variieren kann. Einen fruchtbaren Ansatz, die angegebenen Probleme zu lösen, stellt die Unterteilung des mitochondrialen Proteoms in definierte Subproteome dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden systematisch mitochondriale Subproteome aus Pflanzen analysiert. So erfolgte eine eingehende Charakterisierung von Proteinen, die in der äußeren Mitochondrienmembran vorkommen (s. 4.3), sowie Analysen von einzelnen Proteinkomplexen der beiden mitochondrialen Membranen (s. 4.4 und 4.5).

4.3 Analyse des Proteoms der äußeren Mitochondrienmembran von *Arabidopsis thaliana*

Das erste untersuchte Subproteom ist das der äußeren mitochondrialen Membranen. Als Ausgangsmaterial für die Untersuchungen diente wieder eine nicht-grüne *Arabidopsis*-Zellkultur. Frisch isolierte Mitochondrien (s. 3.3.2) wurden in einem hypotonischen Medium inkubiert, so daß die Mitochondrien anschwellen, bis ihre äußere Membran straff gespannt war, bevor in einem Homogenisator Druck auf die Mitochondrien ausgeübt wurde. Dadurch wurden die äußeren Membranen, die sich nicht weiter dehnen konnten, abgesprengt, während die inneren Membranen, die aufgrund ihrer wesentlich größeren Oberfläche dehnbarer sind, unversehrt blieben. Anschließend wurden die äußeren Membranen durch eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation von den Mitoplasten (d.i. Mitochondrien ohne äußere Membran) getrennt und durch eine zweite diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation zusätzlich von löslichen Proteinen befreit (s. 3.6).

Die auf diese Weise präparierten äußeren Mitochondrienmembranen sind sehr sauber, wie eine Auftrennung der Proteinkomplexe der äußeren Membran in einem zweidimensionalen BN/ SDS-Gel belegt (s. Abb. 11). Es können nur geringe Spuren von Proteinen anderer mitochondrialer Kompartimente gefunden werden (s. Abb. 11 B) und gar keine Proteine nicht mitochondrialer Herkunft. Wie in Abb. 11 B zu erkennen ist, gibt es in den äußeren Membranen einen dominanten Proteinkomplex bei ca. 385 kDa, der als die

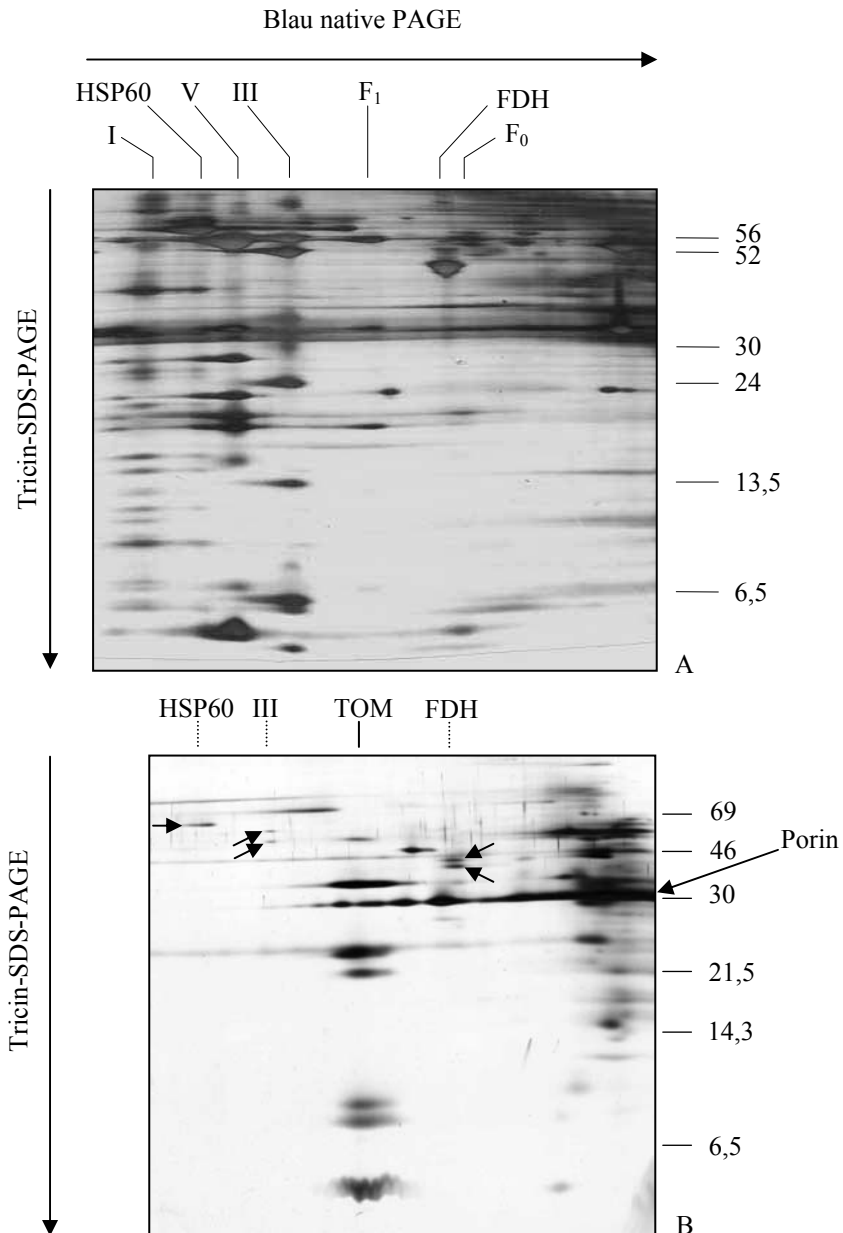


Abb. 11 Vergleich der Proteinkomplexe des mitochondrialen Gesamtproteoms (A) mit den Proteinkomplexen der äußeren Mitochondrienmembran (B) nach zweidimensionaler Auftrennung mittels BN/ SDS-PAGE und Silberfärbung. Oberhalb der Gele sind die Proteinkomplexe gekennzeichnet (s. Abb. 5). Die Zahlen rechts zeigen die molekulare Masse von Standardproteinen (A) bzw. von Markerproteinen (B: Rainbow-Marker RPN755 und RPN756, Amersham, GB) an. Der Komplex III im unteren Gel stellt eine Verunreinigung mit inneren Membranen, HSP60 und FDH Verunreinigungen mit mitochondrialer Matrix dar. Die Proteinuntereinheiten der genannten Komplexe sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM-Komplex) identifiziert wurde (Daten in Kapitel 4.5). Ferner konnte das porenbildende 30 kDa-Protein „Porin“ identifiziert werden (mittels Antikörpern, Daten nicht gezeigt), das in den nativen Geldimensionen zwischen 30 und 400 kDa läuft. Ob es sich bei den höhermolekularen Porinkomplexen um Strukturen handelt, die tatsächlich *in vivo* vorkommen, oder ob sie sich

erst während der Solubilisierung der Membranproteine durch Aggregation ausbilden, ist unklar. Die Proteine der äußeren Membran sind so schwach exprimiert, daß sie auf einem zweidimensionalen BN/ SDS-Gel, auf dem die gesamten Proteinkomplexe der Mitochondrien aufgetrennt wurden (s. Abb. 11 A), nicht zu erkennen sind. HSP60 und die Cytochrome c-Reduktase (Komplex III), die wesentlich stärker exprimiert sind als die Proteinkomplexe der äußeren Membran, bilden auf dem Gel 11 A nur äußerst schwache Banden aus, was zeigt, wie gut die äußeren Membranen vom Rest der Mitochondrien getrennt wurden.

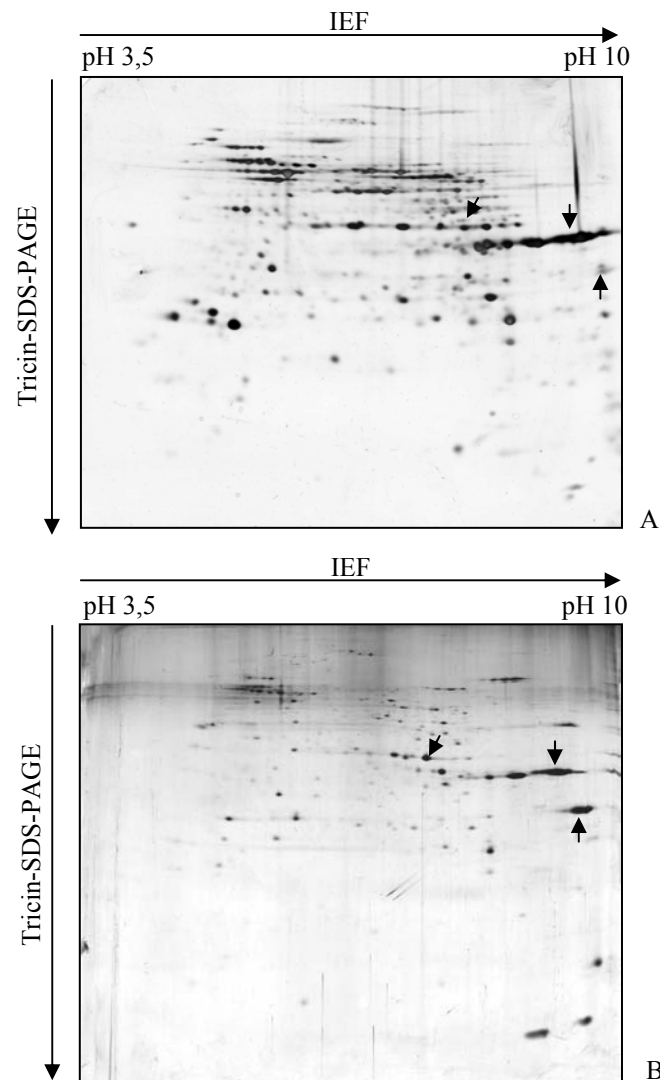


Abb. 12 Vergleich des Proteoms von Arabidopsis Mitochondrien (A) und äußeren Mitochondrienmembranen (B) aus nicht-grünen Zellkulturen nach Auftrennung mittels zweidimensionaler IEF/ SDS-PAGE. Für die IEF wurde ein nicht-linearer pH-Gradient von 3 bis 10 verwendet. Die pH-Werte sind oben an den Gelen angegeben. Die Gele wurden silbergefärbt. Die Pfeile kennzeichnen Proteine der äußeren Mitochondrienmembran, die in Teil A auch sichtbar sind.

Auch eine zweidimensionale Auftrennung aller Proteine der äußeren Mitochondrienmembran mittels IEF/ SDS-PAGE zeigt, daß die äußere Mitochondrienmembran nur ca. 20 bis 30 Proteine enthält (s. Abb. 12 B). Die Proteine der isolierten Membranen sind, wie ein Vergleich mit dem Gesamtproteom der Mitochondrien zeigt (s. Abb. 12 A), sehr schwach exprimiert. Nur Porin und TOM40, die beiden häufigsten Proteine der äußeren Membran, sind in der IEF/ SDS-PAGE des Gesamtproteoms zu erkennen (Kruft et al., 2001). Daß andererseits die am stärksten exprimierten Proteine des Gesamtproteoms in der 2D IEF/ SDS-PAGE der äußeren Membranen nur schwach erkennbar sind, beweist die große Reinheit der analysierten Membranfraktionen.

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß für die Charakterisierung des mitochondrialen Proteoms gelelektrophoretische Auftrennungen der Gesamtproteoms als einzige Methode nicht ausreichen. Wie schon im vorigen Kapitel beschrieben, sind wahrscheinlich die Hälfte aller Proteine nicht nachweisbar. Die Unterteilung des Gesamtproteoms in Subproteome ermöglicht den Nachweis und die Analyse von niedrig exprimierten Proteinen und Proteinkomplexen. So sind z. B. die Proteine des TOM-Komplexes, der der dominierende Proteinkomplex der äußeren Mitochondrienmembran ist, in zweidimensionalen BN/ SDS-Gelen und IEF/ SDS-Gelen des mitochondrialen Gesamtproteoms nicht zu erkennen. Werden dagegen nur die Proteine bzw. Proteinkomplexe der äußeren Mitochondrienmembran aufgetrennt, ist der TOM-Komplex leicht identifizierbar und kann weitergehend analysiert werden.

Außerdem läßt sich feststellen, daß es möglich ist, äußere Mitochondrienmembranen zu isolieren, die nur sehr wenig mit Proteinen der anderen mitochondrialen Kompartimente verunreinigt sind. Proteine, die wesentlich stärker exprimiert werden als alle Proteine der äußeren Membran, z. B. HSP60 oder die MPP-Untereinheiten der Cytochrom c-Reduktase, bilden auf zweidimensionalen Polyacrylamid-Gelen, in denen die Proteine oder Proteinkomplexe der äußeren Mitochondrienmembran aufgetrennt wurden, nur sehr schwache Spots.

4.4 Analyse einzelner Proteinkomplexe mittels dreidimensionaler Gelelektrophorese

Nach der Analyse des Proteoms der äußeren Mitochondrienmembran von *Arabidopsis thaliana* (s. 4.3) gilt die nächste Untersuchung logischerweise den Proteinen der inneren Mitochondrienmembran. Diese aber enthält sehr viele Proteine und Proteinkomplexe, so daß eine Auftrennung des Gesamtproteoms der inneren Membran schwierig ist (s. 4.2). Außerdem sind viele der Proteine der inneren Membran stark hydrophob und können deshalb in der IEF schlecht aufgetrennt werden. Deshalb wurde das mitochondriale Proteom weiter fraktioniert. Für die vorliegende Dissertation wurde eine neue Methode entwickelt, die die Analyse von Sub-Sub-Proteomen auf der Basis von einzelnen Proteinkomplexen ermöglicht. Diese Methode basiert auf einer Kombination von drei verschiedenen Elektrophoresetechniken (BN-PAGE, IEF und SDS-PAGE) und ermöglicht die Darstellung von kleinen, gut definierten Gruppen mitochondrialer Proteinen, die auf einem Gel gut aufgetrennt werden können und sogar hydrophobe Proteine einschließen.

Ausgangsmaterial waren Mitochondrien, die aus einer nicht-grünen *Arabidopsis*-Zellkultur isoliert worden waren (s. 3.3.2). Die Mitochondrien wurden mit n-Dodecyl-Maltosid solubilisiert und mit dem Farbstoff Coomassie blue vermischt. Coomassie blue bindet an die Proteinkomplexe und Proteine ohne sie zu denaturieren. Die Proteinkomplexe wurden dann in einer BN-PAGE ihrer Größe nach aufgetrennt und ein einzelner Proteinkomplex ausgeschnitten. Der Proteinkomplex wurde aus dem Gel eluiert und gefällt, wobei das gesamte Coomassie blue, das in der IEF die Auftrennung stören würde, entfernt wurde. Anschließend wurde der Proteinkomplex denaturiert und mittels einer zweidimensionalen IEF/ SDS-PAGE in seine Proteinuntereinheiten aufgetrennt (s. 3.12 und Abb. 13). So sind auf einem Gel alle Untereinheiten eines Proteinkomplexes samt aller ihrer Isoformen und Modifikationen zu erkennen.

Mittels der beschriebenen Methode wurden für diese Dissertation mehrere Proteinkomplexe der inneren Mitochondrienmembran aufgetrennt (s. Abb. 14): (i) die F_1F_0 -ATP-Synthase, (ii) die F_1 -Untereinheit der ATP-Synthase und (iii) die Cytochrom c-Reduktase. Die F_1F_0 -ATP-Synthase von *Arabidopsis* bildet in BN-Gelen eine Bande bei 580 kDa. Der Proteinkomplex wurde wie oben beschrieben ausgeschnitten, elektroeluiert, gefällt und mittels zweidimensionaler IEF/ SDS-PAGE analysiert. Etwa 20 starke Proteinspots sind auf dem zweidimensionalen Gel (s. Abb. 14 A) zu erkennen. Neun der Proteine wurden in Laufe eines

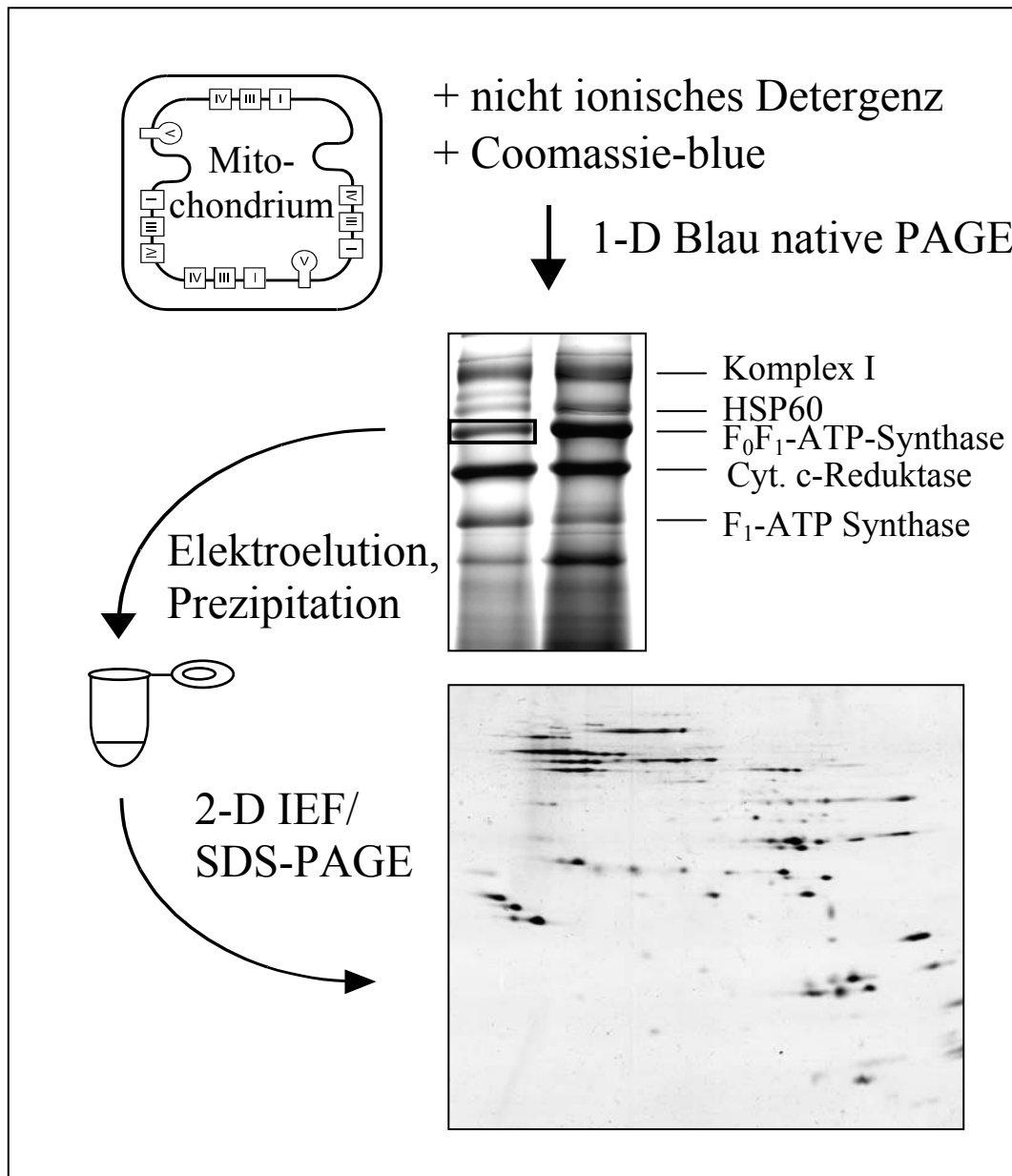


Abb. 13 Schematische Darstellung der 3D-PAGE. Oben links ist ein Mitochondrium schematisch dargestellt, in der inneren Mitochondrienmembran sind die Proteinkomplexe der Atmungskette eingezeichnet. Die Mitochondrien werden solubilisiert, mit dem Farbstoff Coomassie blue versetzt und in einer BN-PAGE aufgetrennt. In der Mitte ist ein BN-Gel der mitochondrialen Proteinkomplexe von Arabidopsis aus einer nicht-grünen Zellkultur zu sehen. Die ATP-Synthase entspricht Komplex V, die Cytochrom c-Reduktase Komplex III. Die ATP-Synthase-Bande wird aus dem Gel ausgeschnitten. Der Proteinkomplex wird elektroeluiert, gefällt (dabei von dem Farbstoff und Ladungsträger Coomassie blue befreit) und in einer zweidimensionalen IEF/ SDS-PAGE aufgetrennt (unten rechts).

Proteomprojektes zur Identifizierung mitochondrialer Proteine in Arabidopsis als Untereinheiten der F_1F_0 -ATP-Synthase identifiziert (s. Abb. 14 D, Tabelle 3 und Krufft et al., 2001). Die Proteine sind an ihren natürlichen isoelektrischen Punkten fokussiert, was beweist, daß das Coomassie blue, das den isoelektrischen Punkt der Proteine verändern würde, komplett entfernt wurde. Wie Datenanalysen des Kerngenoms von Arabidopsis (The

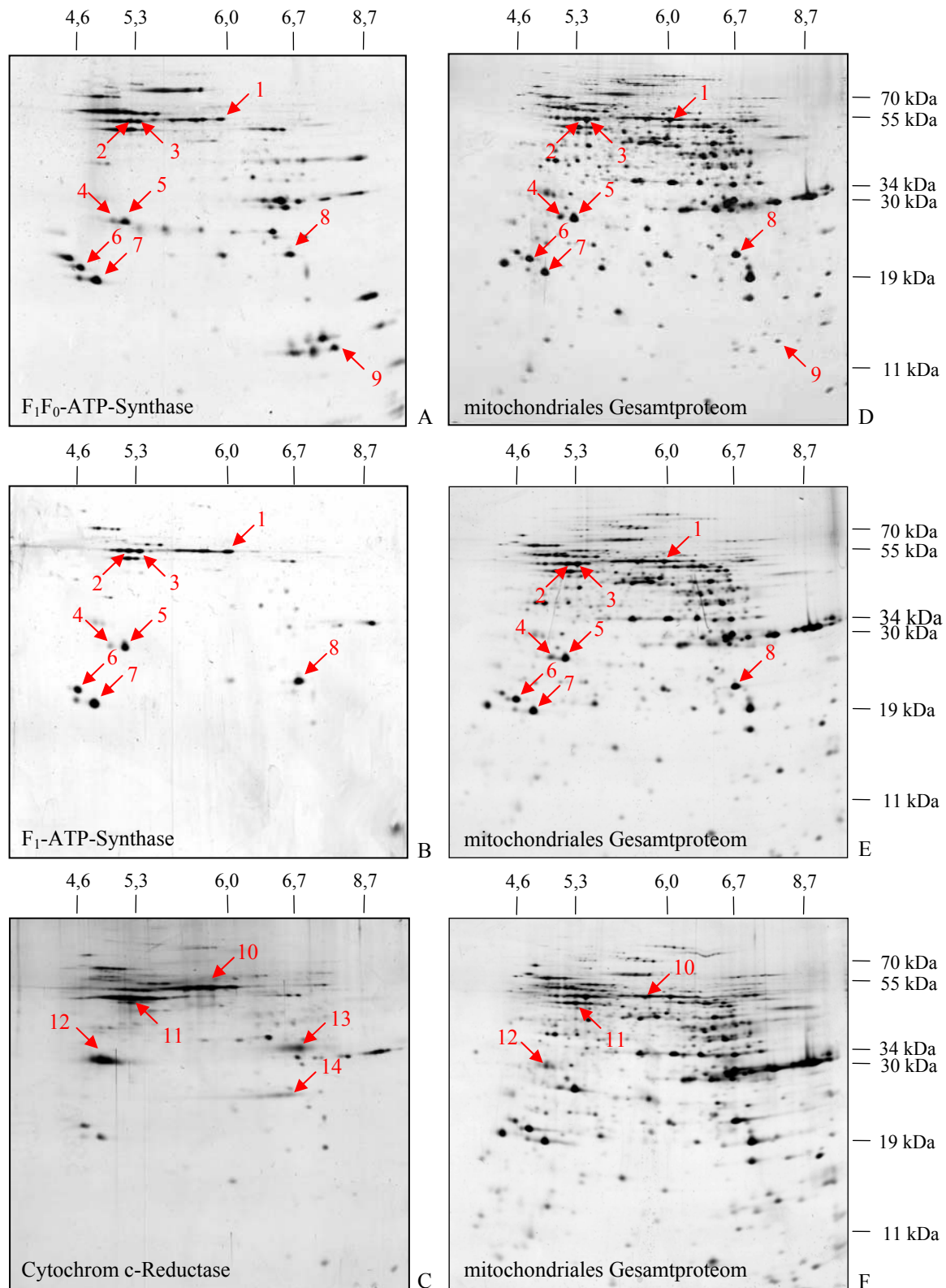


Abb. 14 Charakterisierung mitochondrialer Proteinkomplexe von Arabidopsis mittels dreidimensionaler Gelelektrophorese. Proteinkomplexe wurden aus Blau nativen Gelen eluiert und mittels IEF/ SDS-PAGE weiter aufgetrennt. Auf der linken Seite sind die F₁F₀-ATP-Synthase (A), die F₁-Untereinheit der ATP-Synthase (B) und die Cytochrom c-Reduktase (C) zu sehen. Die drei Gele rechts (D -F) zeigen zweidimensionale IEF/ SDS-PAGEs des mitochondrialen Gesamtproteoms. Für die IEF wurden Gele mit nicht-lineare Gradienten von pH 3 – 10 benutzt. Alle Gele wurden silber-gefärbt. Die Zahlen oberhalb der Gele geben pH-Werte, die Zahlen rechts neben den Gelen Proteinmassen (in kDa) an. Identifizierte Proteine sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Die Nummern an den Pfeilen beziehen sich auf Tabelle 3.

Arabidopsis Genom Initiative, 2000) belegen, werden die meisten Untereinheiten der F₁F₀-ATP-Synthase von mehr als einem Gen kodiert. Das Auftreten von Isoformen kann hier für die β-Untereinheit (Proteine 2 und 3 in Abb. 14 A und 14 D) und die 24 kDa-Untereinheit (Proteine 4 und 5 in Abb. 14 A und 14 D) bestätigt werden. Die in Abb. 14 A nicht identifizierten Proteine stellen wahrscheinlich andere Untereinheiten der F₁F₀-ATP-Synthase oder weitere Isoformen der identifizierten Untereinheiten dar. So sagen z.B. Datenanalysen des Arabidopsis-Genoms eine dritte Isoform der β-Untereinheit voraus. Schwächere Spots in Abb. 14 A können aber auch Verunreinigungen mit Proteinen, die nicht Teil der F₁F₀-ATP-Synthase sind, darstellen, da trotz der hohen Auflösung die die BN-PAGE ermöglicht, eine Verunreinigung mit anderen Proteinen nicht ausgeschlossen werden kann.

Der F₁F₀-ATP-Synthase-Komplex zerfällt leicht in zwei Sub-Komplexe, die mit F₁ und F₀ bezeichnet werden und beide auf BN-Gelen aufgetrennt werden können. Hier wurde der F₁-Subkomplex eluiert und mittels IEF/ SDS-PAGE aufgetrennt (s. Abb. 14 B). Wie erwartet enthält der F₁-Subkomplex nur einen bestimmten Teil der Proteine der intakten F₁F₀-ATP-Synthase.

Tabelle 3: Proteine der inneren Mitochondrienmembran, die nach dreidimensionaler Gelelektrophorese identifiziert wurden

Spot Nr. ¹	Protein identifiziert als	Accession No. ²	Methode der Identifizierung ³	Referenz
1	α-Untereinheit der ATP-Synthase	CAA69802	ED	Kruft et al. 2001
2-3	β-Untereinheit der ATP-Synthase	At5g08670, At5g08690	ED	Kruft et al. 2001
4-5	24 kDa Untereinheit der ATP-Synthase	At2g21870	ED	Kruft et al. 2001
6	d-Untereinheit der ATP-Synthase	At3g52300	ED, ESI-MS/MS	Kruft et al. 2001
7	δ'-Untereinheit der ATP-Synthase	At5g47030	ED	Kruft et al. 2001
8	δ-Untereinheit der ATP-Synthase	At5g13450	ED	Kruft et al. 2001
9	Inhibitor Untereinheit der ATP-Synthase	At2g27730	ESI-MS/MS	Kruft et al. 2001
10	α-Untereinheit der Mitochondrialen Prozessierungs-Peptidase (MPP)	At1g51980, At3g16480	IgG	Kruft et al. 2001
11	β-Untereinheit der Mitochondrialen Prozessierungs-Peptidase (MPP)	At3g02090	IgG	Kruft et al. 2001
12	Cytochrom c ₁	At5g40810, At3g27240	IgG	neu identifiziert
13	Cytochrom b	Y08501	IgG	neu identifiziert
14	“Rieske” Eisen-Schwefel Untereinheit	At5g13440, At5g13430	IgG	neu identifiziert

1 Die Nummern beziehen sich auf die Spot-Nummern in Abb. 14.

2 Protein entry code bei MIPS (Munich information center of protein sequences): <http://www.mips.biochem.mpg.de/proj/thal/>

3 Methoden der Protein-Identifikation: ED, Edman-Abbau; ESI-MS/MS, Electrospray ionisation tandem mass spectrometry; IgG, Immunoblotting.

Der Cytochrom c-Reduktase-Komplex von Arabidopsis bildet in BN-Gelen eine Bande bei 480 kDa. Der Proteinkomplex wurde, wie oben beschrieben, eluiert, von Coomassie blue befreit und mittels IEF/ SDS-PAGE aufgetrennt (s. Abb. 14 C). Zwei der Untereinheiten dieses Proteinkomplexes wurden schon zuvor als die α -MPP- und die β -MPP-Untereinheit der Cytochrom c-Reduktase identifiziert (Proteine 10 und 11 in Abb. 14 C und 14 F und Tabelle 3; s. Kruff et al., 2001). Drei weitere Untereinheiten konnten, mittels Antikörper-Nachweis, neu identifiziert werden: (i) Cytochrom c_1 (Protein 12 in Abb. 14 C und 14 F), (ii) Cytochrom b (Protein 13 in Abb. 14 C) und (iii) das „Rieske“ Eisen-Schwefel-Protein (Protein 14 in Abb. 14 C). Sowohl Cytochrom b als auch das Eisen-Schwefel-Protein sind auf dem Vergleichs-Gel, in dem das mitochondriale Gesamt-Proteom aufgetrennt wurde, nicht wiederzufinden, obwohl beide Proteinproben vor der IEF mit identischer Lysis-Lösung behandelt wurden. Von beiden Proteinen ist bekannt, daß sie die innere Mitochondrienmembran durchspannen. Von Cytochrom b ist zudem bekannt, daß es extrem hydrophob ist und acht membrandurchspannende Helices enthält (Xia et al., 1997). Damit ist ein deutlicher Hinweis gegeben, daß durch eine vorhergehende Auftrennung von Proteinkomplexen mittels BN-PAGE die Auftrennung von hydrophoben Proteinen in der IEF verbessert wird.

Die pflanzliche Cytochrom c-Reduktase setzt sich aus zehn Untereinheiten zusammen (Hanson et al., 2001). Sechs der Untereinheiten werden von mehr als einem Gen kodiert (H.-P. Braun, persönliche Mitteilung). So werden z. B. Cytochrom c_1 und β -MPP in den Abb. 14 C und 14 F von mehr als einem Spot repräsentiert. Die fünf kleinsten Untereinheiten der Cytochrom c-Reduktase (6 – 14 kDa) sind in Abb. 14 C nicht erkennbar. Das kann darin bedingt sein, daß die N-terminale Leitsequenz dieser kernkodierten Proteine, die reich an basischen Aminosäuren ist und den Import der Proteine in die Mitochondrien ermöglicht, nicht nach dem Import abgeschnitten wird und das deshalb der isoelektrische Punkte aller dieser Proteine sehr basisch ist (Hanson et al., 2001). Einige schwächere Proteinspots in Abb. 14 C können zudem Verunreinigungen mit Proteinen, die nicht Teil der Cytochrom c-Reduktase sind, darstellen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Kombination von drei verschiedenen Elektrophorese-Methoden – BN-PAGE, IEF und SDS-PAGE – eine geeignete Methode ist, um kleine, definierte Subproteome von Mitochondrien herzustellen und zu analysieren. Die dreidimensionale PAGE kann bei der Analyse des mitochondrialen Proteoms von Arabidopsis aus mehreren Gründen von Nutzen sein: (i) Die Auftrennung des mitochondrialen Gesamtproteoms auf einem zweidimensionalen Gel ermöglicht es nicht, alle Proteine zu

erkennen (Kruft et al., 2001), so daß die Möglichkeit der verlässlichen Herstellung von definierten Subproteomen, die Analysen aller aufgetrennten Proteine erlauben, wichtig ist. (ii) Die dreidimensionale PAGE ermöglicht die Untersuchung aller Proteine, die Teil eines bestimmten Proteinkomplexes sind, einschließlich aller Isoformen oder Modifikationen einzelner Untereinheiten. In allen höheren Eukaryonten werden die meisten Proteine von mehr als einem Gen kodiert und posttranslationelle Modifikationen sind häufig. (iii) Der Vergleich von Proteinspot-Mustern einzelner Proteinkomplexe mit dem Proteinspot-Muster des mitochondrialen Gesamtproteoms – ein solcher Vergleich ist in Abb. 14 dargestellt – ermöglicht die Identifikation ganzer Gruppen von Proteinen. Deshalb kann die dreidimensionale PAGE eine nützliche Methode bei der Analyse organellarer Proteome sein.

4.5 Charakterisierung der Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran

Nach den Analysen von Teilproteomen folgt die detaillierte Analyse eines einzelnen Proteinkomplexes. Der analysierte Proteinkomplex ist die Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran (engl.: Preprotein Translocase of the Outer mitochondrial Membrane => TOM).

Der TOM-Komplex hat eine Masse von etwa 388 kDa. Diese Masse wurde durch Vergleich des Laufverhaltens des TOM-Komplexes in nativen Gelen mit dem Laufverhalten anderer Proteinkomplexe mit bekannten Massen bestimmt. Da in der äußeren Mitochondrienmembran kein anderer Proteinkomplex aufgetrennt werden kann, wurde für den Vergleich eine Fraktion von äußeren Mitochondrienmembranen verwendet, die stark mit inneren Mitochondrienmembranen verunreinigt war (s. Abb. 15 B). In Abb. 15 B ist zu erkennen, daß zwischen den Untereinheiten des TOM-Komplexes (markiert mit roten Pfeilen) noch weitere Proteine laufen (markiert mit blauen Pfeilen). Diese Proteine können, durch Vergleich mit dem weiter links (höhere Masse) auf dem gleichen Gel laufenden Komplex V – der ATP-Synthase – als Untereinheiten des F₁-Subkomplexes der ATP-Synthase identifiziert werden. Alle erkennbaren Proteine, die zum F₁-Subkomplex gehören, sind auch hier mit blauen Pfeilen markiert. Die Masse des F₁-Subkomplexes beträgt bei Arabidopsis etwa 388 kDa (3 x α -Untereinheit [55,0 kDa], 3 x β -Untereinheit [54,2 kDa], 1 x γ -Untereinheit [ca. 30 kDa], 1 x δ -Untereinheit [22,3 kDa], 1 x ATPase-Inhibitor [ca. 8 kDa]). Diese Masse kann also auch für den TOM-Komplex angenommen werden. Daß der F₁-Subkomplex in Abb. 15 B

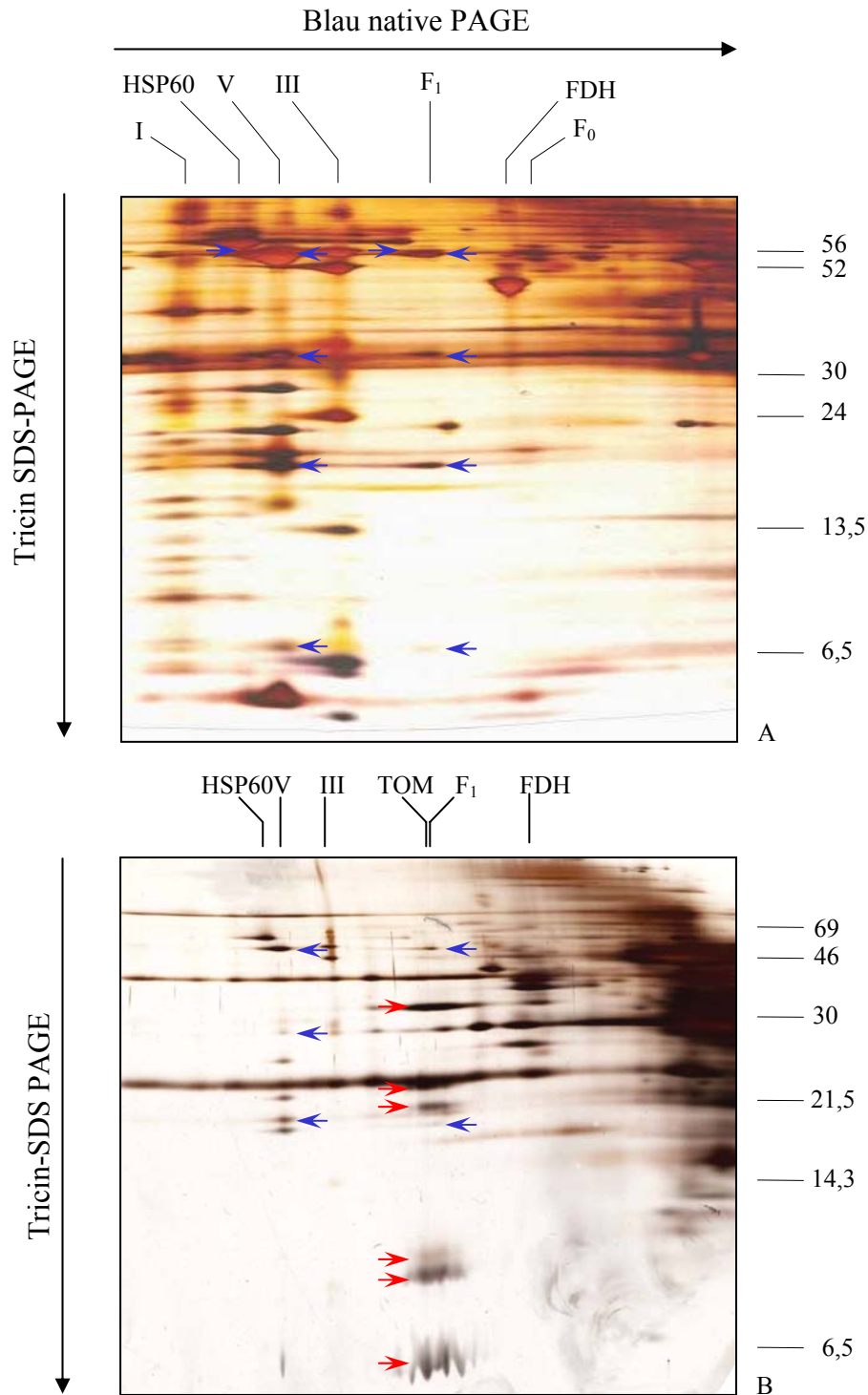


Abb. 15 Bestimmung der Größe der TOM-Komplexes. Zweidimensionale BN/SDS-PAGEs von (A) Arabidopsis-Mitochondrien und (B) äußeren Mitochondrienmembranen von Arabidopsis, die mit Proteinen der inneren Membran und der mitochondrialen Matrix verunreinigt sind. Die Gele wurden silber-gefärbt. Die Zahlen rechts geben die molekulare Masse von Markerproteinen in kDa wieder. Die Proteinuntereinheiten des TOM-Komplexes sind mit roten Pfeilen gekennzeichnet, die Proteinuntereinheiten des F₁-Subkomplexes der ATP-Synthase mit blauen Pfeilen.

intakt ist und damit die angegebene Masse hat, belegt ein Vergleich mit dem F₁-Subkomplex aus mittels zweidimensionaler BN/ SDS-PAGE aufgetrennten Arabidopsis-Mitochondrien (Abb. 15 A), wo alle Untereinheiten des F₁-Subkomplexes identifiziert werden können (in Abb. 15 A markiert mit blauen Pfeilen).

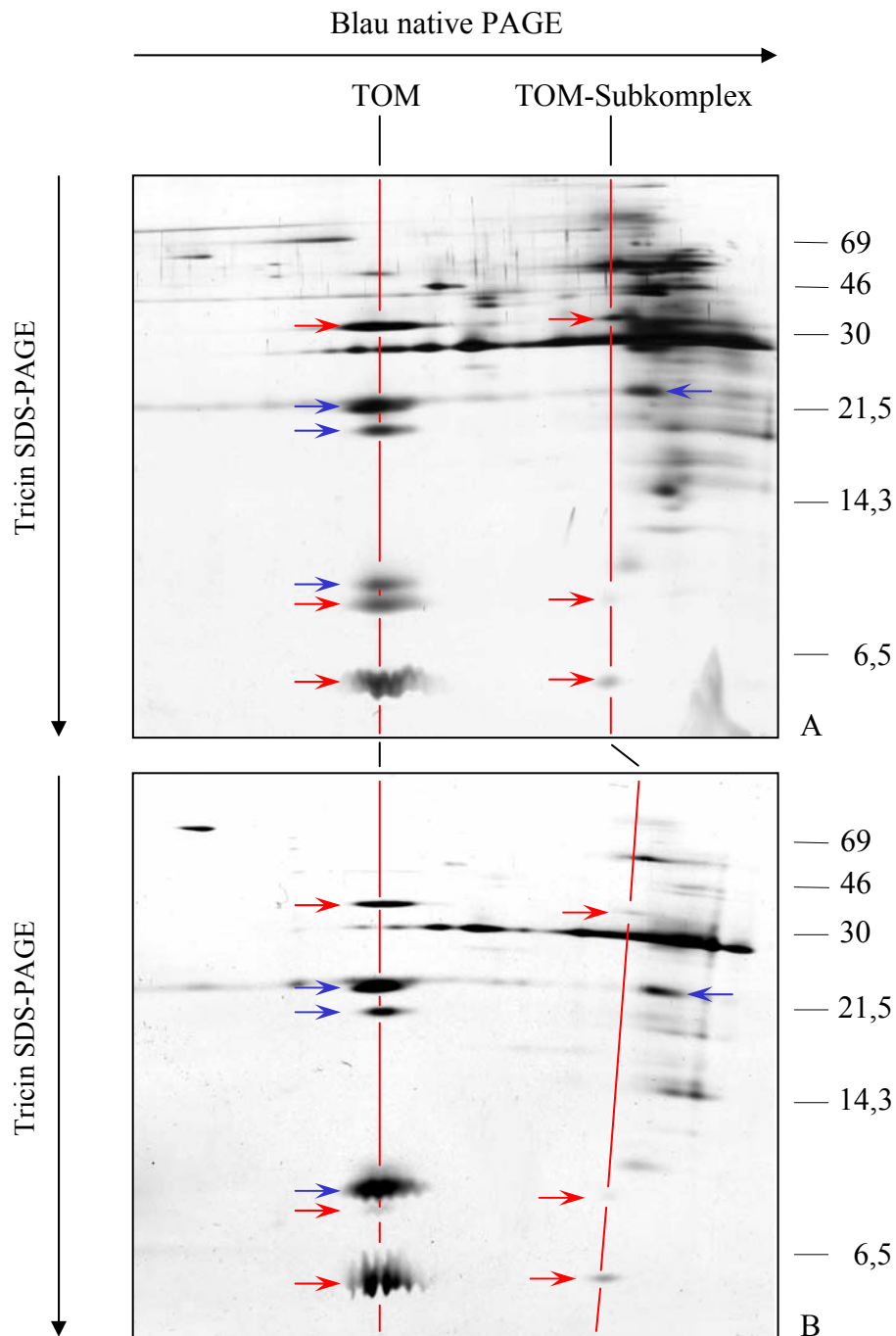


Abb. 16 Subkomplexe des TOM-Komplexes. Dargestellt sind zwei zweidimensionale BN/ SDS-PAGEs von äußeren Mitochondrienmembranen von Arabidopsis. Senkrechte Linien kennzeichnen den TOM-Gesamtkomplex und den TOM-Subkomplex. Die einzelnen TOM-Proteine sind mit Pfeilen (Proteine des Subkomplexes: rot, andere: blau) gekennzeichnet. In (B) war die Lauffront der ersten Dimension verzerrt und somit laufen die Untereinheiten des TOM-Subkomplexes nicht senkrecht untereinander. Die Gele wurden silber-gefärbt. Die Zahlen rechts geben die molekularen Massen von Standard-Proteinen in kDa wieder.

Zusätzlich zu dem eben beschriebenen TOM-Gesamtkomplex tritt auf zweidimensionalen BN/ SDS-Gelen noch ein Subkomplex auf, dessen Masse zwischen 50 und 100 kDa liegt (s. Abb. 16). Der TOM-Gesamtkomplex bildet auf einem zweidimensionalen BN/ SDS-Gel sechs Banden mit apparenten Molekulargewichten von 34 kDa, 23 kDa, 21 kDa, 10 kDa, 8 kDa und 6 kDa (s. Abb. 16). In dem Subkomplex sind nur die Banden mit 34 kDa, 8 kDa und 6 kDa erkennbar (rote Pfeile in Abb. 16). Die 23 kDa-Untereinheit bildet einen zusätzlichen Spot rechts des Subkomplexes. Aufgrund der Nähe zur Lauffront ist nicht erkennbar ob es sich um ein Monomer (ca. 23 kDa) oder ein Dimer (ca. 46 kDa) handelt. Die beiden anderen Untereinheiten (21 kDa und 10 kDa) sind außerhalb des Gesamtkomplexes nicht zu finden. Als nächstes wurde überprüft ob der TOM-Komplex, bzw. seine Proteinuntereinheiten, Domänen haben, die aus den Mitochondrien ins Cytosol ragen. Die Rezeptor-Proteine des TOM-Komplexes müssen solche Domänen besitzen, um die zu importierenden Präproteine zu erkennen. Dazu wurden intakte Mitochondrien mit 250 µg Trypsin pro mg mitochondrialen Proteins inkubiert. Dadurch wurden die Teile von Proteinen, die aus der äußeren Mitochondrienmembran ins Cytoplasma herausragen, abgedaut. Wie in Abb. 17 zu erkennen

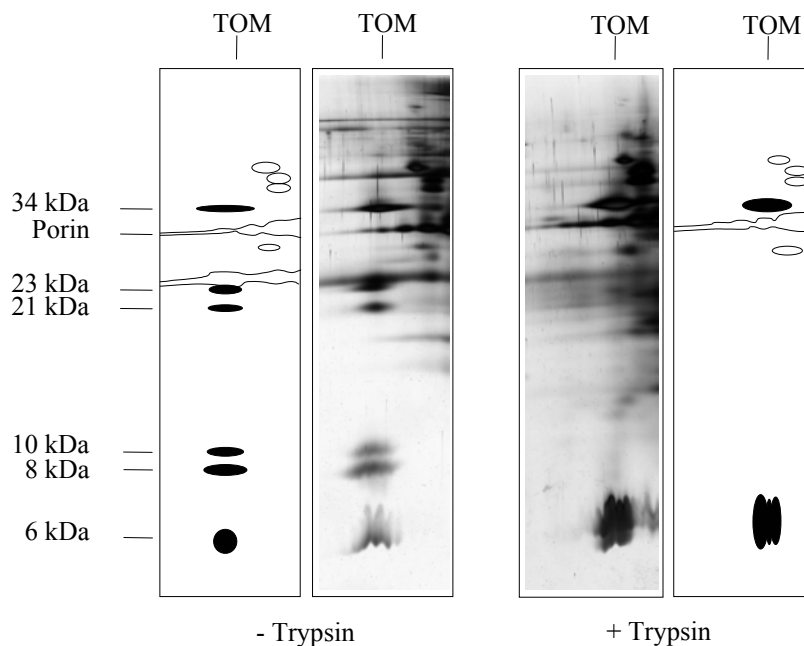


Abb. 17 Trypsinierung intakter Mitochondrien verursacht Degradation des TOM-Komplexes. Äußere Mitochondrienmembranen von trypsinierten (+ Trypsin) und unbehandelten (- Trypsin) Mitochondrien wurden mittels zweidimensionaler BN/ SDS-PAGE aufgetrennt und silbergefärbt. Auf den Schemata neben den Gelen sind die TOM-Untereinheiten schwarz markiert. Links sind die apparenten Größen der Untereinheiten des TOM-Komplexes angegeben.

ist, ändert sich durch das Trypsinieren der Mitochondrien die Masse des TOM-Komplexes. Er läuft in einem zweidimensionalen BN/ SDS-Gel deutlich näher an der Lauffront, was durch Vergleich mit dem internen Membranprotein Porin, das durch Trypsin nicht degradiert wird, deutlich wird. Der Massenverlust entsteht durch die Degradation der Untereinheiten mit 23 kDa, 21 kDa, 10 kDa und 8 kDa, die in dem Gel mit Trypsin nicht in Erscheinung treten. Der 6 kDa-Spot ist bei Trypsinierung deutlich größer als ohne Trypsinierung. Wahrscheinlich laufen dort zusätzlich die im TOM-Komplex verbliebenen Fragmente (Membrananker und eventuelle Domänen des Intermembranraumes) der degradierten Untereinheiten.

Der TOM-Komplex hat also, wie ein Vergleich mit Proteinkomplexen bekannter Größe belegt, eine Gesamtmasse von ca. 388 kDa. Er bildet in einer zweidimensionalen BN/ SDS-PAGE sechs Banden, die für mindestens ebenso viele Proteinuntereinheiten stehen. Einige dieser Proteinuntereinheiten bilden einen Subkomplex, der mit 50 bis 100 kDa deutlich kleiner ist als der Gesamtkomplex. Dieser Subkomplex besteht aus dem 34 kDa-Protein, dem 8 kDa- und einem 6 kDa-Protein. Bei Pilzen ist ein Subkomplex ähnlicher Größe, der sich auch aus nur drei verschiedenen TOM-Proteinen zusammensetzt, bekannt: ein Assemblierungsintermediat, das aus einem TOM40-Dimer und je ein bis zwei Molekülen von TOM5 und TOM7 besteht (Rapaport, 2002).

Das 34 kDa-Protein ähnelt in Größe, Trypsin-Resistenz, und Laufverhalten TOM40 stellt evtl. dessen pflanzliches Homolog dar. Das nur lose mit dem Komplex verbundene 23 kDa-Protein ist wahrscheinlich ein Rezeptor für Präproteine. Auch das 21 kDa- und das 10 kDa-Protein sind trypsinanfällig und könnten evtl. Entsprechungen weiterer Rezeptoren darstellen.

4.5.1 Die einzelnen Proteinuntereinheiten der Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran

Nachdem zuerst der TOM-Komplex in seiner Gesamtheit untersucht wurde, folgt jetzt die Analyse der einzelnen Proteinuntereinheiten. Der TOM-Komplex läßt sich mittels zweidimensionaler BN/ SDS-PAGE in sechs Banden mit apparenten Molekulargewichten von 34 kDa, 23 kDa, 21 kDa, 10 kDa, 8 kDa und 6 kDa zerlegen (s. Abb. 16). Eine genauere Analyse der Untereinheiten des TOM-Komplexes ermöglicht die dreidimensionale PAGE (s. 3.12), bei der die Proteinuntereinheiten nicht nur nach Größe sondern auch nach IEP aufgetrennt werden, so dass auch die eventuelle Existenz von Isoformen der einzelnen

Proteine festgestellt werden kann. Die Ergebnisse dieser Analyse sind bei den jeweiligen Untereinheiten aufgeführt und in Abb. 27 zusammengefaßt.

Die bekannten TOM-Komplexe von Pilzen (vor allem von *S. cerevisiae* und *N. crassa*) bestehen aus den Rezeptor-Untereinheiten TOM70, TOM37 (nur *S. cerevisiae*), TOM22 und TOM20, dem porenbildenden Protein TOM40 und den kleinen Untereinheiten TOM7, TOM6 und TOM5, wobei die Namen die molekularen Massen in kDa wiedergeben. Eine Bande im Bereich von 70 kDa ist beim TOM-Komplex von Arabidopsis nicht zu finden. TOM70 scheint also bei Arabidopsis nicht vorzukommen. Auch bei Datenbanksuchen nach Arabidopsis-Proteinen, die homolog zu bekannten TOM70 –Proteinen sind, ergaben sich nur negative Resultate. Ähnliches gilt für TOM37, auch hier ließen sich keine homologen Arabidopsis-Proteine in den Datenbanken finden und außer der 34 kDa-Bande, die als TOM40 identifiziert wurde, sind im zweidimensionalen Gelen des TOM-Komplexes keine weiteren Banden im Bereich von 30 bis 40 kDa zu finden.

Tabelle 4: Peptide der Untereinheiten des TOM-Komplexes

Untereinheit	Sequenziertes Peptid	Sequenz	Identifiziert als
34 kDa	N-Terminus Peptid 1 Peptid 2 Peptid 3 Peptid 4 Peptid 5	- ADLLPPLTAAQVDAK KVDYSNLPSVVPYEELHREALM... KFSLSHSMVMGPTEVXAQ KXVASGQVASTGA... RDVTASVGYDYMLR	TOM 40.1 TOM 40.1 TOM 40.1 TOM 40.1 TOM 40.1
23 kDa	N-Terminus Peptid 2 Peptid 3 Peptid 11 Peptid 6, 7	XXXETE... KXTEYFQRAE... KXPELHMQFMNQXGQ... KXGGALLELSQF... KHNFDLATQFFQQA VDEQPDNTXYL...	TOM 20.3 TOM 20.2 TOM 20.2 TOM 20.2 TOM 20.3
21 kDa	N-Terminus Peptid	- KASQFFQLAVEEQPES...	TOM 20.4
10 kDa	N-Terminus Peptid 1 Peptid 2	AXKRI... EAQINEIELQQASLLGAPPSP... ISNSEIVSQGR	TOM 22.2 TOM 22.2 TOM 22.2
8 kDa	N-Terminus Peptid 1 Peptid 2	- KVNKGKKGKSGKASS... KSKFDVVK	TOM 7.1 TOM 7.1
6,3 kDa	N-Terminus	MFPGMFMRKPXK	TOM 6 / TOM 5
6,0 kDa	N-Terminus	VNNVVSIEKMXA	TOM 6 / TOM 5

TOM40-Sequenzen mit der Sequenz von TOM40.1. TOM40.2 ist in dieses Alignment nicht mit aufgenommen worden, weil nicht bekannt ist, ob TOM40.2 in den Mitochondrien der verwendeten nicht-grünen Zellkultur exprimiert wird. Alle sequenzierten Peptide gehören zu TOM40.1 (s. Tabelle 4). Zwar bildet TOM40 in der 3D-PAGE mehrere Spots, doch diese liegen alle in einer Linie (gleiches Molekulargewicht), was eher auf posttranslationelle Modifikation eines einzelnen Proteins hindeutet. TOM40.2 sollte mit einer theoretischen Masse von 34,3 kDa etwas größer sein als TOM40.1 mit theoretische Masse von 34,1 kDa. Sieben in den Datenbanken zu findenden ESTs von TOM40.1 belegen eine Expression diese Proteins, zu TOM40.2 dagegen ist nur ein EST zu finden. Welche Art von posttranslationeller Modifikation zu den mindestens 5 TOM40-Spots in Abb. 27 geführt hat, konnte nicht bestimmt werden. Eine massenspektrometrische Untersuchung auf posttranslationelle Phosphorylierung mißlang.

4.5.3 TOM20

TOM20 wurde bei Pilzen als Rezeptor für Präproteine mit N-terminal angehängten Präsequenzen identifiziert. Das erste pflanzliche Tom20-Protein, das identifiziert wurde, ist das von Kartoffel (Heins and Schmitz, 1996). Antikörper, die gegen dieses Protein gerichtet sind, erkennen bei Arabidopsis sowohl die 21 kDa- als auch die 23 kDa-Bande (s. Abb. 19)

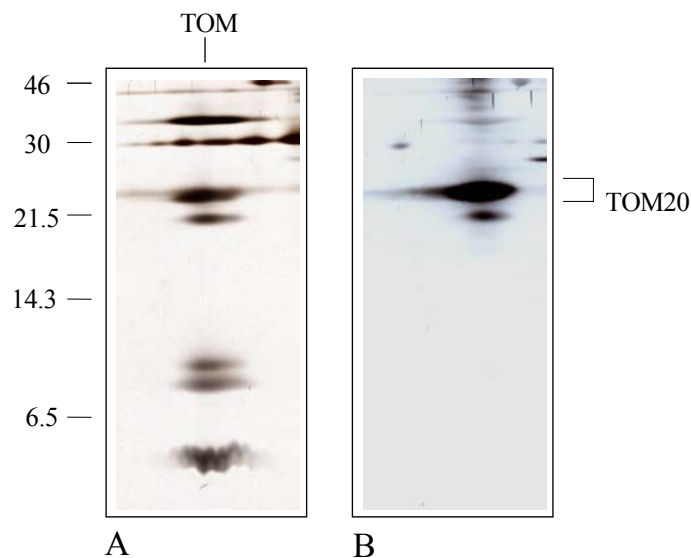


Abb. 19 Immunologische Identifizierung von TOM20

A: Silbergefärbtes Gel mit aufgereinigtem TOM-Komplex von Arabidopsis. B: Westernblot eines identischen Geles nach Immunfärbung mit Antikörper, der gegen Kartoffel TOM20 gerichtet ist (Heins and Schmitz, 1996). Die Zahlen links geben die Massen von Standardproteinen in kDa an.

Dies deutet darauf hin, daß zumindest zwei Formen von TOM20 bei Arabidopsis existieren. Um weitere Erkenntnisse zu gewinnen, sollten die Proteine der beiden Banden mittels zyklischer Edman-Degradation sequenziert werden. Das 21 kDa-Protein erwies sich jedoch als N-terminal blockiert. Daher wurden Peptide für beide Banden hergestellt und sequenziert (s. Tabelle 4). Alle Peptide weisen eine hohe Homologie zu TOM20 von Kartoffel auf. Um Klone zu finden, die für Arabidopsis TOM20 kodieren, wurden Datenbanken nach Sequenzeinträgen durchsucht, die TOM20 von Kartoffel ähneln. Vier verschiedene Gene für Proteine, die TOM20 von Kartoffel ähneln, wurden gefunden (s. Tabelle 5).

Tabelle 5: Klone, die für die TOM20-Formen von *Arabidopsis thaliana* kodieren

	TOM20.1	TOM20.2	TOM20.3	TOM20.4
sequenzierter EST	T45288	T44475	R86802	-
Accession number	AJ296023	AJ296024	AJ296025	-
andere ESTs mit identischer Sequenz	-	Z26778 Z26777	R90391 AI995262 AA042456 AA006022 AA598240	-
genomische Klone	AB026649 (Chromosom 3)	AC004557 (Chromosom 1)	AB026649 (Chromosom 3)	AB023040 (Chromosom 5)
Länge der sequenzierten Klone	828 bp	1118 bp	>782 bp	-
open reading frame der sequenzierten Klone	564 bp	630 bp	606 bp	561 bp *
5' nicht-kodierende Region der sequenzierten Klone	70 bp incl. in frame stop	62 bp incl. in frame stop	28 bp incl. in frame stop	-
3' nicht-kodierende Region der sequenzierten Klone (incl. PolyA)	194 bp	326 bp	148 bp	-
PolyA	20 bp	16 bp	>15 bp	

* vorhergesagt von „GeneBuilder“

Drei dieser Gene stimmen genau mit Einträgen in die Arabidopsis EST Datenbanken überein, was belegt, daß diese Gene exprimiert werden. ESTs für diese drei Gene wurden beim Arabidopsis Biological Research Center bestellt und anschließend auf beiden Strängen komplett sequenziert (s. Tabelle 6). Alle Klone kodierten für open reading frames (ORF), 3'-nicht-kodierende Regionen mit Poly-A-Schwänzen und 5'-nicht-kodierende Regionen mit Stop-Codons im richtigen Leseraster.

Tabelle 6: Eigenschaften der TOM20-Proteine von *Arabidopsis thaliana*

	TOM20.1	TOM20.2	TOM20.3	TOM20.4*
Anzahl der Aminosäuren	188	210	202	187
Berechnete molekulare Masse (kDa)	21,3	23,2	22,6	21,0
berechneter isoelektrischer Punkt	5,8	5,5	4,9	5,4

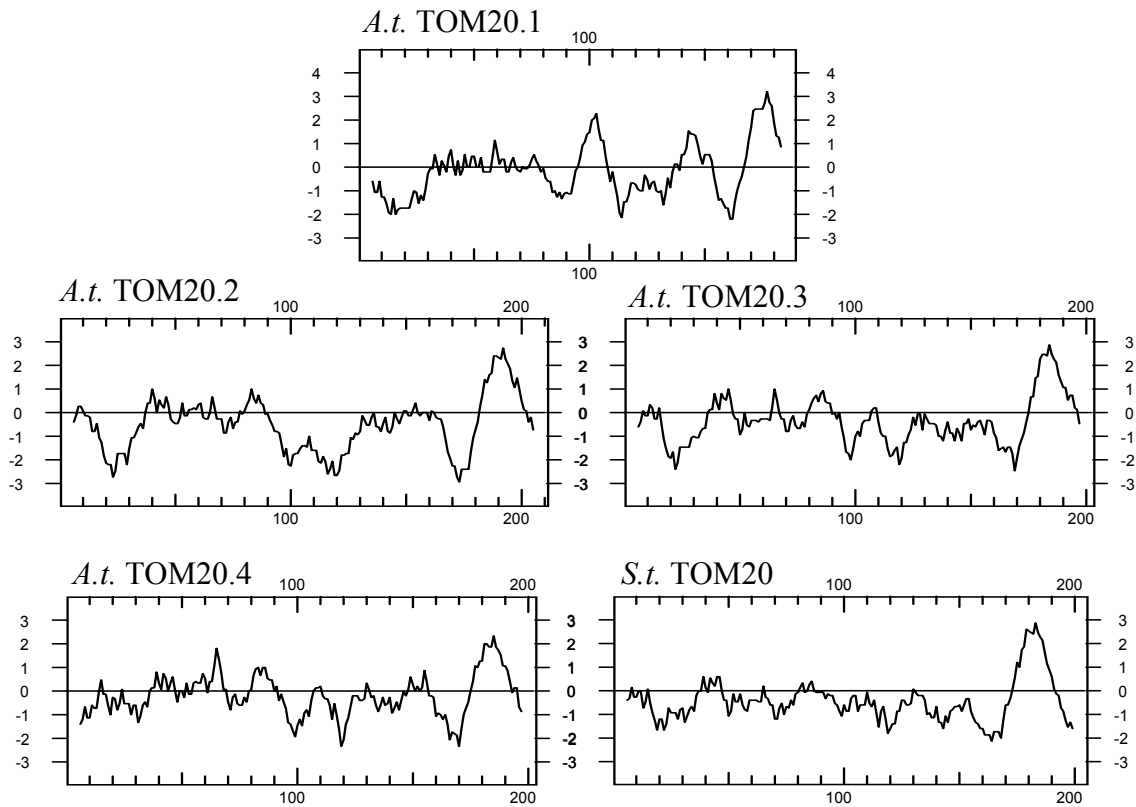
* vorhergesagt von „GeneBuilder“

Die drei so bestimmten Aminosäuresequenzen wurden TOM20.1, TOM20.2 und TOM20.3 genannt. Ein viertes Arabidopsis TOM20 Protein (TOM20.4) kann von einem genomischen Klon abgeleitet werden, aber es gibt keine zu diesem Protein passenden ESTs.

Sequenzvergleiche zwischen den vier TOM20-Formen zeigen Identitäten zwischen 35% und 60% (s. Abb. 20). Auch die Sequenzidentität der Arabidopsis-Sequenzen zu der von Kartoffel bewegt sich in diesem Bereich. Die N-terminale Hälfte und äußerste C-Terminus sind hoch konserviert, dazwischen liegt eine variable Glycin-reiche Region. Alle diese pflanzlichen TOM20 Proteine haben eine große hydrophile Region und einen Membrananker am C-Terminus (s. Abb. 21). Im Gegensatz dazu haben TOM20 Proteinen von Pilzen und Tieren den Membrananker am N-Terminus.

St_TOM20	1	- M E M Q S E F D R L L F F E H A R K S A E T T Y A Q N P L D A D N L T R W G G A L L E L	44
At_TOM20.1	1	- - - - - M D K L N F F E E I R K D A E E T Y K L N P E D A D N L M R W G E A L L E L	38
At_TOM20.2	1	M E F S T A D F E R F I M F E H A R K N S E A Q Y K N D P L D S E N L L K W G G A L L E L	45
At_TOM20.3	1	- M D T E T E F D R I L L F E Q I R Q D A E N T Y K S N P L D A D N L T R W G G V L L E L	44
At_TOM20.4	1	- M D M Q N E N E R L M V F E H A R K V A E A T Y V K N P L D A E N L T R W A G A L L E L	44
St_TOM20	45	S Q F Q P V A E S K Q M I S D A T S K L E E A L T V N P E K H D A L W C L G N A H T S H V	89
At_TOM20.1	39	S Q F Q N V I D S L K M I Q D A I S K L E D A I L I D P M K H D A V W C L G N A Y T S Y A	83
At_TOM20.2	46	S Q F Q P I P E A K L M L N D A I S K L E E A L T I N P G K H Q A L W C I A N A Y T A H A	90
At_TOM20.3	45	S Q F H S I S D A K Q M I Q E A I T K F E E A L L I D P K K D E A V W C I G N A Y T S F A	89
At_TOM20.4	45	S Q F Q - - T E P K Q M I L E A I L K L G E A L V I D P K K H D A L W L I G N A H L S F G	87
St_TOM20	90	F L T P D M D E A K V Y F E K A T Q C F Q Q A F D A D P S N D L Y R K S L E V T A K A P E	134
At_TOM20.1	84	R L T P D D T Q A R L N F G L A Y L F F G I A V A Q Q P D N Q V Y H K S L E M A D K A P Q	128
At_TOM20.2	91	F Y V H D P E E A K E H F D K A T E Y F Q R A E N E D P G N D T Y R K S L D S S L K A P E	135
At_TOM20.3	90	F L T P D E T E A K H N F D L A T Q F F Q Q A V D E Q P D N T H Y L K S L E M T A K A P Q	134
At_TOM20.4	88	F L S S D Q T E A S D N F E K A S Q F F Q L A V E E Q P E S E L Y R K S L T L A S K A P E	132
St_TOM20	135	L H M E I H R H G P M Q Q T M A A E P - - - - - S T S T S T K S S K K T K S S D L K	171
At_TOM20.1	129	L H T G F H K N R L L S - L L G G V E T - - - - - L A I P S P K V V K N K K S S D E K	165
At_TOM20.2	136	L H M Q F M N O G M G Q I L G G G G G G G G G M A S S N V S Q S S K K K K R N T E F T	180
At_TOM20.3	135	L H A E A Y K Q G L G S Q P M G R V E A - - - - - P A P P S S K A V K N K K S S D A K	172
At_TOM20.4	133	L H T G G T A G P S N - - - - - S A K T M K Q K K T S E F K	158
St_TOM20	172	Y D I F G W V I L A V G I V A W V G F A K S N M P P P P P P P P Q	204
At_TOM20.1	166	Y I V M G W V I L A I G V V A C I S F R K L R - - - - -	188
At_TOM20.2	181	Y D V C G W I I L A C G I V A W V G M A K S L G P P P P A R - - -	210
At_TOM20.3	173	Y D A M G W V I L A I G V V A W I S F A K A N V P V S P P R - - -	202
At_TOM20.4	159	Y D V F G W V I L A S Y V V A W I S F A N S Q T P V S R Q - - - -	187

Abb. 20 Alignment der vier TOM20-Sequenzen von Arabidopsis (At) und der TOM20-Sequenz von Kartoffel (St). Aminosäuren, die blau unterlegt sind, sind in mindestens vier der fünf Sequenzen konserviert. Die Peptide aus Tabelle 4 sind durch Rahmen gekennzeichnet.



St_TOM20	1	- M E M Q S E F D R L L F F E H A R K S A E T T Y A Q N P L D A D N L T R W G G A L L E L	44
At_TOM20.1	1	- - - - - M D K L N F F E E I R K D A E E T Y K L N P E D A D N L M R W G E A L L E L	38
At_TOM20.2	1	M E F S T A D F E R F I M F E H A R K N S E A Q Y K N D P L D S E N L L K W G G A L L E L	45
At_TOM20.3	1	- M D T E T E F D R I L L F E Q I R Q D A E N T Y K S N P L D A D N L T R W G G V L L E L	44
At_TOM20.4	1	- M D M Q N E N E R L M V F E H A R K V A E A T Y V K N P L D A E N L T R W A G A L L E L	44
St_TOM20	45	S Q F Q P V A E S K Q M I S D A T S K L E E A L T V N P E K H D A L W C L G N A H T S H V	89
At_TOM20.1	39	S Q F Q N V I D S L K M I Q D A I S K L E D A I L I D P M K H D A V W C L G N A Y T S Y A	83
At_TOM20.2	46	S Q F Q P I P E A K L M L N D A I S K L E E A L T I N P G K H Q A L W C I A N A Y T A H A	90
At_TOM20.3	45	S Q F H S I S D A K Q M I Q E A I T K F E E A L L I D P K K D E A V W C I G N A Y T S F A	89
At_TOM20.4	45	S Q F Q - - T E P K Q M I L E A I L K L G E A L V I D P K K H D A L W L I G N A H L S F G	87
St_TOM20	90	F L T P D M D E A K V Y F E K A T Q C F Q Q A F D A D P S N D L Y R K S L E V T A K A P E	134
At_TOM20.1	84	R L T P D D T Q A R L N F G L A Y L F F G I A V A Q O P D N Q V Y H K S L E M A D K A P Q	128
At_TOM20.2	91	F Y V H D P E E A K E H F D K A T E Y F Q R A E N E D P G N D T Y R K S L D S S L K A P E	135
At_TOM20.3	90	F L T P D E T E A K H N F D L A T Q F F Q Q A V D E Q P D N T H Y L K S L E M T A K A P Q	134
At_TOM20.4	88	F L S S D Q T E A S D N F E K A S Q F F Q L A V E E Q P E S E L Y R K S L T L A S K A P E	132
St_TOM20	135	L H M E I H R H G P M Q Q T M A A E P - - - - - S T S T S T K S S K K T K S S D L K	171
At_TOM20.1	129	L H T G F H K N R L L S - L L G G V E T - - - - - L A I P S P K V V K N K K S S D E K	165
At_TOM20.2	136	L H M Q F M N Q G M G Q Q I L G G G G G G G M A S S N V S Q S S K K K K R N T E F T	180
At_TOM20.3	135	L H A E A Y K Q G L G S Q P M G R V E A - - - - - P A P P S S K A V K N K K S S D A K	172
At_TOM20.4	133	L H T G G T A G P S S N - - - - - - - - - - - - - - - S A K T M K Q K K T S E F K	158
St_TOM20	172	Y D I F G W V I L A V G I V A W V G F A K S N M P P P P P P P P Q	204
At_TOM20.1	166	Y I V M G W V I L A I G V V A C I S F R K L R - - - - - - - - - - - - - - -	188
At_TOM20.2	181	Y D V C G W I I L A C G I V A W V G M A K S L G P P P P A R - - - - -	210
At_TOM20.3	173	Y D A M G W V I L A I G V V A W I S F A K A N V P V S P P R - - - - -	202
At_TOM20.4	159	Y D V F G W V I L A S Y V V A W I S F A N S Q T P V S R Q - - - - -	187

Abb. 21 Vergleich der Hydrophobizitätsprofile der TOM20-Sequenzen von Arabidopsis (At) und Kartoffel (St). Die Profile wurden gemäß Kyte and Doolittle (1982) berechnet, wobei ein 11 Aminosäuren großes Fenster verwendet wurde. Bei den Graphen im oberen Teil geben die Zahlen an der X-Achse die Position der Aminosäuren wieder und die Zahlen an der Y-Achse stellen die Hydrophobizität dar.

Die Aminosäure-Sequenzen der Peptide (s. Tabelle 4) von der 21 kDa- und 23 kDa-Bande sind identisch zu Sequenzabschnitten der in den Datenbanken gefundenen Proteine (s. Abb. 20). Drei der Peptide aus der 23 kDa-Bande sind in der Sequenz von TOM20.2 (berechnete molekulare Masse 23,2 kDa) und eins in der Sequenz von TOM20.3 (berechnete molekulare Masse 22,6 kDa) enthalten. Das Peptid aus der 21 kDa-Bande ist in der Sequenz von TOM20.4 (berechnete molekulare Masse 21,0 kDa) enthalten, womit auch die Expression von TOM20.4 bewiesen ist. Es wurde kein zu TOM20.1 (berechnete molekulare Masse 21,3 kDa) passendes Peptid gefunden.

Um TOM20 auf zweidimensionalen IEF/ SDS-Gelen identifizieren zu könne, wurde ein solches Gel geblottet und einer Immunfärbung mit Antikörpern gegen TOM20 von Kartoffel unterzogen (s. Abb. 22).

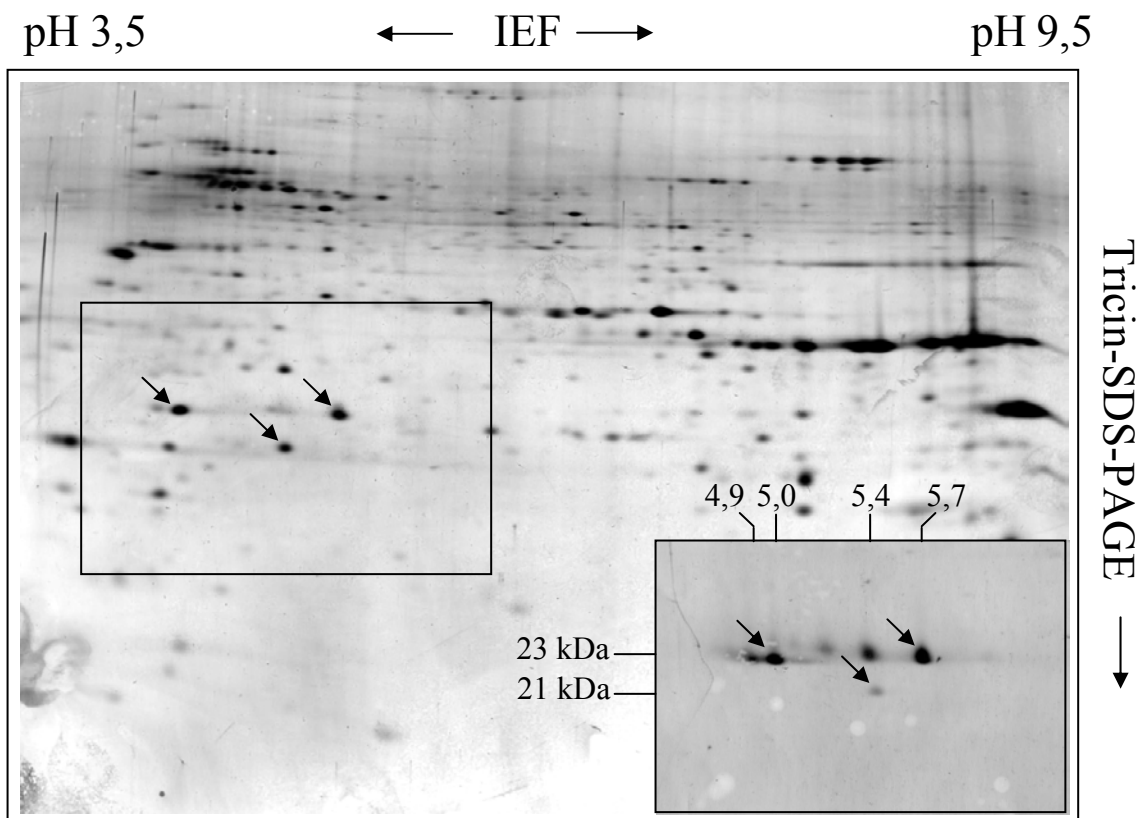


Abb. 22 Auftrennung der multiplen TOM20-Formen von Arabidopsis. Das Gesamtproteom der äußeren Mitochondrienmembran von Arabidopsis wurde mittels zweidimensionaler IEF/ SDS-PAGE aufgetrennt. Das Gel wurde silber gefärbt. Einige Spots im zentralen Rahmen wurden von einem Antikörper erkannt, der gegen TOM20 von Kartoffel gerichtet ist. Der Westernblot ist rechts unten im Gel eingefügt. Der Ausschnitt entspricht dem zentralen Kasten auf dem Gel. Die Zahlen oberhalb des Blots geben isoelektrische Punkte, die rechts des Blots molekulare Massen wieder. Die Pfeile zeigen die Spots, die wahrscheinlich TOM20.2, TOM20.3 und TOM20.4 sind.

Es konnten so die drei Spots die TOM20.2, TOM20.3 und TOM20.4 entsprechen, identifiziert werden. Ein TOM20.1 zuzuordnender Spot konnte nicht identifiziert werden, was auch mit dem Fehlen vom Peptiden dieser TOM20-Form zusammenpaßt. Möglicherweise wird TOM20.1 in unserer Zellkultur oder zum Zeitpunkt der Ernte nicht oder nur gering exprimiert. Außer den drei Spots, die wahrscheinlich die bekannten TOM-Formen darstellen erkennt der Antikörper noch mehrere andere. Diese könnten Modifikationen der vier bekannten TOM20-Formen sein. Angesichts dessen, daß das Genom von Arabidopsis komplett sequenziert ist und keine weiteren TOM20-Gene gefunden wurden, ist die Existenz weiterer TOM20-Formen unwahrscheinlich.

4.5.4 TOM22

TOM22 ist in Pilzen ein Rezeptorprotein, das eng mit der zentralen Importpore verbunden ist und wahrscheinlich auch im Intermembranraum mit dem zu importierenden Protein interagiert. Bei Arabidopsis gibt es außer TOM20 kein Protein im Bereich von 15 bis 30 kDa. Da aber ein Fehlen von TOM22 bei Pilzen extreme Phänotypen verursacht, ist anzunehmen, daß TOM22 auch bei Arabidopsis vorkommt. Die Peptide der 10 kDa-Bande (s. Tabelle 4) entsprechen Teilen der Sequenz des Proteins mit der Accession Number At5g43970 (s. Macasev et al., 2000). Dieses Protein wiederum hat eine 57%ige Homologie zu einem Protein des Klonen AI999522. Das Protein At5g43970 wird als TOM22.2 bezeichnet, das andere als TOM22.1. TOM22.1 hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 8,84 und eine molekulare Masse von 9,81 kDa. TOM22.2 hat einen theoretischen isoelektrischen Punkt von 10,12 und eine molekulare Masse von 11,13 kDa. Der Vergleich mit anderen TOM22-Proteinen zeigt relativ geringe Sequenzidentitäten von 18% bis 21 % (s. Abb. 23). Beim Vergleich mit den TOM22-Sequenzen von Mensch und Pilzen fällt auf, daß bei Arabidopsis eine Region nahe des N-Terminus deletiert zu sein scheint. In der in Abbildung 23 gekennzeichneten Region hat Arabidopsis nur zwei Aminosäuren während *N. crassa* 15, *S. cerevisiae* 18 und der Mensch sogar 19 Aminosäuren in dieser Region aufweisen. Im Hydrophobizitätsprofil fällt diese Region als besonders hydrophil auf.

TOM22At1	1	-----MA	P	K	K	I	G	A	G	K	-----	10																																												
TOM22At2	1	-----MA	A	K	R	I	G	A	G	K	S	-----	11																																											
TOM22h	1	-----MA	A	A	A	V	A	A	A	G	A	G	E	P	Q	S	P	D	E	L	L	P	K	G	D	A	E	K	P	E	E	E	L	32																						
TOM22y	1	M	V	E	L	T	E	I	K	D	D	V	V	Q	L	D	E	P	Q	F	S	R	N	Q	A	I	V	E	E	K	A	S	A	T	N	N	D	V	V	D	-----	E	D	S	D	S	46									
TOM22Nc	1	M	V	Q	L	T	E	V	E	D	E	H	F	Q	-----	Q	P	Q	V	G	P	E	E	D	E	D	F	T	-----	D	T	D	S	E	I	33																				
TOM22At1	11	-	-	-	G	D	S	S	I	L	A	K	I	S	N	-----	Y	D	I	V	S	Q	G	R	R	A	A	C	D	A	-----	V	Y	V	S	K	K	L	L	K	S	T	G	K	A	A	W	51								
TOM22At2	12	-	G	G	G	D	P	N	I	L	A	R	I	S	N	-----	S	E	I	V	S	Q	G	R	R	A	A	G	D	A	-----	V	E	V	S	K	K	L	L	R	S	T	G	K	A	A	W	54								
TOM22h	33	E	E	D	D	D	E	E	L	D	E	T	L	S	E	R	L	W	G	L	T	E	M	F	P	E	R	V	R	S	A	A	G	A	T	F	D	L	S	L	F	V	A	Q	K	M	Y	R	F	S	R	A	A	L	W	86
TOM22y	47	D	F	E	D	E	F	D	E	N	E	T	L	L	D	R	I	V	A	L	K	D	I	V	P	P	G	K	R	Q	T	I	S	N	F	F	G	F	T	S	S	F	V	R	N	A	F	T	K	S	G	N	L	A	W	100
TOM22Nc	34	S	V	D	S	D	Y	E	S	Q	E	T	F	T	D	R	L	Y	A	L	R	D	M	V	S	P	T	T	R	G	W	F	Y	H	K	Y	S	T	T	T	N	F	V	K	S	T	I	S	F	A	G	R	A	A	W	87
TOM22At1	52	I	A	G	T	T	F	L	I	L	A	V	P	L	I	L	E	L	E	Q	D	H	R	L	G	E	I	D	F	E	Q	A	S	L	L	G	T	P	P	V	G	A	M	L	-----	94										
TOM22At2	55	I	A	G	T	T	F	L	I	L	V	V	P	L	I	I	E	M	D	R	E	A	Q	I	N	E	I	E	L	Q	Q	A	S	L	L	G	A	P	P	S	P	M	Q	R	G	L	-----	99								
TOM22h	87	I	G	T	T	S	F	M	I	L	V	L	P	V	V	F	E	T	E	K	L	Q	M	E	Q	Q	Q	L	Q	Q	R	Q	I	L	L	G	P	N	T	G	L	S	G	G	M	P	G	A	L	P	S	L	P	G	140	
TOM22y	101	T	L	T	T	A	L	L	L	G	V	P	L	S	L	S	I	L	A	E	Q	L	I	E	M	E	K	T	F	D	L	Q	S	D	A	N	N	I	L	A	Q	E	K	D	A	A	A	T	A	N	-----	152				
TOM22Nc	88	A	V	S	V	S	G	L	L	I	G	V	P	F	A	I	A	F	A	E	D	Q	N	Y	A	A	M	E	Q	E	A	R	M	R	E	L	G	S	D	V	L	T	A	G	G	E	G	Q	A	G	T	A	E	K	T	141
TOM22At1	0	-----	94																																																					
TOM22At2	0	-----	99																																																					
TOM22h	141	K	I	-----	142																																																			
TOM22y	0	-----	152																																																					
TOM22Nc	142	L	A	A	I	G	G	E	G	A	R	P	A	L	-----	154A																																								
TOM22At1	1	-----MA	P	K	K	I	G	A	G	K	-----	10																																												
TOM22At2	1	-----MA	A	K	R	I	G	A	G	K	S	-----	11																																											
TOM22h	1	-----MA	A	A	A	V	A	A	A	G	A	G	E	P	Q	S	P	D	E	L	L	P	K	G	D	A	E	K	P	E	E	E	L	32																						
TOM22y	1	M	V	E	L	T	E	I	K	D	D	V	V	Q	L	D	E	P	Q	F	S	R	N	Q	A	I	V	E	E	K	A	S	A	T	N	N	D	V	V	D	-----	E	D	S	D	S	46									
TOM22Nc	1	M	V	Q	L	T	E	V	E	D	E	H	F	Q	-----	Q	P	Q	V	G	P	E	E	D	E	D	F	T	-----	D	T	D	S	E	I	33																				
TOM22At1	11	-	-	-	G	D	S	S	I	L	A	K	I	S	N	-----	Y	D	I	V	S	Q	G	R	R	A	A	C	D	A	-----	V	Y	V	S	K	K	L	L	K	S	T	G	K	A	A	W	51								
TOM22At2	12	-	G	G	G	D	P	N	I	L	A	R	I	S	N	-----	S	E	I	V	S	Q	G	R	R	A	A	G	D	A	-----	V	E	V	S	K	K	L	L	R	S	T	G	K	A	A	W	54								
TOM22h	33	E	E	D	D	D	E	E	L	D	E	T	L	S	E	R	L	W	G	L	T	E	M	F	P	E	R	V	R	S	A	A	G	A	T	F	D	L	S	L	F	V	A	Q	K	M	Y	R	F	S	R	A	A	L	W	86
TOM22y	47	D	F	E	D	E	F	D	E	N	E	T	L	L	D	R	I	V	A	L	K	D	I	V	P	P	G	K	R	Q	T	I	S	N	F	F	G	F	T	S	S	F	V	R	N	A	F	T	K	S	G	N	L	A	W	100
TOM22Nc	34	S	V	D	S	D	Y	E	S	Q	E	T	F	T	D	R	L	Y	A	L	R	D	M	V	S	P	T	T	R	G	W	F	Y	H	K	Y	S	T	T	T	N	F	V	K	S	T	I	S	F	A	G	R	A	A	W	87
TOM22At1	52	I	A	G	T	T	F	L	I	L	A	V	P	L	I	L	E	L	E	Q	D	H	R	L	G	E	I	D	F	E	Q	A	S	L	L	G	T	P	P	V	G	A	M	L	-----	94										
TOM22At2	55	I	A	G	T	T	F	L	I	L	V	V	P	L	I	I	E	M	D	R	E	A	Q	I	N	E	I	E	L	Q	Q	A	S	L	L	G	A	P	P	S	P	M	Q	R	G	L	-----	99								
TOM22h	87	I	G	T	T	S	F	M	I	L	V	L	P	V	V	F	E	T	E	K	L	Q	M	E	Q	Q	Q	L	Q	Q	R	Q	I	L	L	G	P	N	T	G	L	S	G	G	M	P	G	A	L	P	S	L	P	G	140	
TOM22y	101	T	L	T	T	A	L	L	L	G	V	P	L	S	L	S	I	L	A	E	Q	L	I	E	M	E	K	T	F	D	L	Q	S	D	A	N	N	I	L	A	Q	E	K	D	A	A	A	T	A	N	-----	152				
TOM22Nc	88	A	V	S	V	S	G	L	L	I	G	V	P	F	A	I	A	F	A	E	D	Q	N	Y	A	A	M	E	Q	E	A	R	M	R	E	L	G	S	D	V	L	T	A	G	G	E	G	Q	A	G	T	A	E	K	T	141
TOM22At1	0	-----	94																																																					
TOM22At2	0	-----	99																																																					
TOM22h	141	K	I	-----	142																																																			
TOM22y	0	-----	152																																																					
TOM22Nc	142	L	A	A	I	G	G	E	G	A	R	P	A	L	-----	154B																																								

Abb. 23 Vergleich der Sequenzen (A) und der Hydrophobizitätsprofile (B) der beiden TOM22-Proteine von Arabidopsis (At) mit denen der TOM22-Proteine von *N. crassa* (Nc), der Hefe *S. cerevisiae* (y) und der des Menschen (h). Das Alignment wurde mittels ClustalW erstellt. Gap penalties: -12/-2. Aminosäuren, die in mindestens drei der fünf Sequenzen identisch sind, sind farbig markiert. Die Hydrophobizitätsprofile wurden gemäß Kyte and Doolittle (1982) berechnet, wobei ein 11 Aminosäuren großes Fenster verwendet wurde.

4.5.5 Die kleinen TOM-Proteine TOM5, TOM6 und TOM7

Über die Funktion der kleinen TOM-Proteine ist wenig bekannt. TOM5 spielt wahrscheinlich eine Rolle beim Transport der Präproteine von den Rezeptoren zur Importpore. TOM6 und TOM7 haben möglicherweise antagonistische Funktionen bei der Interaktion der Rezeptoren mit dem Komplex der General Insertion Pore (GIP). Alle drei gehören zum GIP-Komplex.

TOM7At1	1	M E S T I S L K V N - K G K - G K G S K G A S S S D D K S K F D V V K E W T N W S	39
TOM7At2	1	M A A K S T L K I K G K A K P S K G S S S S S S S S A S S K Y K V F K D W T N W S	41
TOM7St	1	- - - - - M L K P K G K N T K K A A A A D E D D G A V A V V G K F V K E W G T W T	36
TOM7y	1	- - - - - M S F L P S - - - - - F I L S D E S K E R I S K I L T L T H N - - - - -	26
TOM7At1	40	L K K A K V V T H Y G F I P L V I F V G M N S D P - K P H L F Q L L S P V - - -	75
TOM7At2	42	L Q K A K V A T H Y G F I P L I I I I G M N S D P - K P H L F H L L S P V - - -	77
TOM7St	37	A K K A K V I T H Y G F I P L V I I I G M N S E P - K P S L S Q L L S P V - - -	72
TOM7y	27	- - - - - V A H Y G W I P F V L Y L G W A H T S N R P N F L N L L S P L P S V	60 A
TOM7At1	1	M E S T I S L K V N - K G K - G K G S K G A S S S D D K S K F D V V K E W T N W S	39
TOM7At2	1	M A A K S T L K I K G K A K P S K G S S S S S S S S A S S K Y K V F K D W T N W S	41
TOM7St	1	- - - - - M L K P K G K N T K K A A A A D E D D G A V A V V G K F V K E W G T W T	36
TOM7y	1	- - - - - M S F L P S - - - - - F I L S D E S K E R I S K I L T L T H N - - - - -	26
TOM7At1	40	L K K A K V V T H Y G F I P L V I F V G M N S D P - K P H L F Q L L S P V - - -	75
TOM7At2	42	L Q K A K V A T H Y G F I P L I I I I G M N S D P - K P H L F H L L S P V - - -	77
TOM7St	37	A K K A K V I T H Y G F I P L V I I I G M N S E P - K P S L S Q L L S P V - - -	72
TOM7y	27	- - - - - V A H Y G W I P F V L Y L G W A H T S N R P N F L N L L S P L P S V	60 B

Abb. 24 Vergleich der Sequenzen (A) und der Hydrophobizitätsprofile (B) der beiden TOM7-Proteine von Arabidopsis (At) mit denen der TOM7-Proteine der Hefe *S. cerevisiae* (y) und der Kartoffel (St). Das Alignment wurde mittels ClustalW erstellt. Gap penalties: -12/-2. Aminosäuren, die in mindestens drei der vier Sequenzen identisch sind, sind farbig markiert. Die Hydrophobizitätsprofile wurden gemäß Kyte and Doolittle (1982) berechnet, wobei ein 11 Aminosäuren großes Fenster verwendet wurde.

Das 8 kDa-Protein konnte schon 1998 als TOM7 identifiziert werden (Jänsch et al., 1998). Bei Datenbanksuchen mit TOM7 von Kartoffel als Sonde wurde der genomische Klon AB005233 gefunden, dessen Sequenz eine hohe Homologie zu der Suchsequenz aufwies (s. Abb. 24). Die Aminosäuresequenzen der Peptide der 8 kDa-Bande (s. Tabelle 4) stimmen mit Teilen der translatierten Sequenz dieses Genes überein. Ein EST (Z25715) mit nur unvollständiger Sequenz wurde sequenziert. Das so identifizierte Protein wird als TOM7.1 bezeichnet. Ein weiteres Protein, dessen Aminosäuresequenz zu 67% mit der von TOM7.1 identisch ist, wird als TOM7.2 bezeichnet. Zu diesem Protein konnten bisher weder ESTs noch Peptiddaten gefunden werden, so daß seine Expression nicht eindeutig bestätigt werden kann. Unter At1g64220 wird es in den Datenbanken als hypothetisches Protein geführt. TOM5 und TOM6 konnten nicht eindeutig identifiziert werden. Bei der Auftrennung mittels zweidimensionaler BN/ SDS-PAGE laufen die beiden Proteine so dicht zusammen, daß sie nicht getrennt werden können. Trotzdem gelang es Dr. Volker Krufft zwei N-terminale Peptide zu sequenzieren (s. Tabelle 4). Mittels dieser Sequenzen konnten die zugehörigen Proteine mit den Accession numbers At5g08040 und At1g 49410 in einer Proteindatenbank (MIPS)

identifiziert werden. Es war jedoch nicht möglich zu bestimmen welches dieser Proteine TOM5 und welches TOM6 entspricht. Das einzig bekannte TOM5-Protein (das der Hefe) hat 15,3% bzw. 14,3% Sequenzidentität zu At5g08040 bzw. AT1g49410. Zu TOM6 von Hefe haben At5g08040 und At1g49410 14,8% bzw. 22,6% Sequenzidentität, was darauf hindeuten könnte, daß At5g08040 TOM5 und At1g49410 TOM6 entspräche. Umgekehrt aber hat At1g49410 mit dem TOM6-Protein von *N. crassa* nur 16,7% Sequenzidentität, während At5g08040 21,3% Sequenzidentität aufweist. Eine eindeutige Zuordnung der Sequenzen ist also nicht möglich. Deshalb wird das mit 6,3 kDa etwas größere Protein At5g08040 als TOM5/6a (s. Abb. 25) und das kleinere (6,0 kDa) Protein At1g49410 als TOM5/6b (s. Abb. 26) bezeichnet. Die große Ähnlichkeit dieser Proteine deutet darauf hin, daß sie alle einer Genfamilie angehören.

Sc-TOM6	1	-	M	D	G	M	F	A	M	P	G	A	A	A	G	A	A	S	P	Q	Q	P	K	S	R	F	Q	A	F	K	E	S	P	31
Nc-TOM6	1	-	M	P	S	A	K	Y	I	E	R	P	G	G	S	R	K	S	K	G	F	I	R	S	T	Y	D	S	L	T	S	S	E	31
At-6.3kDa	1	M	F	P	G	-	M	F	M	R	K	P	D	-	K	A	E	A	L	K	Q	L	R	T	H	V	A	L	F	G	-	-	S	28
Sc-TOM6	32	L	Y	T	I	A	L	N	G	A	F	F	V	A	G	V	A	F	I	Q	S	P	L	M	D	M	L	A	P	Q	L	61	A	
Nc-TOM6	32	N	A	S	V	V	R	S	I	A	F	F	G	A	A	V	A	F	L	S	S	S	W	G	E	M	L	V	V	Q	-	60		
At-6.3kDa	29	W	V	V	I	I	R	A	A	P	Y	V	-	-	-	L	S	Y	F	S	D	S	-	K	D	E	L	K	I	D	F	54		
Sc-TOM5	1	M	F	G	L	P	Q	Q	E	V	S	E	E	E	K	R	A	H	Q	E	Q	T	E	K	T	L	K	Q	A	A	Y	V	A	32
At-6.3kDa	1	M	F	-	-	P	G	M	F	M	R	K	P	D	K	A	E	A	L	K	Q	L	R	T	H	V	A	L	F	G	S	W	V	30
Sc-TOM5	33	A	F	L	W	V	S	P	M	I	W	H	L	V	-	-	-	K	K	Q	W	K	-	-	-	50	B							
At-6.3kDa	31	V	I	I	R	A	A	P	Y	V	L	S	Y	F	S	D	S	K	D	E	L	K	I	D	F	54								
Sc-TOM6	1	-	M	D	G	M	F	A	M	P	G	A	A	A	G	A	A	S	P	Q	Q	P	K	S	R	F	Q	A	F	K	E	S	P	31
Nc-TOM6	1	-	M	P	S	A	K	Y	I	E	R	P	G	G	S	R	K	S	K	G	F	I	R	S	T	Y	D	S	L	T	S	S	E	31
At-6.3kDa	1	M	F	P	G	-	M	F	M	R	K	P	D	-	K	A	E	A	L	K	Q	L	R	T	H	V	A	L	F	G	-	-	S	28
Sc-TOM6	32	L	Y	T	I	A	L	N	G	A	F	F	V	A	G	V	A	F	I	Q	S	P	L	M	D	M	L	A	P	Q	L	61	C	
Nc-TOM6	32	N	A	S	V	V	R	S	I	A	F	F	G	A	A	V	A	F	L	S	S	S	W	G	E	M	L	V	V	Q	-	60		
At-6.3kDa	29	W	V	V	I	I	R	A	A	P	Y	V	-	-	-	L	S	Y	F	S	D	S	-	K	D	E	L	K	I	D	F	54		
Sc-TOM5	1	M	F	G	L	P	Q	Q	E	V	S	E	E	E	K	R	A	H	Q	E	Q	T	E	K	T	L	K	Q	A	A	Y	V	A	32
At-6.3kDa	1	M	F	-	-	P	G	M	F	M	R	K	P	D	K	A	E	A	L	K	Q	L	R	T	H	V	A	L	F	G	S	W	V	30
Sc-TOM5	33	A	F	L	W	V	S	P	M	I	W	H	L	V	-	-	-	K	K	Q	W	K	-	-	-	50	D							
At-6.3kDa	31	V	I	I	R	A	A	P	Y	V	L	S	Y	F	S	D	S	K	D	E	L	K	I	D	F	54								

Abb. 25 Vergleich der Sequenz (A und B) und des Hydrophobizitätsprofils (C und D) von At1g49410 (At-6,3 kDa) mit denen der TOM5- (B und D) und TOM6-Proteine (A und C) von *S. cerevisiae* (Sc) und *N. crassa* (Nc). Die Alignments wurden mittels ClustalW erstellt. Gap penalties: -12/-2. Aminosäuren, die in mindestens zwei der Sequenzen identisch sind, sind farbig markiert. Die Hydrophobizitätsprofile wurden gemäß Kyte and Doolittle (1982) berechnet, wobei ein 11 Aminosäuren großes Fenster verwendet wurde.

Sc-TOM6	1	M D G M F A M P G A A A G A A S P Q Q P K S R F Q A F K E S P L	32
Nc-TOM6	1	M P S A K Y I E R P G G S R K S K G F I R S T Y D S L T S S E N	32
At-6.0kDa	1	V N N V V S I E K M K A L W H S E V H D E Q K W A V N - - - -	27
			A
Sc-TOM6	33	Y T I A L N G A F F V A G V A F I Q S P L M D M L A P Q L	61
Nc-TOM6	33	A S V V R S I A F F G A A V A F L S S S W G E M L V V Q -	60
At-6.0kDa	28	M K L L R A L G M F A G G V V L M R S - Y G D L M G V - -	53
Sc-TOM5	1	- - - - - M F G L P Q Q E V S E E E K R A H Q E Q T E K	23
At-6.0kDa	1	V N N V V S I E K M K A L W H S E V H D E Q K W A V N M K L L R	32
			B
Sc-TOM5	24	T L K Q A A Y V A A F L W V S P M I W H L V K K Q W K	50
At-6.0kDa	33	A L G M F A G G V V - L M R S Y G D L M G V	53
Sc-TOM6	1	M D G M F A M P G A A A G A A S P Q Q P K S R F Q A F K E S P L	32
Nc-TOM6	1	M P S A K Y I E R P G G S R K S K G F I R S T Y D S L T S S E N	32
At-6.0kDa	1	V N N V V S I E K M K A L W H S E V H D E Q K W A V N - - - -	27
			C
Sc-TOM6	33	Y T I A L N G A F F V A G V A F I Q S P L M D M L A P Q L	61
Nc-TOM6	33	A S V V R S I A F F G A A V A F L S S S W G E M L V V Q -	60
At-6.0kDa	28	M K L L R A L G M F A G G V V L M R S - Y G D L M G V - -	53
Sc-TOM5	1	- - - - - M F G L P Q Q E V S E E E K R A H Q E Q T E K	23
At-6.0kDa	1	V N N V V S I E K M K A L W H S E V H D E Q K W A V N M K L L R	32
			D
Sc-TOM5	24	T L K Q A A Y V A A F L W V S P M I W H L V K K Q W K	50
At-6.0kDa	33	A L G M F A G G V V - L M R S Y G D L M G V	53

Abb. 26 Vergleich der Sequenz (A und B) und des Hydrophobizitätsprofils (C und D) von At5g08040 (At-6,0 kDa) mit denen der TOM5- (B und D) und TOM6-Proteine (A und C) von *S. cerevisiae* (Sc) und *N. crassa* (Nc). Die Alignments wurden mittels ClustalW erstellt. Gap penalties: -12/-2. Aminosäuren, die in mindestens zwei der Sequenzen identisch sind, sind farbig markiert. Die Hydrophobizitätsprofile wurden gemäß Kyte and Doolittle (1982) berechnet, wobei ein 11 Aminosäuren großes Fenster verwendet wurde.

Abschließend läßt sich feststellen, daß es gelungen ist, allen Banden, die der TOM-Komplex auf einem zweidimensionale BN/ SDS-Gel (s. Abb. 16) bildet, ein oder mehrere Proteine zuzuordnen. Dabei fällt auf, daß es für fast alle Untereinheiten des TOM-Komplexes mehr als eine Isoform gibt. Für die sechs TOM-Proteine kodieren insgesamt 12 Gene (s. Tabelle 7). Besonders auffällig ist TOM20: Es gibt vier Formen dieses Proteins, die untereinander so unähnlich sind, daß man sie nicht als Isoformen bezeichnen kann. Da die von den Pilzen bekannten Rezeptoren TOM70 und TOM37 komplett fehlen und bei TOM22 immerhin ein Teil der cytoplasmatischen Domäne deletiert ist, ist TOM20 möglicherweise der einzige funktionelle Rezeptor des Komplexes. Hinweise darauf geben schon die Inhibitionsversuche von TOM20 von Dr. Lisa Heins (Heins and Schmitz, 1996). Die verschiedenen TOM20-Formen müssen also alle zu importierenden Proteine erkennen, so daß die einzelnen Formen möglicherweise unterschiedliche Präproteine erkennen.

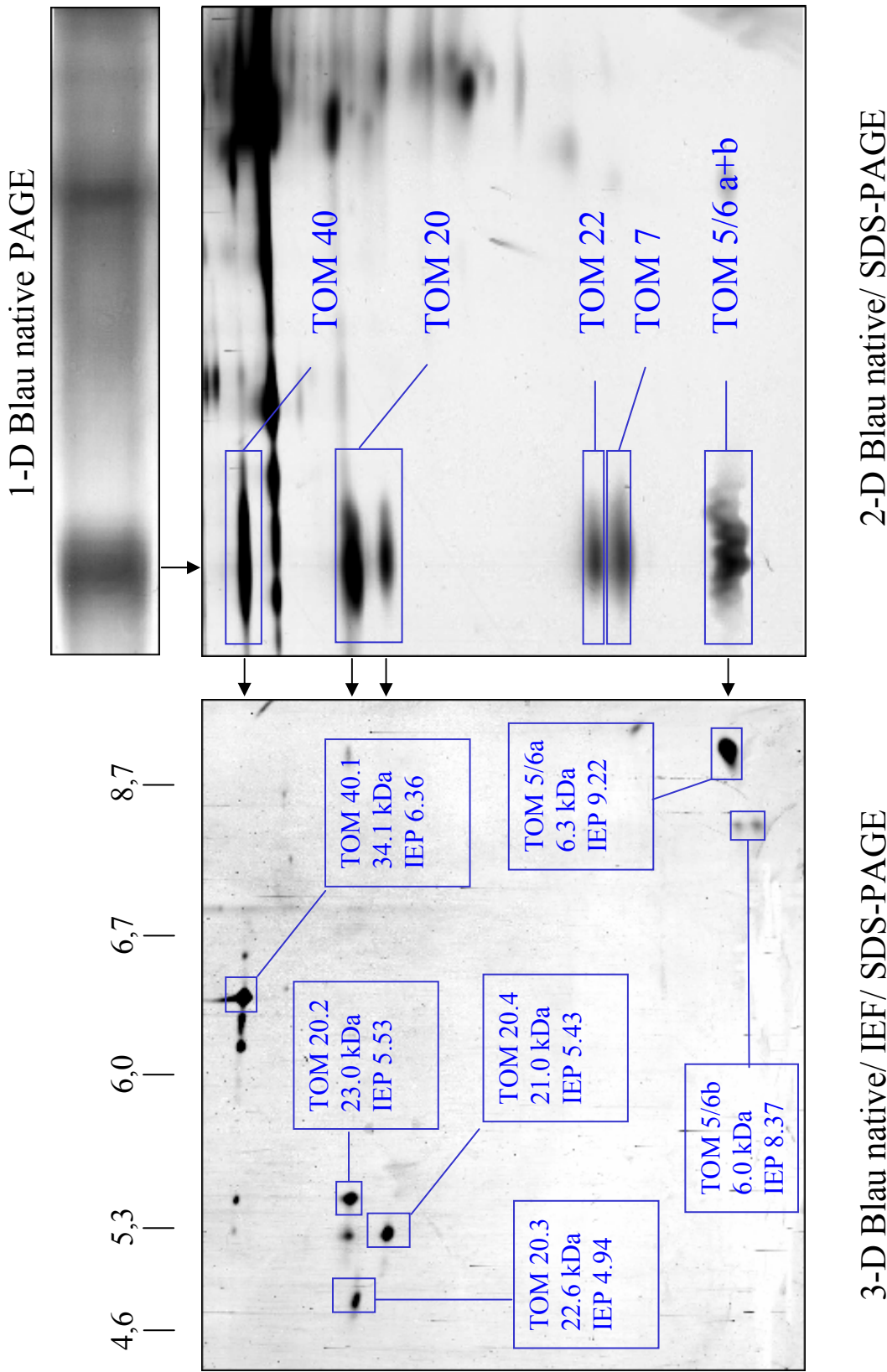


Abb. 27 Der TOM-Komplex von Arabidopsis
 In der 1-D BN-PAGE wurden die Proteinkomplexe der äußeren Mitochondrienmembran von Arabidopsis aufgetrennt. Direkt unter der TOM-Bande in der 1-D BN-PAGE sind die Untereinheiten des TOM-Komplexes, die mittels 2-D BN/ SDS-PAGE aufgetrennt wurden markiert. Die in einer 3D-PAGE erkennbaren Untereinheiten werden auf dem linken Gel identifiziert. Die Pfeile zwischen den Gelen zeigen die fortschreitende Auftrennung von Proteinspots.

Tabelle 7: Die Untereinheiten des TOM-Komplexes von Arabidopsis

Untereinheit	Accession Number	Anzahl ESTs	Anzahl Peptide	MW [kDa]	IEP
TOM 40.1	At3g20000	7	5	34,1 *	6,36
TOM 40.2	At1g50400	1	0	34,3 *	5,59
TOM 20.1	At3g27070	1	0	21,3	5,82
TOM 20.2	At1g27390	3	3	23,0	5,53
TOM 20.3	At3g27080	5	2	22,6	4,94
TOM 20.4	At5g40930	0	1	21,0	5,43
TOM 22.1	At1g04070	4	0	9,8 *	8,84
TOM 22.2	At5g43970	1	3	10,2 *	9,81
TOM 7.1	At5g41685	?	3	8,3	9,80
TOM 7.2	At1g64220	0	0	8,4	10,25
TOM 5/6a	At1g49410	6	1	6,3	9,22
TOM 5/6b	At5g08040	3	1	6,0 *	8,37

* N-terminales Met entfernt

Das Auftreten von mehreren Formen eines Proteins ist bei Pflanzen insgesamt recht häufig. Die Expression aller in Tabelle 7 aufgeführten Proteine ist entweder durch sequenzierte Peptide oder durch das Vorhandensein von ESTs, die ja von mRNA abgeleitet werden, bewiesen. Die einzige Ausnahme ist TOM7.2, von dem weder Peptide noch ESTs bekannt sind. Eine Zusammenfassung aller Daten die zu den Untereinheiten des TOM-Komplexes von Arabidopsis in allen ihren Formen vorliegen, gibt Abb. 27.

5. Diskussion

5.1 Biochemische und physiologische Verfahren zur Analyse von Pflanzenmitochondrien aus grünem Gewebe

Die Aufreinigung von Mitochondrien aus grünem Pflanzengewebe ist mit Schwierigkeiten verbunden. Für physiologische Analysen von Mitochondrien sind reine und intakte Organellen nötig. Deshalb werden für solche Untersuchungen meist Mitochondrien aus nicht-grünem Gewebe verwendet. Da aber einige Funktionen der Mitochondrien eng mit der Photosynthese gekoppelt sind, sind die Mitochondrien aus nicht-grünem Gewebe nicht für alle Untersuchungen geeignet.

In Pflanzenzellen treten Plastiden verschiedenster Art auf, die bei der Aufreinigung von Mitochondrien entfernt werden müssen: Proplastiden, Amyloplasten, Chromoplasten, Leukoplasten, Etioplasten und Chloroplasten (Kirk and Tilney-Bassett, 1978; Lamppa et al., 1980; Ellis and Leech, 1985). Sie alle haben unterschiedliche Größen und Dichten, die aber auch in Abhängigkeit vom physiologischen Zustand schwanken können (besonders bei Chloroplasten). Bei unterschiedlichen Pflanzenspezies unterscheiden sich die physikalischen Eigenschaften der Plastiden teilweise sehr stark (Kirk and Tilney-Bassett, 1978; Pyke, 1999).

Verschiedene Methoden der Mitochondrien-Präparation (Day et al., 1985; Douce et al., 1987; Berkemeyer et al., 1998) aus Erbsen, Arabidopsis und Tabak verwenden ein ähnliches Prinzip: eine Kombination aus differentieller Zentrifugation und Gradientenzentrifugation (siehe 3.3).

Zur Überprüfung der Reinheit der isolierten Mitochondrien wird normalerweise die Aktivität einzelner Enzyme gemessen oder das Auftreten spezieller Markerenzyme/-proteine wie z.B. Fumarase, Succinat-Dehydrogenase, NAD-abhängige Malat-Dehydrogenase oder Cytochrome c-Oxidase für Mitochondrien, 2-Hydroxypyruvat-Reductase oder Glycolat-Oxidase für Peroxisomen, UDP-Glucose-Pyrophosphorylase für das Cytoplasma und NADP-abhängige Glyceraldehyde-3-Phosphat-Dehydrogenase für Plastiden (siehe 3.4; Review: Millar et al., 2001). Douce et al. (1987) verwenden auch Chlorophyll- bzw. Carotinoid-Messungen. Der Nachteil aller dieser Methoden ist, daß jeweils nur ein kleiner Ausschnitt aus dem Proteom der Organellen untersucht wird. Während der Präparation verlieren zudem die

Organellen oft Matrix (sie werden „leaky“) und nehmen statt dessen Medium auf. So werden Kontaminationen der Mitochondrienfraktion mit z.B. Chloroplasten, wenn nur Matrix-Enzyme (z.B. die des Calvin-Zyklus) gemessen werden, oft nicht erkannt. Es sollten immer sowohl Matrix- als auch Membranproteine gemessen werden.

Die BN-PAGE (Kügler et al., 1998; Schägger, 2001; Hausmann et al., 2003) ist als Methode gut geeignet, um sowohl lösliche als auch Membranproteinkomplexe auf einem Gel aufzutrennen. Mittels 2D-BN/ SDS-PAGE ist die Identifikation von Proteinkomplexen anhand ihrer Größe (1D) und des Bandenmusters ihrer Untereinheiten (2D) möglich. So sind z.B. Chloroplasten und Mitochondrien leicht zu unterscheiden (s. Abb. 4). Der Nachteil dieser Methode ist, daß die Größe und Untereinheitenkomposition von Proteinkomplexen sehr vieler Organellen bekannt sein muß (z.B. fehlt im Augenblick ein Vergleichsmuster für Peroxisomen), auch lassen sich nicht alle Proteine auftrennen oder anfärben.

Wenn also (z.B. für physiologische Analysen oder Proteomprojekte) sehr reine Mitochondrien isoliert werden sollen, muß für die Überprüfung der Reinheit der Mitochondrienfraktionen ein möglichst breites Spektrum an Methoden verwendet werden, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen und verschiedene Eigenschaften und Zustände erkennen. Dafür hat sich besonders eine Kombination aus 2D-BN/ SDS-PAGE mit physiologischen Messungen (z.B. O₂-Elektrode) und dem Nachweis von Markerenzymen (z.B. Chlorophylltest) bewährt (Hausmann et al., 2003).

5.2 Analyse des mitochondrialen Proteoms von *Arabidopsis thaliana*

Das genetische System von Pflanzen-Mitochondrien unterscheidet sich von dem der Mitochondrien aus anderen Eukaryonten (Review: Brennicke et al., 1999; Mackenzie and McIntosh, 1999). Das Genom pflanzlicher Mitochondrien ist vergleichsweise groß und kennt rearrangements (wichtig z.B. bei CMS (Janska et al., 1998)). Die die Transkripte in pflanzlichen Mitochondrien werden editiert, bevor sie translatiert werden, und einige Transkripte entstehen erst durch trans-splicing. Das Genom der Mitochondrien von *Arabidopsis* wurde 1997 beschrieben (Unsel et al., 1997), das Gesamtgenom von *Arabidopsis* als erstes pflanzliches im Jahr 2000 (The *Arabidopsis* Genome Initiative, 2000). Diese Analysen zeigen, daß mehr als 90 % der 2-3000 Proteine der Mitochondrien

kernkodiert sind und posttranslational in die Mitochondrien importiert werden. Zudem erleichtert die Kenntnis des Gesamtgenoms die Identifizierung einzelner Proteine ungemein. Proteomanalysen werden seit einiger Zeit als Werkzeug zur Untersuchung komplexer zellulärer Prozesse benutzt (Review: Lottspeich, 1999; Görg et al., 2000) und auch bei genetischen und physiologischen Studien an Pflanzen (Review: Thiellement et al., 1999). Die Ergebnisse der Proteomprojekte sind auch sehr hilfreich für Funktionsanalysen mittels knock-out-Mutanten. Als Methode werden bei Proteomprojekten meist 2D-PAGEs und anschließende Massenspektrometrien benutzt. Aber die Kapazität einzelner Gele reicht nicht aus, um ganze Pflanzenproteome aufzutrennen, deshalb werden Proteome zunehmend in sogenannte Subproteome unterteilt (Cordewell et al., 2000; Jung et al., 2000). Bisher untersuchte Subproteome sind die der Zellwand, der Plasmamembran und der Thylakoide (Robertsson et al. 1997; Santoni et al., 1998, 2000; Peltier et al., 2000; Prime et al. 2000) sowie von Mitochondrien (Kruft et al., 2001). Das Subproteom „Mitochondrien“ bildet bei Arabidopsis 650 Spots im Bereich von pH 3-10 auf einzelnen 2D-IEF/ SDS-Gelen, bei variierten Bedingungen bis zu 800 Spots (Kruft et al., 2001); vorhergesagt wurden 2-3000 Proteine. Die Identifizierung der einzelnen Proteine erfolgte durch (I) Immunoblotting, (II) Proteinsequenzierung nach Edman und (III) Massenspektrometrie (MALDI). Mehr als 60 Proteine mit verschiedenen Funktionen konnten so identifiziert werden, die eine Rolle in folgenden Prozessen spielen: Respiration, Zitronensäurezyklus, Aminosäure- und Nucleotid-Metabolismus, Oxidationsschutz, mitochondriale Assemblierung, molekularer Transport und Proteinbiosynthese. Mehr als 20 % der identifizierten Proteine waren zuvor nicht in pflanzlichen Mitochondrien nachgewiesen worden, was die Vorhersage neuer Funktionen der Mitochondrien erlaubt. Die laufend aktualisierten Ergebnisse der Analyse des mitochondrialen Proteoms von Arabidopsis sind unter <http://www.gartenbau.uni-hannover.de/genetik/braun/AMPP> zu finden.

5.2.1 Analyse einzelner Proteinkomplexe mittels dreidimensionaler Gelelektrophorese

Das „Arabidopsis mitochondrial proteome project“ der Abteilung Angewandte Genetik der Universität Hannover (<http://www.gartenbau.uni-hannover.de/genetik/braun/AMPP>) dient der Untersuchung der Eigenheiten von pflanzlichen Mitochondrien. Das Subproteom

„Mitochondrien“ enthält 2-3000 Proteine. Die Auflösung auf den oben beschriebenen 2D-IEF/ SDS-Gelen ist aber nicht groß genug, um seltene und hydrophobe Proteine zu entdecken. Es werden nur maximal 800 Proteinspots getrennt. Zwei Drittel der mitochondrialen Proteine sind zu gering exprimiert, zu basisch, nicht anfärbbar, lassen sich nicht in der IEF auftrennen oder überlagern sich mit anderen Proteinen. Deshalb wurde im Rahmen der vorliegenden Dissertation eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, kleine definierte Untergruppen von Proteinen, die gut aufgetrennt werden können, zu untersuchen. Dabei wird das Subproteom Mitochondrien in weitere Sub-Subproteome auf der Basis von Proteinkomplexen unterteilt. Die sogenannte 3D-Gelelektrophorese (siehe 3.12 und Werhahn and Braun, 2002) beruht auf der Kombination von drei verschiedenen Gelelektrophorese-Methoden (BN-PAGE, IEF und SDS-PAGE). Dabei werden zunächst die Proteinkomplexe isolierter Mitochondrien mittels einer BN-PAGE aufgetrennt, dann werden einzelne Proteinkomplexe eluiert und mittels 2D-IEF/ SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Abb. 27). Diese Methode ermöglicht es, auf einem Gel einen Proteinkomplex mit allen seinen Untereinheiten und deren Isoformen darzustellen. Auch posttranslationelle Modifikationen der Untereinheiten werden dargestellt. Bei Arabidopsis und anderen Pflanzen ist dies besonders hilfreich, da das Auftreten von mehreren Isoformen eines Proteins eher die Regel als die Ausnahme ist. Der Vergleich der Spotmuster einzelner Proteinkomplexe mit dem Muster des mitochondrialen Gesamtproteoms ermöglicht die Identifizierung ganzer Subproteome auf einmal.

Ein weiterer Vorteil der 3D-PAGE ist, dass sich auch sehr hydrophobe Proteine, die sonst nur schwer oder gar nicht darstellen lassen, nachweisbar sind.

Hanson et al. entwickelten 2001 schon ein System, das sie 3D-Gelelektrophorese nannten. Sie benutzten als erste Dimension eine Saccharose-Dichtegradienten-Zentrifugation, entnahmen daraus Fraktionen, die dann mittels 2D-IEF/ SDS-PAGE aufgetrennt wurden. Als erste Dimension hat aber die BN-PAGE eine wesentlich höhere Auflösung als der Dichtegradient.

5.3 Charakterisierung der Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran von Arabidopsis

Wie in der Einleitung beschrieben, sind über 90 % der mitochondrialen Proteine kernkodiert, werden von cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und anschließend in die

Mitochondrien importiert (s. 2.2). Für die Erkennung der zu importierenden Proteine und den Transport durch die äußere Mitochondrienmembran ist die Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran (TOM) zuständig. Dieser Proteinkomplex wurde zuerst bei Pilzen beschrieben (s. 2.3). Der Holo-Komplex hat bei *Neurospora crassa* eine Größe von ~ 490 kDa (Künkele et al., 1998; Ahting et al., 1999) und bei *Saccharomyces cerevisiae* eine Größe von ~ 690 kDa (Dekker et al., 1998). Er besteht aus den Rezeptor-Proteinen TOM70 (bei *S. cerevisiae* auch noch TOM71/72), TOM22 und TOM20, dem porenbildenden Protein TOM40 und den mit diesem vergesellschafteten kleinen TOM-Proteinen TOM7, TOM6 und TOM5. Die Rezeptor-Proteine TOM70 und TOM20 sind nur lose mit dem Rest des Komplexes verbunden. Deshalb wird bei Pilzen und auch bei Säugetieren ein sogenannter Kern-Komplex von 400 bis 410 kDa, der weniger als 5 % der TOM70-Proteine und 5 % bis 20 % der TOM20-Proteine enthält (Dekker et al., 1998), auf zweidimensionalen BN/ SDS-Gelen weit häufiger gefunden (Dekker et al. 1996, Ahting et al., 1999, Suzuki et al., 2000, Meisinger et al., 2001) als der Holo-Komplex.

Der TOM-Komplex von Arabidopsis bildet auf zweidimensionalen BN/ SDS-Gelen eine Bande bei ~ 390 kDa, was in etwa der Größe der bekannten Kern-Komplexe entspricht. Ein größerer TOM-Komplex konnte nicht gefunden werden. Dies mag einerseits an den verwendeten Solubilisierungsbedingungen liegen – 5 % Digitonin bei Arabidopsis, 0,1 % bis 0,5 % Digitonin bei Pilzen – andererseits ist unklar, ob es einen solchen größeren Komplex bei Arabidopsis überhaupt gibt.

Der Holokomplex bei Pilzen besteht aus dem Kern-Komplex und den Rezeptoren. Bei Arabidopsis ist der einzige bekannte Rezeptor – TOM20 – schon im 390 kDa-Komplex enthalten; ein Homolog zu TOM70 ist bei Arabidopsis bislang unbekannt. Trotzdem der Arabidopsis TOM-Komplex das Rezeptor-Protein TOM20 enthält, hat er eine ähnliche Größe wie die rezeptorlosen Kern-Komplexe. Dies liegt daran, daß einige der Protein-Untereinheiten des Arabidopsis TOM-Komplexes kleiner sind als die entsprechenden Proteine bei Pilzen und Säugetieren: TOM40 (34 kDa) ist ca. 5 kDa kleiner als TOM40 von *S. cerevisiae* (42 kDa), *N. crassa* (38 kDa) und Ratte (38 kDa); TOM22 (10 kDa) ist ca. 7 kDa kleiner als TOM22 von *S. cerevisiae* (17 kDa), *N. crassa* (17 kDa) und Ratte (16 kDa). Der Größenunterschied kann aber nur bestimmt werden, wenn die Anzahl der einzelnen Proteine in einem Kern-Komplex bekannt ist. Laut Ahting et al. (1999) besteht der TOM Kern-Komplex von *N. crassa* aus 8 x TOM40 (4 Dimere), 4 x TOM22, 2 x TOM7, 2 x TOM6; TOM5 konnte nicht identifiziert werden. Auch andere Autoren geben ähnliche Stöchiometrien für den TOM Kern-Komplex

an: Laut Pfanner and Chacinska (2002) besteht der Kern-Komplex von Pilzen aus $\sim 6 - 8 \times$ TOM40, $\sim 3 - 4 \times$ TOM22 und \sim je $2 \times$ TOM7, TOM6 und TOM5; laut Dekker et al. (1998) aus $4 - 6 \times$ TOM40, $3 - 6$ TOM22 und je $2 - 4$ der kleinen TOM-Proteine (*S. cerevisiae*).

Die Unterschiede der Massen bei TOM40 und TOM22 summieren sich zu 60 kDa, wenn für den TOM-Komplex von Arabidopsis die gleiche Stöchiometrie angenommen wird wie für den von *N. crassa*. Da der Arabidopsis TOM-Komplex aber nur 20 kDa kleiner ist als der von *N. crassa* (410 kDa zu 390 kDa), besteht ein Rest von 40 kDa, der durch Anwesenheit von TOM20 ($2 \times$) im TOM-Komplex von Arabidopsis ausgeglichen wird. Mit $2 \times$ TOM20, die fest an den Komplex gebunden sind, entspricht der TOM-Komplex von Arabidopsis eher dem Holo-Komplex von *N. crassa*, der sich laut Rapaport (2002) aus $8 \times$ TOM40, $3-4 \times$ TOM22, $2 \times$ TOM20, $1,5 \times$ TOM70 und je $2 \times$ TOM7 und TOM6 zusammensetzt.

Ein zusätzlicher Subkomplex von ca. 100 kDa, der für Pflanzen noch nicht beschrieben wurde, besteht aus TOM40, TOM7 und mindestens einer der beiden kleinen TOM-Untereinheiten (s. Abb. 16). Bei Pilzen ist ein solcher Komplex bekannt (Dekker et al., 1998; Rapaport, 2002). Er besteht aus einem TOM40-Dimer und je ein bis zwei Molekülen von TOM7 und TOM5 (Rapaport, 2002). Dekker et al. (1998) entdeckten diesen Subkomplex in δ TOM6-Zelllinien. Da im Gegensatz zum 400 kDa Holo-Komplex auch TOM22 fehlt, definierten sie TOM6 als Assemblierungsfaktor für TOM22. Rapaport (2002) beschreibt den 100 kDa-Komplex als Zwischenschritt bei der Assemblierung eines neuen TOM-Komplexes bzw. beim Einbau neuer Untereinheiten in bestehende TOM-Komplexe. Da Rapaport (2002) berichtet, daß der Subkomplex nur in sehr geringen Mengen auftritt, kann angenommen werden, daß die in dieser Arbeit verwendeten Methoden sehr empfindlich sind. Ein weiterer Intermediatkomplex von 250 kDa – bestehend aus TOM40 und TOM5 – konnte nicht nachgewiesen werden.

5.3.1 Die Proteinuntereinheiten der Präproteintranslokase der äußeren Mitochondrienmembran von Arabidopsis

Da das Genom von Arabidopsis komplett sequenziert worden ist (The Arabidopsis Genom Initiative, 2000), konnten alle Primärsquenzen sämtlicher TOM-Untereinheiten von Arabidopsis bestimmt werden. Der TOM-Komplex von Arabidopsis enthält sechs verschiedene Proteintypen, die von 12 Genen kodiert werden, von denen mindestens 11 auch

exprimiert werden. Die Untereinheiten sind: TOM40 (2 Gene), TOM20 (4 Gene), TOM22 (2 Gene), TOM7 (2 Gene), TOM5/6a (1 Gen) und TOM5/6b (1 Gen) (siehe Tabelle 7 und Abb. 28). Für alle diese TOM-Proteine – mit Ausnahme von TOM7.2 – liegen entweder sequenzierte Peptide, EST's oder beides vor, wodurch ihre Expression bewiesen wird. Die Zusammensetzung des TOM-Komplexes ist damit bei allen Organismen (Pilzen, Säugetieren und Pflanzen) ähnlich. Der Kernkomplex aus TOM40, TOM22 und den drei kleinen TOM's interagiert bei Pilzen und Säugetieren dynamisch mit den Rezeptoren TOM20 und TOM70 (Ahting et al., 1999; Suzuki et al., 2000; Meisinger et al., 2001). Die Rezeptoren sind bei Pilzen (Dekker et al., 1998) und Tieren (Suzuki et al., 2002) nur lose mit dem Kernkomplex assoziiert (< 5 % TOM70, ~ 10 % TOM20), bei Pflanzen ist TOM20 dagegen recht stabil an den Kernkomplex gebunden.

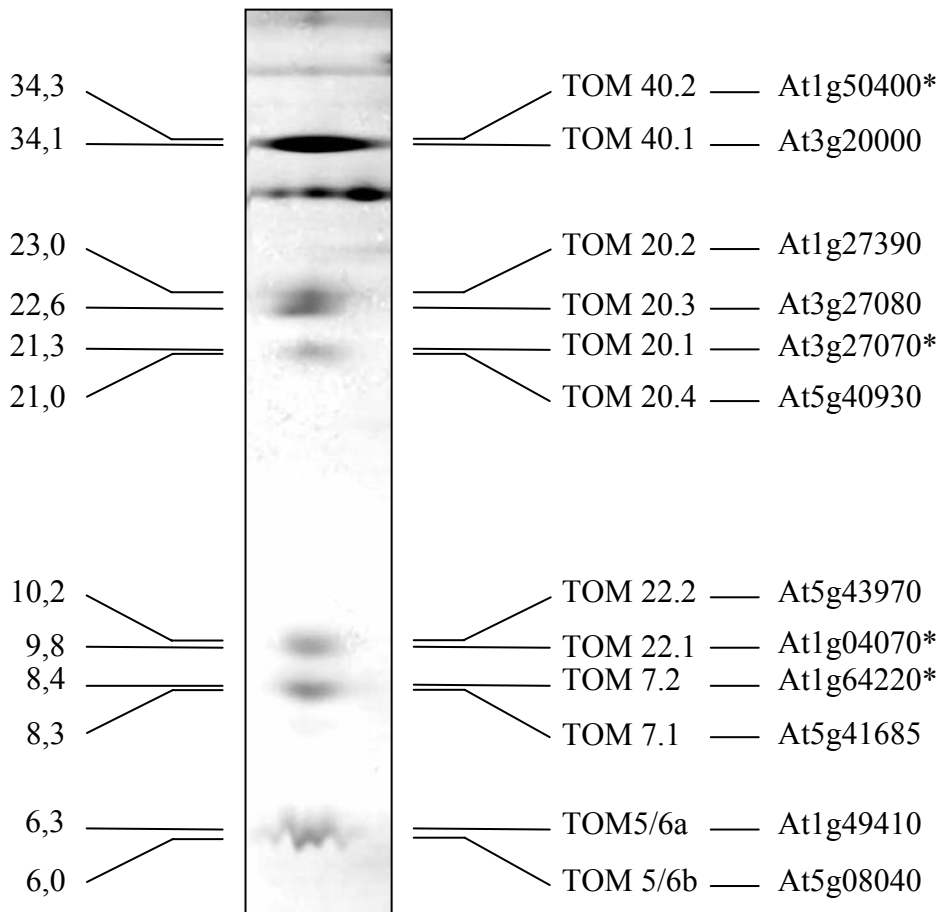


Abb. 28 Der TOM-Komplex von Arabidopsis

Äußere Mitochondrienmembranen von Arabidopsis wurden mittels zweidimensionaler BN/ SDS-PAGE analysiert. Das Gel wurde Coomassie colloidal gefärbt. Links vom Gel sind die genauen Massen aller TOM-Untereinheiten in kDa angegeben. Rechts des Geles werden die einzelnen TOM-Proteine identifiziert und ganz rechts stehen die zugehörigen protein entry codes am Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS). Proteine des TOM-Komplexes, die mit gelelektrophoretischen Methoden nicht nachgewiesen werden konnten, sind mit einem * markiert.

TOM70 ist auf 2D-BN-Gelen kein Bestandteil des TOM-Komplexes (Ahting et al., 1999; Meisinger et al., 2001). Es gibt keinen Beweis, daß es auch bei Pflanzen TOM70 gibt, aber es gibt Datenbankeinträge in Arabidopsis-Proteindatenbanken, die eine recht hohe Homologie zu TOM70 aufweisen (z.B. At1g12270, At4g12400, At1g62390, At5g20360). Dies deutet darauf hin, daß es TOM70 möglicherweise auch bei Pflanzen gibt, zumal ja TOM70 für die Erkennung von Präproteinen ohne N-terminale Leitsequenz wichtig ist. Ein Teil der Ähnlichkeiten ist aber auch auf die sieben TPR-Motive in den bekannten TOM70-Sequenzen zurückzuführen, die der Protein-Protein-Interaktion dienen und die recht weit verbreitet sind. Von den identifizierten TOM-Untereinheiten ist TOM20 die am wenigsten fest an den Komplex gebundene Untereinheit. Bei Kartoffel kann durch Streßbehandlung des TOM-Komplexes (Elektroelution mit 350 V für 4 bis 6 Stunden, statt mit 100 V für 16 Stunden) selektiv TOM20 vom Komplex abgetrennt werden. Der Rest-Komplex entspricht dem von Pilzen und Tieren bekannten Kernkomplex aus TOM40, TOM22 und den drei kleinen TOM's.

5.3.1.1 TOM40

TOM40 ist als porenbildendes Protein der zentrale Bestandteil des TOM-Komplexes (Meisinger et al., 2001). Strukturanalysen bei Pilzen zeigen, daß der TOM-Kernkomplex (400 kDa) aus TOM40, TOM22 und den drei kleinen TOM's zwei bis drei Poren bildet. Auch der intermediäre 100 kDa-Komplex aus TOM40, TOM7 und TOM5 bildet zwei Poren. Dies zeigt, daß TOM22 nicht an der Porenbildung beteiligt ist. Da die TOM5 und TOM7 recht klein sind und jeweils in nur zwei Kopien (s. 5.3) im Kernkomplex vorliegen, können sie nicht die eigentlichen porenbildenden Proteine sein, wohl aber zur Porenbildung beitragen. So bleibt als eigentliches porenbildendes Protein nur TOM40. TOM40 ist das einzige TOM-Protein, das nicht mittels α -Helices in der Membran verankert ist, sondern als β -Barrel in der Membran sitzt. Es besitzt keine cytoplasmatische Domäne, die von Proteinasen erkannt wird. Das 34 kDa Protein von Arabidopsis weist eine deutliche Sequenzhomologie (25 % - 28 %) zu bekannten TOM40 Proteinen auf (Abb.26; Werhahn et al., 2001).

5.3.1.2 TOM20

Für den TOM-Komplex von Pilzen sind bis zu 5 Rezeptorproteine beschrieben: TOM70 (Gratzer et al., 1995), TOM72 (eine Isoform von TOM70, die nur bei *S. cerevisiae* gefunden wurde (Schlossmann et al., 1996; Koh et al., 2001)), TOM37 (wahrscheinlich ist TOM37 ein cytoplasmatisches Protein, das mit TOM70 an der Membranaußenseite interagiert (Rehling et al., 2001) und somit kein Bestandteil des TOM-Komplexes), TOM22 und TOM20. Bei Pflanzen ist nur TOM20 als Rezeptor gesichert, TOM22 fehlt die saure cytoplasmatische Domäne, die Rezeptorfunktion haben soll (s. 5.3.1.3) und TOM70 ist noch nicht gefunden worden.

Der erste identifizierte pflanzliche TOM-Komplex ist der von Kartoffel (Heins and Schmitz, 1996); das TOM20-Homolog aus diesem Komplex weist nur geringe Sequenzidentität mit pilzlichen TOM20-Sequenzen auf, enthält aber zumindest das TPR-Motiv, das von anderen TOM20 bekannt ist. Da gegen dieses Protein gerichtete Antikörper den Proteinimport inhibieren, ist seine Funktion als Präproteinrezeptor bestätigt (Heins and Schmitz, 1996).

Bei Pilzen und Säugetieren interagiert TOM20 nur lose mit dem Kernkomplex (~ 10 % sind mit ihm assoziiert), bei Arabidopsis ist der Rezeptor wesentlich fester an den Komplex gebunden (s. oben). Auf BN-Gelen bildet TOM20 von *S. cerevisiae* nur dann gemeinsam mit dem Kernkomplex eine Bande, wenn zur Solubilisierung maximal 0,1 – 0,2 % Digitonin verwendet wird (Meisinger et al., 2001); bei Pflanzen dagegen läuft TOM20 selbst bei Verwendung von 5 % Digitonin noch mit dem Kernkomplex. Doch auch bei Pflanzen ist TOM20 die am wenigsten stabil mit dem Kernkomplex interagierende Proteinuntereinheit des TOM-Komplexes. Durch Streß kann TOM20 selektiv aus dem TOM-Komplex gelöst werden. Bei Arabidopsis wurden im Rahmen dieser Arbeit vier Formen von TOM20 gefunden (Tabelle 5 und Tabelle 6). Sie bilden in einem 2D-BN SDS-Gel 2 Banden mit 21 und 23 kDa (Abb. 19). TOM20 von Pilzen kommt dagegen nur in einer Form vor. Für drei dieser TOM20-Proteine sind auch Klone gefunden und sequenziert worden. Die Expression der vierten TOM20-Form wird durch die Existenz von EST's belegt. TOM20 von Arabidopsis ähnelt bekannten TOM20 Proteinen (~ 20 % Sequenzidentität mit TOM20 von Pilzen, ~ 50 % mit TOM20 von Kartoffel). Die Identität der TOM20-Formen von Arabidopsis untereinander ist nicht besonders groß (~ 50 %, siehe Abb.20), aber hinreichend, um die vier Proteine als Angehörige einer Proteinfamilie bezeichnen zu können. Ihre Sequenzidentität untereinander ist etwa so groß wie zu TOM20 von Kartoffel.

```

TOM20.1      .....MDKLNFFEEIRKDAEETYKLNPEADNLMRWGEALLELSQFQN
TOM20.3      MDT.ETEFDRILLFEQIRQDAENTYKSNPLDADNLRWGGVLELSQFHS
TOM20.4      MDM.QNENERLMVFEHARKVAEATYVKNPLDAENLRWAGALLELSQFQ.
TOM20.2      MEFSTADFERFIMFEHARKNSEAQYKNDPLDSENLLKWGGALLELSQFQ

TOM20.1      VIDSLKMIQDAISKLEDAILLIDPMKHDAVWCLGNAYTSYARLTPDDTQAR
TOM20.3      ISDAKQMIQEAITKFEEALLIDPKKDEAVWCIGNAYTSFAFLTPDETEAK
TOM20.4      .TEPKQMILEAILKLGEALVIDPKKHDALWLGNAHLSFGFLSSDQTEAS
TOM20.2      IPEAKMLNDAISKLEEALTINPGKHQALWCIANAYTAHAFYVHDPEEAK

TOM20.1      LNFGLAYLFFGIAVAQQPDNQVYHKSLEMADKAPQLHTGFHKNRLLS.LL
TOM20.3      HNFDLATQFFQQAVDEQPDNTHYLKSLEMTAKAPQLHAEAYKQGLGSQPM
TOM20.4      DNFEKASQFFQLAVEEQPESELYRKSRTLASKAPELHT.....
TOM20.2      EHFDKATEYFQRAENEDPGNDTYRKSLDSSLKAPELHMQFMNQGMGQQIIL

TOM20.1      GGVET.....LAIPSPKVVKNNKSSDEKYIVMGWVILAIQVAVACISFR
TOM20.3      GRVEA.....PAPSSKAVKNNKSSDAKYDAMGWVILAIQVAVAWISFA
TOM20.4      GGTAG.....PSSNSAKTMKQKKTSEFKYDVFQWVILASYVAVAWISFA
TOM20.2      GGGGGGGGGMASSNVQSQSKKKKRNTTEFTYDVCGWIIACGIVAVWVGM

TOM20.1      KLR.....
TOM20.3      KANVPVSPPR
TOM20.4      NSQTPVSRQ.
TOM20.2      KSLGPPPPAR

```

Abb. 29 Alignment der vier verschiedenen TOM20-Formen von Arabidopsis. Die Aminosäuren, die von den einzelnen Exons kodiert werden, sind farbig markiert (Exons 1, 3 und 5 rot und Exons 2, 4 und 6 blau). Das Alignment wurde mittels ClustalW erstellt. Gap penalties: -12/-2.

Antikörper gegen TOM20 von Kartoffel erkennen beide Banden im 2D-Gel und mindestens 3 Spots im 3D-Gel. Das Exon-Intron-Muster (6 Exons) der vier TOM20-Formen von Arabidopsis ist gut konserviert (s. Abb.29). Die Sequenzen sind in der N-terminalen Hälfte und am äußersten C-Terminus gut konserviert, aber sie haben eine hoch variable Glycinreiche Region in der C-terminalen Hälfte. Alle vier haben eine große cytoplasmatische Domäne am N-Terminus, die durch Trypsinierung intakter Mitochondrien abgedaut wird. Diese große cytoplasmatische Domäne ist eine weitere Bestätigung ihrer Rolle als Rezeptorprotein.

Die TOM20-Proteine von Arabidopsis und Kartoffel enthalten eine hydrophobe C-terminale Extension, die wahrscheinlich als Membrananker dient (siehe Abb. 21), TOM20 von Pilzen und Säugetieren sind im Gegensatz dazu am N-Terminus verankert (Schneider et al., 1991; Heins and Schmitz, 1996; Werhahn et al., 2001). Aufgrund aller dieser Unterschiede stellt sich die Frage, ob die pflanzlichen TOM20-Proteine wirklich Homologe der TOM20-Proteine von Pilzen und Säugetieren sind und von demselben Protein abstammen, oder ob sie Analoge sind und sich konvergent entwickelt haben.

TOM20.1 und TOM20.3 sind einander besonders ähnlich und sind beide auf Chromosom 1 als Tandem repeat kodiert. TOM20.2 liegt auf Chr. 2 und TOM20.4 auf Chr.5, wo auch noch eine Sequenz liegt, die ein TOM20-Pseudogen sein könnte (unvollständige TOM20-Sequenz).

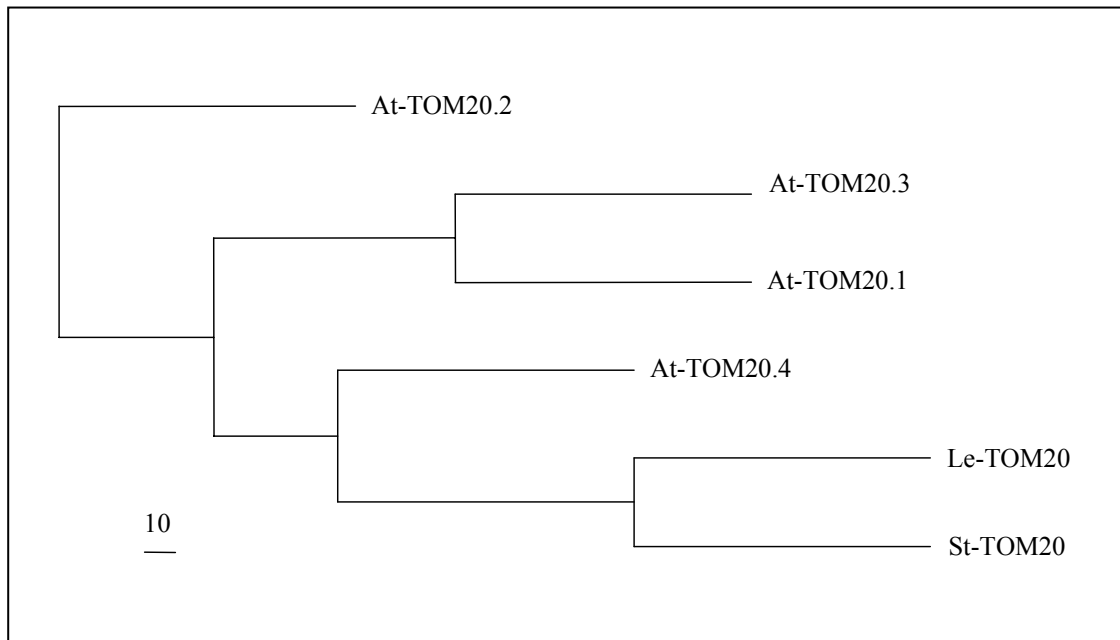


Abb. 30 Phylogramm der vier TOM20-Proteine von Arabidopsis (At) und der TOM20-Proteine von Kartoffel (St) und Tomate (Le). Das Alignment wurde mit ClustalW erstellt. Die Stammbaumanalyse wurde mit den Programmen SEQBOOT, PROTDIST, NEIGHBOR, CONSENSUS und DRAWGRAM aus dem Phylip-Programmpaket durchgeführt. Der Eichstrich unten links zeigt einen Bootstrap-Wert von 10 an.

Ein Stammbaum zeigt, daß TOM20.2, das viele Glycin-Reste enthält, den anderen TOM20-Proteinen am unähnlichsten ist (Abb. 30).

Auf dem 3D-Gel werden von Antikörpern gegen TOM20 von Kartoffel mehr als 4 Spots erkannt, was auf eventuelle posttranslationelle Modifikationen von TOM20 hinweist.

Die geringe Ähnlichkeit der TOM20-Proteine untereinander könnte auf Substratspezifität der einzelnen Formen hindeuten - mit TOM20.2 als einem besonders spezifischem Rezeptor. Es ist nicht bekannt, ob mehrere verschiedene TOM20-Formen gleichzeitig in einem Komplex vorkommen, oder ob sie gewebe- oder entwicklungsstadienspezifisch sind (das Fehlen von Peptiden für eine TOM20-Form bei Mitochondrien aus Arabidopsis-Suspensionkulturen könnte darauf hinweisen, daß dies zumindest für diese eine Form (TOM20.1) zutrifft). Bei Pflanzen ist die Spezifität der Präprotein-Rezeptoren besonders wichtig, weil es viele andere Organellen gibt (v.a. Chloroplasten), in die Proteine importiert werden. Kreuzimporte sind in vitro bekannt, wären aber in vivo sehr störend. Die Erkennung der Präproteine hängt nicht von der Aminosäuresequenz der Leitsequenz ab; wahrscheinlich wird die Sekundärstruktur der Leitsequenz (amphipatische Helix) erkannt (s. 2.2). Der genaue Mechanismus der Präproteinerkennung ist aber noch nicht geklärt.

5.3.1.3 TOM22

TOM22 wurde bei Pilzen als Präproteinrezeptor entdeckt, der Präproteine mit N-terminalen Leitsequenzen erkennt und über TOM5 an die Importpore weiterleitet. Außerdem soll TOM22 von *S. cerevisiae* auch die von TOM70 erkannten Präproteine ohne N-terminale Leitsequenz an die Importpore weiterleiten, sowie Präproteine im Intermembranraum binden und so - gemäß der Acid-Chain-Hypothese - zum Transport durch die Importpore beitragen. Zudem präsentiert TOM22 die Präproteine den kleinen TIM-Proteinen im Intermembranraum (van Wilpe et al., 1999) und spielt auch bei der Assemblierung des TOM-Komplexes eine wichtige Rolle. Bei Pflanzen schien dieses so wichtige Protein zu fehlen, bis Macasev et al., (2000) entdeckten, daß das 10 kDa-Protein im TOM-Komplex von Arabidopsis eine gewisse Homologie zu TOM22 von Pilzen aufweist. Im Rahmen dieser Dissertation wurden Peptide von diesem Protein hergestellt. In den Datenbanken wurden die zu diesen Peptiden passenden Proteine gefunden. Sie weisen eine geringe aber signifikante Homologie zu TOM22 von Pilzen und Säugetieren auf (siehe Abb. 23).

TOM22 von Arabidopsis ist nur halb so groß wie bekannte TOM22-Proteine; ihm fehlt die cytoplasmatische Domäne, die für die Bindung von Präproteinen wichtig sein soll. Diese Domäne ist reich an sauren Aminosäuren: 18 bei TOM22 von *S. cerevisiae*, 15 bei *N. crassa*, 19 beim Menschen und nur 2 bei Arabidopsis (s. Abb. 23).

Das Fehlen dieser Domäne stellt die Rezeptorfunktion von TOM22 zumindest in Pflanzen in Frage. Bei TOM22 von *N. crassa* hat eine Modifikation oder Deletion der sauren Domäne wenig oder keinen physiologischen Effekt (Nargang et al., 1998). Die Funktion der sauren Domäne bleibt somit unklar.

5.3.1.4 Die kleinen TOM-Proteine TOM5, TOM6 und TOM7

Bei Pilzen ist TOM5 ein integraler Bestandteil des Kern-Komplexes. Es wird vermutet, daß die von den Rezeptorproteinen erkannten Präproteine über TOM5 an die Importpore weitergeleitet werden. In Abwesenheit der Rezeptoren scheint TOM5 auch als Rezeptor zu dienen. TOM6 und TOM7 spielen möglicherweise antagonistische Rollen bei der Assemblierung des TOM-Komplexes und bei der Interaktion des Kern-Komplexes mit den Rezeptoren (Rapaport, 2002). Die Anwesenheit von TOM6 ist nötig, damit TOM22 sich mit

dem Kern-Komplex verbindet, der sonst nur TOM40, TOM7 und TOM5 enthält (Dekker et al., 1998). TOM6 von Pilzen weist nur in der C-terminalen Hälfte eine signifikante Homologie auf (Dembowski et al., 2001), dort befindet sich der Membrananker.

Die Identifizierung der kleinen TOM-Proteine von Arabidopsis als Entsprechungen von TOM5, TOM6 und TOM7 der Pilze ist nicht einfach. Das 8 kDa-Protein ähnelt stark TOM7 von *S. cerevisiae* und *N. crassa*, aber nur in der C-terminalen Hälfte, die N-terminale Hälfte zeigt nur geringe Sequenz-Homologie (siehe Abb. 24, Jansch et al., 1998). TOM7 von Pflanzen (Arabidopsis und Kartoffel) ist viel basischer als das von *S. cerevisiae* (12 und 11 Arg/Lys in Pflanzen gegenüber 4 Arg/Lys in *S. cerevisiae*).

Das 6,0 kDa-Protein weist eine gewisse Homologie zu TOM5 von *S. cerevisiae* auf (bis 17,5 % Sequenzidentität), aber auch zu TOM6 von *S. cerevisiae* (15 %) und *N. crassa* (bis 21 %) bestehen Homologien. Das 6,3 kDa-Protein dagegen ähnelt TOM5 weniger (14 %) und zeigt eine ähnliche Homologie zu TOM6 (23 % zu *S. cerevisiae* und 17 % zu *N. crassa*) wie das 6,0 kDa-Protein, was eine Zuordnung schwieriger macht. Untereinander haben die beiden kleinen TOM-Proteine von Arabidopsis eine Sequenzidentität von bis zu 15 %. TOM5 und TOM6 von *S. cerevisiae* sind sogar zu 21 % identisch (s. Abb. 25 und Abb. 26 und Tabelle 8).

Tabelle 8: Prozentuale Sequenz-Identität der TOM-Untereinheiten von verschiedenen Organismen*

	Nc/Sc	Nc/Hs	Sc/Hs	Nc/At	Sc/At	At/Hs	Ø
TOM 70	29	29	24	-	-	-	27
TOM 40	37	23	24	25	24	25	26
TOM 22	26	21	20	18	18	21	21
TOM 20	33	25	25	18	18	15	22
TOM 7	44	33	25	26	27	23	30
TOM 6 (TOM5/6a)	25	-	-	16	22	-	21
TOM 5 (TOM5/6b)	-	-	-	-	20	-	20
Ø	32	26	24	21	21	21	

*Berechnet mittels paarweiser Alignments mit "Align"

(<http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>). Gap penalties: -12/-2.

Nc: *Neurospora crassa*, Sc: *Saccharomyces cerevisiae*, Hs: *Homo sapiens*, At: *Arabidopsis thaliana*.

Wo Isoformen der TOM-Proteinen auftreten, wird der Mittelwert angegeben.

Es scheint eine Proteinfamilie der kleinen TOM-Proteine zu existieren. Da die beiden kleinen TOM-Proteine von Arabidopsis nicht eindeutig als Homologe zu TOM5 oder TOM6 identifiziert werden können, werden sie als TOM5/6a (6,3 kDa) und TOM5/6b (6,0 kDa) bezeichnet. Sowohl TOM5/6a als auch TOM5/6b sind bei Pflanzen recht konservierte

Proteine (s. Abb. 31 und Abb. 32). Es scheint Untergruppen der Proteine bei mono- und dicotylen Pflanzen zu geben.

Sc-TOM6	1	M	D	G	M	F	A	M	P	G	A	A	A	G	A	A	S	P	Q	Q	P	K	S	R	F	Q	A	F	K	E	S	P	L	32	
Sc-TOM5	1	M	F	G	L	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	P	Q	Q	E	V	S	E	E	E	K	R	A	H	Q	E	Q	20
Sc-TOM6	33	Y	T	I	A	L	N	G	A	F	F	V	A	G	V	A	F	I	Q	S	P	L	M	D	M	L	A	P	-	Q	L	61			
Sc-TOM5	21	T	E	K	T	L	K	Q	A	A	Y	V	A	A	F	L	W	V	-	S	P	M	I	W	H	L	V	K	K	Q	W	49			

A

At-6.0kDa	1	-	V	N	N	V	V	S	-	-	I	E	K	M	K	A	L	W	H	S	E	V	H	D	E	-	-	Q	K	W	A	V	N	27
At-6.3kDa	1	M	F	P	G	M	F	M	R	K	P	D	K	A	E	A	L	K	Q	L	R	T	H	V	A	L	F	G	S	W	V	V	I	32
At-6.0kDa	28	M	K	L	L	R	-	A	L	G	M	F	A	G	G	V	V	L	M	R	S	Y	G	D	L	M	G	V	53					
At-6.3kDa	33	I	R	A	A	P	Y	V	L	S	Y	F	S	D	S	K	D	E	L	K	-	-	-	-	I	D	F	54						

B

Abb. 31 TOM5 und TOM6 gehören möglicherweise einer Proteinfamilie an.

A: Alignment von Hefe TOM5 und Hefe TOM6. B: Alignment von TOM5/6b und TOM5/6a von Arabidopsis. Identische Aminosäuren sind grau unterlegt.

A

G.max	1	M	F	P	G	M	F	M	R	K	P	D	K	A	A	A	L	K	Q	L	K	S	H	A	A	M	F	G	A	W	V	V	V	32
M.truncatula	1	M	F	P	G	M	F	M	R	K	P	D	K	A	V	A	L	K	Q	L	K	S	H	V	A	M	F	G	T	W	V	L	V	32
G.hirsutum	1	M	F	P	G	M	F	M	R	K	P	D	K	A	A	A	L	K	Q	L	K	V	H	V	A	M	F	G	V	W	V	A	V	32
A.thaliana	1	M	F	P	G	M	F	M	R	K	P	D	K	A	E	A	L	K	Q	L	R	T	H	V	A	L	F	G	S	W	V	V	I	32
S.bicolor	1	M	F	L	G	A	V	P	R	R	P	S	K	E	A	A	Y	K	Q	L	R	S	H	L	V	I	M	A	S	C	A	A	V	32
Z.mays	1	M	F	L	G	S	L	P	R	R	P	S	K	E	A	A	Y	K	Q	L	R	S	H	I	I	I	M	A	S	C	A	A	V	32
S.cereale	1	M	F	L	G	A	M	S	R	K	P	S	K	E	A	A	Y	K	E	L	R	L	H	L	G	I	M	G	T	C	I	A	L	32
G.max	33	I	R	V	T	P	Y	V	L	H	F	L	S	T	E	K	-	-	E	E	L	K	L	E	L	54								
M.truncatula	33	I	R	I	T	P	Y	I	L	H	F	L	N	R	E	N	-	-	E	E	L	K	L	E	L	54								
G.hirsutum	33	V	R	V	T	P	Y	I	L	H	Y	L	S	D	E	K	-	-	E	E	L	K	I	E	F	54								
A.thaliana	33	I	R	A	A	P	Y	V	L	S	Y	F	S	D	S	K	-	-	D	E	L	K	I	D	F	54								
S.bicolor	33	I	R	A	A	P	Y	I	L	H	F	L	T	R	D	G	D	V	Q	E	L	K	L	E	L	56								
Z.mays	33	I	R	A	T	P	Y	I	L	H	F	L	A	R	D	G	D	I	Q	E	L	K	L	D	L	56								
S.cereale	33	I	R	A	A	P	Y	I	L	H	Y	F	T	L	E	P	G	M	T	E	L	K	L	E	L	56								

B

A.thaliana	1	-	M	V	N	N	V	V	S	I	E	K	M	K	A	L	W	H	S	E	V	H	D	E	Q	K	W	A	V	N	M	K	L	31
G.max	1	-	M	V	N	N	V	V	S	I	E	K	M	K	A	L	W	H	S	E	V	H	D	E	Q	K	W	A	V	N	M	K	L	31
G.hirsutum	1	-	M	A	D	T	V	I	S	L	D	K	L	K	A	F	W	N	S	Q	V	H	D	E	E	N	W	A	H	N	M	K	L	31
M.truncatula	1	-	M	A	D	S	I	F	S	I	Q	Y	L	K	N	F	I	S	Q	I	H	D	D	E	K	W	D	F	N	V	K	L	31	
H.vulgare	1	-	M	A	F	-	-	A	P	L	D	K	L	K	S	L	W	N	S	H	V	M	D	E	E	Q	W	A	V	N	Y	R	V	29
S.cereale	1	-	M	A	S	-	-	A	P	V	E	K	L	K	S	L	W	N	S	Q	V	M	D	E	E	Q	W	A	V	N	Y	R	V	29
Z.mays	1	M	A	A	S	-	-	S	A	V	E	K	L	K	V	L	W	D	S	Q	V	N	D	E	E	Q	W	A	L	N	Y	K	L	30
A.thaliana	32	L	R	A	L	G	M	F	A	G	G	V	V	L	M	R	S	Y	G	D	L	M	G	V	54									
G.max	32	L	R	A	L	G	M	F	A	G	G	V	V	L	M	R	S	Y	G	D	L	M	G	V	54									
G.hirsutum	32	L	R	A	V	G	L	F	A	G	S	I	L	L	M	R	N	Y	G	D	L	M	A	I	54									
M.truncatula	32	L	R	A	A	G	L	F	A	G	S	I	V	L	M	R	N	Y	G	D	L	M	A	I	54									
H.vulgare	30	L	K	A	T	G	I	F	A	G	S	I	F	L	M	R	N	F	G	D	L	M	V	I	52									
S.cereale	30	L	K	A	A	G	I	F	A	G	S	I	F	L	M	R	N	F	G	D	L	M	V	I	52									
Z.mays	31	L	K	A	A	G	L	F	A	G	S	I	F	L	M	R	N	F	G	D	L	M	A	I	53									

Abb. 32 Homologe Proteine zu TOM5/6a und TOM5/6b von Arabidopsis gibt es in vielen Pflanzen.

A: Alignment von Proteinen, die homolog zu TOM5/6a sind. B: Alignment von Proteinen, die homolog zu TOM5/6b sind. Aminosäuren, die in mindestens fünf Pflanzen konserviert sind, sind grau unterlegt. Die Sequenzen in A sind von: *Glycine max* (accession number: BE801620), *Gossypium hirsutum* (AW187040), *Medicago truncatula* (AL366883), *Secale cereale* (BF145769), *Sorghum bicolor* (BG933457), and *Zea mays* (BE518873). Die Sequenzen in B sind von: *Glycine max* (BE659142), *Gossypium hirsutum* (AW187930), *Hordeum vulgare* (BF256359), *Medicago truncatula* (BF636457), *Secale cereale* (BE587954) and *Zea mays* (BI097489).

5.3.2 Proteintransport durch die äußere Mitochondrienmembran

Lange Zeit dachte man, daß der Transport von Präproteinen durch die äußere Mitochondrienmembran der Acid chain Theorie (Komiya et al., 1988; Schatz, 1988) folgt. Sie postuliert, daß der Proteintransport über die äußere Mitochondrienmembran durch die Bindung positiver Präsequenzen an zunehmend negative Domänen des TOM-Komplexes erfolgt. Dabei sollen die Präproteine von TOM20 erkannt, über die cytosolische Domäne von TOM22 an TOM5 und schließlich an das porenbildende Protein TOM40 weitergereicht werden. Im Intermembranraum bindet das Präprotein dann wieder an TOM22, bevor es an den TIM-Komplex weitergereicht wird. Abe et al. (2000) haben jedoch herausgefunden, daß Präproteine eher durch hydrophobe Interaktion an TOM20 binden. Außerdem fehlt die negative cytoplasmatische Domäne von TOM22, die für die Acid Chain Hypothese wichtig ist. TOM22 von Arabidopsis ist deshalb auch nur etwa halb so groß wie TOM22 von anderen Organismen (siehe 5.3.1.3). Auch der Sequenz von TOM5/6b (einem möglichen Homolog zu TOM5) fehlen saure Aminosäuren-Reste. Insgesamt hat die Hefe *S. cerevisiae*, für die die Acid Chain Hypothese entwickelt wurde, viel mehr saure Reste als Arabidopsis (Tabelle 9).

Tabelle 9: Anzahl der sauren und basischen Aminosäurenreste der TOM-Untereinheiten von Hefe und Arabidopsis^{1,2}

	Hefe³		Arabidopsis	
	Asp & Glu	Arg & Lys	Asp & Glu	Arg & Lys
TOM40	35	29	36	32
TOM22	31	11	9	13
TOM20	24	22	26	21
TOM7	3	4	4	12
TOM6 / At TOM5/6b	3	3	6	8
TOM5 / At TOM5/6a	6	7	5	6
Σ	102	76	86	92
Δ	-26		+6	

¹Berechnet mit ProtParam bei <http://us.expasy.org/cgi-bin/protparam>

²Wo Isoformen einzelner Untereinheiten auftreten, sind Mittelwerte angegeben.

³Die Zahlen für TOM37 und TOM70 von Hefe sind in der Tabelle nicht aufgeführt, da entsprechende Untereinheiten von Arabidopsis nicht bekannt sind. Hefe TOM37 besteht aus 41 sauren und 41 basischen Resten; Hefe TOM70 besteht aus 101 sauren und 89 basischen Resten (dies steigert die Gesamtladung des TOM-Komplexes von Hefe auf -38).

Der TOM-Komplex von *S. cerevisiae* enthält 26 mehr saure als basische Reste (wenn die bei Arabidopsis fehlenden Proteine TOM37 und TOM70 nicht mitgerechnet werden, ansonsten ergibt sich eine Nettoladung von -38), der TOM-Komplex von Arabidopsis dagegen enthält mehr basische als saure Reste. Insgesamt scheint deshalb die Bindungsketten-Hypothese, nach der elektrostatische und hydrophobe Interaktionen des Präproteins mit dem TOM-Komplex zum Transport durch die äußere Mitochondrienmembran beitragen, plausibler (Rehling et al., 2001) als die Acid Chain Hypothese.

6 Literatur

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D. (2000) „Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20.” *Cell*, 100, 551-560.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. and Nussberger, S. (1999) „The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria.” *J. Cell Biol.*, 147, 959-968.
- Alconada, A., Kübrich, M., Moczko, M., Hönlinger, A. and Pfanner, N. (1995) „The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of proteins.“ *Mol. Cell Biol.*, 15, 6196-6205.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W. and Lipman, D.J. (1990) „Basic Local Alignment Search TOOL.“ *J. Mol. Biol.*, 215, 403-410.
- Andersson, B. and Anderson, J.M. (1985) „The chloroplast thylakoid membrane – isolation, subfractionation and purification of its supramolecular complexes.” In: Linskens, H.K., Jackson, J.F., eds. *Modern methods of plant analysis*, Vol. 1. Berlin: Springer-Verlag, 231-258.
- Arnon, D.I. (1949) „Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*.” *Plant Physiology*, 24, 1-5.
- Attardi, G. and Schatz, G. (1988) „The biogenesis of mitochondria.“ *Annu. Rev. Cell. Biol.*, 4, 289-333.
- Baker, A. and Schatz, G. (1987) „Sequences from a procaryotic genome or the mouse dihydrofolate gene can restore the import of a truncated precursor protein into yeast mitochondria.“ *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 3117-3121.
- Baker, K.P., Schaniel, A., Vestweber, D. and Schatz, G. (1990) „A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability.“ *Nature*, 348, 605-609.
- Beddoe, T. and Lithgow, T. (2002) „Delivery of nascent polypeptides to the mitochondrial surface.“ *Biochim. et Biophys. Acta*, 1592, 35-39.

- Berkemeyer, M., Scheibe, R. and Ocheretina, O. (1998) „A novel, non-redox-regulated NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L.” *J. Biol. Chem.*, 273, 27927-27933.
- Berkelman, T. and Stenstedt, T. (1998) „Principles and Methods.“ Amersham Pharmacia Biotech Inc.
- Bolliger, L., Deloche, O., Glick, B.S., Georgopoulos, C., Jenö, P., Kronidou, N., Horst, M., Morishima, N. and Schatz, G. (1994) „A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability.“ *EMBO J.*, 13, 1998-2006.
- Bömer, U., Rassow, J., Zufall, N., Pfanner, N., Meijer, M. and Maarse, A.C. (1996) „The preprotein translocase of the inner mitochondrial membrane: Evolutionary conservation of targeting and assembly of Tim17.“ *J. Mol. Biol.*, 262, 389-395.
- Boutry, M., Faber, A.-M., Charbonnier, M. and Briquet, M. (1984) „Microanalysis of plant mitochondrial protein synthesis products.“ *Plant Mol. Biol.*, 3, 445-452.
- Bradford, M.M. (1976) „A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.“ *Analytical Biochemistry*, 72, 248-254.
- Braun, H.P., Emmermann, M., Kruff, 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. (1995) „Are the core proteins of the mitochondrial bc(1) complex evolutionary relics of a processing protease?“ *TIBS*, 20, 171-175.
- Brennicke, A., Marchfelder, A. and Binder, S. (1999) „RNA editing.“ *FEMS Microbiol. Rev.*, 23, 297-316.
- Chaumont, F., de Castro Silva Filho, M., Thomas D., Leterme, S. and Boutry, M. (1994). „Truncated presequences of mitochondrial F1-ATPase beta subunit from *Nicotiana glauca* transport CAT and GUS proteins into mitochondria of transgenic tobacco.“ *Plant Molecular Biology*, 24, 631-641.
- Cheng, M.Y., Hartl, F.-U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L. and Horwich, A.L. (1989) „Mitochondrial heat shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria.“ *Nature*, 337, 620-625.

- Cordewell, S.J., Nouwens, A.S., Verrills, N.M., Basseal, D.J. and Walsh, B.J. (2000) „Subproteomics based upon protein cellular location and relative solubilities in conjunction with composite two-dimensional electrophoresis.“ *Electrophoresis*, 21, 1094-1103.
- Court, D.A., Nargang, F.E., Steiner, H., Hodges, R.S., Neupert, W. and Lill, R. (1996) „Role of the intermembrane-space domain of the preprotein receptor Tom22 in protein import into mitochondria.“ *Mol. Cell Biol.*, 16, 4035-4042.
- Day, D.A., Neuburger, M. and Douce, R. (1985) „Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from pea leaves.“ *Aust. J. Plant Physiol.*, 12, 219-228.
- de Duve, C. (1996) „Die Herkunft der komplexen Zellen.“ *Spektrum der Wissenschaft*, 6, 60-68.
- Dekker, P.J.T., Müller, H., Rassow, J. and Pfanner, N. (1996) „Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis.“ *Biol. Chem.*, 377, 535-538.
- Dekker, P.J.T., Ryan, M.T., Brix, J., Müller, H., Hönlinger, A. and Pfanner, N. (1998) „Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: Molecular dissection and assembly of the general import pore complex.“ *Mol. Cell. Biol.*, 18, 6515-6524.
- Dembowski, M., Künkele, K.-P., Nargang, F.E., Neupert, W. and Rapaport, D. (2001) „Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM Core Complex of *Neurospora crassa*.“ *J. Biol. Chem.*, 276 (21), 17679-17685.
- Devereau, J., Haeberli, P. and Smitjies, O. (1984) „A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX.“ *Nucl. Acids Res.*, 12, 387-395.
- Dietmeier, K., Hönlinger, A., Bömer, U., Dekker, P.J.T., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kübrich, M. and Pfanner, N. (1997) „TOM5 funktionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore.“ *Nature*, 388, 195-200.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. and Brunner, M. (2000) „Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes.“ *Cell*, 101, 401-412.
- Douce, R. (1985) „Mitochondria in higher plants: Structure, functions and biogenesis.“ Academic Press, Orlando, FL.

- Douce, R., Bourguignon, J., Brouquisse, R. and Neuburger, M. (1987) „Isolation of plant mitochondria. General principles and criteria of integrity.” *Methods in Enzymology*, 148, 403-415.
- Edman, P. (1950) „Method for the determination of amino acid sequences in peptides.“ *Acta Chem. Scand.*, 4, 283-293.
- Ellis, R.J. (1987) „Proteins as molecular chaperones.“ *Nature*, 328, 378-379.
- Ellis, R.J. (1994) „Roles of molecular chaperones in protein folding.“ *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 4, 117-122.
- Ellis, J.R. and Leech, R.M. (1985) „Cell size and chloroplast size in relation to chloroplast replication in light-grown wheat leaves.” *Planta*, 165, 120-125.
- Endo, T. and Kohda, D. (2002) „Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import.“ *Biochim. et Biophys. Acta*, 1592, 3-14.
- El Moulaj, B., Duyckaerts, C., Lamotte-Brasseur, J. and Sluse, F.E. (1997) „Phylogenetic classification of the mitochondrial carrier family of *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Yeast*, 13, 573-581.
- Fölsch, H., Guiard, B., Neupert, W. and Stuart, R.A. (1996) „Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria.“ *EMBO J.*, 15, 479-487.
- Gambill, B.D., Voos, B., Kang, P.J., Miao, B., Langer, T., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1993) „A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins.“ *J. Cell Biol.*, 123, 109-117.
- Glick, B.S. (1995) „Can hsp70 proteins act as force-generating motors?“ *Cell*, 80, 11-14.
- Glick, B.S. Beasley, E.M. and Schatz, G. (1992) „Protein sorting in mitochondria.“ *TIBS*, 17, 453-459.
- Görg, A., Obermaier, C., Boguth, G., Harder, A., Scheibe, B., Wildgruber, R. and Weiss, W. (2000) „The current state of two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients.“ *Electrophoresis*, 21, 1037-1053.
- 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.

- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R.E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S.D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G. and Horst, M. (1995) „Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria.“ *J. Cell Biol.*, 129, 25-34.
- 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.
- Hajek, P. and Bedwell, D.M. (1994) „Characterization of the mitochondrial binding and import properties of purified yeast F1-ATPase beta subunit precursor. Import requires external ATP.“ *J. Biol. Chem.*, 269, 7192-7200.
- Hanson, B.J., Schulenberg, B., Patton, W.F., Capaldi, R.A. (2001) „A novel subfractionation approach for mitochondrial proteins: a three-dimensional mitochondrial proteome map.“ *Electrophoresis*, 22, 950-959.
- Hartl, F.U. (1996) „Molecular chaperones in cellular protein folding.“ *Nature*, 381, 571-579.
- Haucke, V., Lithgow, T., Rospert, S., Hahne, K. and Schatz, G. (1995) „The yeast mitochondrial protein import receptor Mas20p binds precursor proteins through electrostatic interaction with the positively charged presequence.“ *J. Biol. Chem.*, 270, 5565-5570.
- Haucke, V., Horst, M., Schatz, G. and Lithgow, T. (1996) „The Mas20p and Mas70p subunits of the protein import receptor of yeast mitochondria interact via the tetratricopeptide repeat motif in Mas20p: Evidence for a single hetero-oligomeric receptor.“ *EMBO J.*, 15, 1231-1237.
- Hausmann, N., Werhahn, W., Huchzermeyer, B., Braun, H.P. and Papenbrock, J. (2003) „How to document the purity of mitochondria prepared from green tissue of tobacco, pea and *Arabidopsis thaliana*.“ *Phyton* 43, 215-229.
- Heins, L. and Schmitz, U.K. (1996) „A receptor for protein import into potato mitochondria.“ *Plant J.*, 9, 829-839.
- Herrmann, R.G., Westhoff, P. and Link, G. (1992) „Biogenesis of plastids in higher plants.“ In: Herrmann, R.G., ed. *Plant Gene Research: Cell Organelles*. Vienna: Springer Verlag, 275-49.

- Heukeshoven, J. and Dernick, R. (1988) „Improved silver staining procedure for fast staining in PhastSystem Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels.“ *Electrophoresis*, 9, 28-32.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. and Pfanner, N. (1998) „Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins.“ *Nature*, 395, 516-521.
- Hines, V. and Schatz, G. (1993) „Precursor binding to yeast mitochondria. A general role for the outer membrane protein Mas70p.“ *J. Biol. Chem.*, 268, 449-454.
- Hönlinger, A., Bömer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1996) „Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import.“ *EMBO J.*, 15, 2125-2137.
- Horst, M., Oppliger, W., Feifel, B., Schatz, G. and Glick, B.S. (1996) „The mitochondrial protein import motor: Dissociation of mitochondrial hsp70 from its membrane anchor requires ATP binding rather than ATP hydrolysis.“ *Protein Sci.*, 5, 759-767.
- Hoyt, D.W., Cyr, D.M., Gierasch, L.M. and Douglas, M.G. (1991) „Interaction of polypeptides corresponding to mitochondrial presequences with membranes.“ *J. Biol. Chem.*, 266, 21693-21699.
- 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 radioimmunesay antibodies.“ *Am. J. Clin. Pathol.*, 75, 734-738.
- Hunkapillar, M.W., Lujan, E., Olander, F. and Hood, L.E. (1983) "Isolation of Microgram Quantities of Proteins from Polyacrylamide Gels for Amino Acid Sequence Analysis," *Methods in Enzymology*, 91, 227-236.
- Hurkman, W.J. and Tanaka, C.K. (1986): „Solubilization of Plant Membrane Proteins for Analysis by Two-Dimensional Gel Electrophoresis.“ *Plant Physiol.*, 81, 802-806.
- Isaya, G., Miklos, D. and Rollins, R. (1994) „MIP1, a new yeast gene homologous to the rat mitochondrial intermedial peptidase gene, is required for oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*.“ *Mol. Cell. Biol.*, 14, 5603-5616.
- Jänsch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (1996) „New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria.“ *Plant J.*, 9, 357-368.

- Jänsch, L., Heins, L., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (1998) „The TOM complex from plant mitochondria.“ In: Proceedings of the international congress on plant mitochondria, Glaser, E. and Moller, I. M. (eds), Blackhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Jänsch, L., Kruft, V., Schmitz U.K. and Braun, H.P. (1998a) „Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants.“ J. Biol. Chem., 273, 17251-17257.
- Janska, H., Sarria, R., Woloszynska, M., Arrieta-Montiel, M. and Mackenzie, S.A. (1998) „Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility.“ The Plant Cell, 10, 1163-1180.
- John, P. and Whatley, F.R. (1975) „*Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion.“ Nature, 254, 495-498.
- Jordan, S.W. and Crohan, J.E. (1997) „A new metabolic link.“ J. Biol. Chem., 272, 17903-17906.
- Jung, E., Heller, M., Sanchez, J.C. and Hochstrasser, D.F. (2000) „Proteomics meets cell biology: the establishment of subcellular proteomes.“ Electrophoresis, 21, 3369-3377.
- Kalousek, F., Neupert, W., Omura, T., Schatz, G. and Schmitz, U.K. (1993) „Uniform nomenclature for the mitochondrial peptidases cleaving precursors of mitochondrial proteins.“ TIBS, 18, 249.
- Kassenbrock, C.K., Cao, W. and Douglas, M.G. (1993) „Genetic and biochemical characterization of ISP6, a small mitochondrial outer membrane protein associated with the protein translocation complex.“ EMBO J., 12, 3023-3034.
- Kiebler, M., Keil, P., Schneider, H., van der Klei, I.J., Pfanner, N. and Neupert, W. (1993) „The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore.“ Cell, 74, 483-492.
- Kirk, J.T.O. and Tilney-Bassett, R.A.E. (1978) „The Plastids.“ Amsterdam: Elsevier/North Holland, Biomedical Press.
- Koh, J.Y., Hajek, P. and Bedwell, D.M. (2001) „Overproduction of PDR3 suppresses import defects associated with a TOM70 null mutation by increasing the expression of OM72 in *Saccharomyces cerevisiae*.“ Mol. Cell. Biol., 21 (22), 7576-7586.

- Komiya, T., Rospert, S., Koehler, C., Looser, R., Schatz, G. and Mihara, K. (1988) „Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis.” *EMBO J.*, 17, 3886-3898.
- Kruft, V. (1992) „Vergleichende Untersuchung 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.
- Kruft, V., Eubel, H., Werhahn, W., Jansch, L. and Braun, H.P. (2001) „Proteomic approach to identify novel mitochondrial functions in *Arabidopsis thaliana*.“ *Plant Physiol.*, 127, 1694-1710.
- Kübrich, M., Dietmeier, K. and Pfanner, N. (1995) „Genetic and biochemical dissection of the mitochondrial protein-import machinery.“ *Curr. Genet.*, 27, 393-403.
- Kügler, M., Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (1997) „Analysis of the chloroplast protein complexes by blue-native polyacrylamide gelelectrophoresis.“ *Photosynthesis Research*, 53, 35-44.
- Kügler, M., Brumme, S., Jansch, L., Werhahn, W., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (1998) „Characterization of plant mitochondria by blue native polyacrylamide gelelectrophoresis (BN-PAGE).“ In: *Plant mitochondria: From gene to function*, 273-276, Moller, I.M., Gardeström, P., Glimelius, K. and Glaser, E. (eds), Blackhuys Publishers, Leiden, The Netherlands.
- Künkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. and Neupert, W. (1998) „The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria.“ *Cell*, 93 (6), 1009-1019.
- Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) „A simple method for displaying the hydropathic character of a protein.“ *J. Mol. Biol.*, 157 (1), 188-195.
- Lamb, J.R., Tugendreich, S. and Hieter, P. (1995) „Tetratricopeptide repeat interactions: to TPR or not to TPR?“ *TIBS*, 20, 257-259.

- Lamppa, G.K., Elliot, L.V. and Bendich, A.J. (1980) „Changes in chloroplast number during pea leaf development.” *Planta*, 148, 437-443.
- Lill, R., Nargang, F.E. and Neupert, W. (1996) „Biogenesis of mitochondrial proteins.“ *Curr. Opin. Cell Biol.*, 8, 505-512.
- Lottspeich, F. (1985) „High performance liquid chromatography in microsequencing.“ *Trends Anal. Chem.*, 4, 244-246.
- Lottspeich, F. (1999) „Proteome Analysis: A pathway to the functional analysis of proteins.“ *Angew. Chem. Int. Ed.*, 38, 2476-2492.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. (1951) „Protein measurement with the Folin phenol reagent.“ *J. Biol. Chem.*, 193, 265-275.
- Macasev, D., Newbigin, E., Whelan, J. and Lithgow, T. (2000) „How do plant mitochondria avoid importing chloroplast proteins? Components of the import apparatus Tom20 and Tom22 from Arabidopsis differ from their fungal counterparts.” *Plant Physiol.*, 123, 811-816.
- Mackenzie, S. and McIntosh, L. (1999) „Higher plant mitochondria.“ *The Plant Cell*, 11, 571-585.
- Manning-Krieg, U.C., Scherer, P.E. and Schatz, G. (1991) „Sequential action of mitochondrial chaperones in protein import into the matrix.“ *EMBO J.*, 10, 3273-3280.
- May, M.J. and Leaver, C.J. (1993) „Oxidative Stimulation of Glutathione Synthesis in Arabidopsis thaliana Suspension Cultures.“ *Plant Physiol.*, 103 (2), 621-627.
- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R. and Pfanner, N. (2001) „Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors.” *Mol. Cell Biol.*, 21, 2337-2348.
- Meyer, Y., Grosset, J., Chartier, Y. and Cleyet-Marel, J.-C. (1988) „Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: Antibodies against proteins whose synthesis is reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts.“ *Electrophoresis*, 9, 704-712.

- Mihara, K. and Sato, R. (1985) „Molecular cloning and sequencing of cDNA for yeast porin, an outer mitochondrial membrane protein: a search for targeting signal in the primary structure.“ *EMBO J.*, 4, 769-774.
- Millar, A.H., Liddell, A. and Leaver, C.J. (2001) „Isolation and subfractionation of mitochondria from plants.“ *Methods in Cell Biology*, 65, 53-74.
- Mitchell, P. (1961) „Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism.“ *Nature*, 191, 144-148.
- Nargang, F.E., Rapaport, D., Ritzel, R.G., Neupert, W. and Lill, R. (1998) „Role of the negative charges in the cytosolic domain of TOM22 in the import of precursor proteins into mitochondria.“ *Mol Cell Biol.*, 18, 3173-3181.
- Nash, D. and Wiskich, J.T. (1983) „Properties of substantially chlorophyll-free pea leaf mitochondria prepared by sucrose density gradient separation.“ *Plant Physiology*, 71, 627-634.
- Naylor, D.J., Ryan, M.T., Condon, R., Hoogenraad, N.J. and Hoj, P.B. (1995) „Affinity-purification and identification of GrpE homologues from mammalian mitochondria.“ *Biochim. Biophys. Acta*, 1248, 75-79.
- 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.“ *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 217, 312-323.
- Neupert, W. (1997) „Protein import into mitochondria.“ *Annu. Rev. Biochem.*, 66, 863-917.
- Neupert, W., Hartl, F.-U., Craig, E.A. and Pfanner, N. (1990) „How do polypeptides cross the mitochondrial membranes?“ *Cell*, 63, 447-450.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W. and Brunner, M. (2002) „The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation.“ *EMBO J.*, 21 (14), 3659-3671.
- Ostermann, J., Horwich, A.L., Neupert, W. and Hartl, F.-U. (1989) „Protein folding in mitochondria requires complex formation with hsp60 and ATP hydrolysis.“ *Nature*, 341, 125-130.
- Pearson, W.R. and Lipman, D.J. (1988) „Improved tools for biological sequence comparison.“ *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 85, 2444-2448.

- Peltier, J.B., Friso, G., Kalume, D.E., Roepstorff, P., Nilsson, F., Adamska, I. and van Wijk, K.J. (2000) „Proteomics of the chloroplast: systematic identification and targeting analysis of lumenal and peripheral thylakoid proteins.“ *The Plant Cell*, 12, 319-341.
- Pfanner, N., Hoeben, P., Tropschug, M. and Neupert, W. (1987) „The carboxy-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation.“ *J. Biol. Chem.*, 262, 14851-14854.
- Pfanner, N., Craig, E.A. and Meijer, M. (1994) „The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane.“ *TIBS*, 19, 368-372.
- Pfanner, N., Douglas, M.G., Endo, T., Hoogenraad, N.J., Jensen, R.E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz, U.K. and Shore, G.C. (1996) „Uniform nomenclature for the transport machinery of the mitochondrial membranes.“ *TIBS*, 21, 51-52.
- Pfanner, N. and Meijer, M. (1997) „The TOM and TIM machine.“ *Curr. Biol.*, 7, 100-103.
- Pfanner, N. and Chacinska, A. (2002) „The mitochondrial import machinery: preprotein-conducting channels with binding sites for presequences.“ *Biochim. et Biophys. Acta*, 1592, 15-24.
- Prime, T.A., Sherrier, D.J., Mahon, P., Packman, L.C. and Dupree, P. (2000) „A proteomic analysis of organelles from *Arabidopsis thaliana*.“ *Electrophoresis*, 21, 3488-3499.
- Pyke, K.A. (1999) „Plastid division and development.“ *Plant Cell*, 11, 549-556.
- Raghavendra, A.S., Reumann, S. and Heldt, H.W. (1998) „Participation of mitochondrial metabolism in photorespiration.“ *Plant Physiol.*, 116, 1333-1337.
- Rapaport, D. (2002) „Biogenesis of the mitochondrial TOM complex.“ *TIBS*, 27 (4), 191-197.
- Rapaport, T.A., Jungnickel, B. and Kutay, U. (1996) „Protein transport across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial inner membranes.“ *Annu. Rev. Biochem.*, 65, 271-303.
- Rasmusson, A.G., Svensson, A.S., Knoop, V., Grohmann, L. and Brennicke, A. (1999) „Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria.“ *Plant J.*, 20, 79-87.

- Rassow, J., Guiard, B., Wienhues, U., Herzog, V., Hartl, F.U. and Neupert, W. (1989) „Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites.“ *J. Cell Biol.*, 109, 1421-1428.
- Rassow, J., Hartl, F.-U., Guiard, B., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) „Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state.“ *FEBS Lett.*, 275, 190-194.
- Rassow, J., Maarse, A.C., Krainer, E., Kübrich, M. and Müller, H. (1994) „Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44.“ *J. Cell Biol.*, 127, 1547-1556.
- Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N. and Truscott, K.N. (2001) „The mitochondrial import machinery for preproteins.“ *Critic. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, 36, 291-336.
- Robertson, D., Mitchell, G.P., Gilroy, J.S., Gerrish, C., Bolwell, G.P. and Slabas, A.R. (1997) „Differential extraction and protein sequencing reveals major differences in patterns of primary cell wall proteins from higher plants.“ *J. Biol. Chem.*, 272, 15841-15848.
- Rospert, S., Looser, R., Dubaquié, Y., Matouschek, A., Glick, B.S. and Schatz, G. (1996) „Hsp60-independent protein folding in the matrix of yeast mitochondria.“ *EMBO J.*, 15, 764-774.
- Ryan, M.T. and Pfanner, N. (1998) „The preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane.“ *Biol. Chem.*, 279, 289-294.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) „Molecular Cloning: a laboratory manual.“ Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, Second Edition.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulsen, A.R. (1977) „DNA sequencing with chain-termination inhibitors.“ *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 74, 5463-5467.
- Santoni, V., Rouquié, D., Doumas, P., Mansion, M., Boutry, M., Degand, H., Dupree, P., Packman, L., Sherrier, J., Prime, T., Bauw, G., Posada, E., Rouzé, P., Dehais, P., Sahnoun, I., Barlier, I. and Rossignol, M. (1998) „Use of a proteome strategy for tagging proteins present at the plasma membrane.“ *Plant J.*, 16, 633-641.
- Santoni, V., Kieffer, S., Desclaux, D., Masson, F. and Rabilloud, T. (2000) „Membrane proteomics: use of additive main effects with multiplicative interaction model to classify plasma membrane proteins according to their solubility and electrophoretic properties.“ *Electrophoresis*, 21, 3329-3344.

- Schägger, H. (1995) „Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes.“ *Methods in Enzymology*, 260, 190-202.
- Schägger, H. (2001) „Blue-native gels to isolate protein complexes from mitochondria.“ *Methods in Cell Biology*, 65, 231-244.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) „Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa.“ *Anal. Biochem.*, 166, 368-379.
- Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) „Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.“ *Anal. Biochem.*, 199, 223-231.
- Schatz, G. (1987) „Signals guiding proteins to their correct locations in mitochondria.“ *Eur. J. Biochem.*, 165, 1-6.
- Schatz, G. (1988) „Just follow the acid chain.“ *Nature*, 388, 121-122.
- Schatz, G. (1993) „The protein import machinery of mitochondria.“ *Protein Sci.*, 2, 141-146.
- Schlossmann, J., Lill, R., Neupert, W. and Court, D.A. (1996) „Tom71, a novel homologue of the mitochondrial preprotein receptor Tom70.“ *J. Biol. Chem.*, 271, 17890-17895.
- Schneider, H., Söllner, T., Dietmeier, K., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Trulzsch, B., Neupert, W. and Pfanner, N. (1991) „Targeting of the master receptor MOM19 to mitochondria.“ *Science*, 254, 1659-1662.
- Schneider, H.C., Berthold, J., Bauer, M.F., Dietmeier, K., Guiard, B., Brunner, M. and Neupert, W. (1994) „Mitochondrial hsp70/MIM44 complex facilitates protein import.“ *Nature*, 371, 768-774.
- Schneider, R., Brors, B., Massow, M. and Weis, H. (1997) „Mitochondrial fatty acid synthesis: a relic of endosymbiotic origin and a specialized means for respiration.“ *FEBS Lett.*, 407, 249-252.
- Schwartz, R.M. and Dayhoff, M.O. (1978) „Origins of prokaryotes, eukaryotes, mitochondria and chloroplasts.“ *Science*, 199, 395-403.
- Söllner, T., Pfaller, R., Griffiths, G., Pfanner, N. and Neupert, W. (1990) „A mitochondrial receptor for the ADP/ATP carrier.“ *Cell*, 62, 107-109.

- Söllner, T., Rassow, J., Wiedmann, M., Schlossmann, J., Keil, P., Neupert, W. and Pfanner, N. (1992) „Mapping of the protein import machinery in the mitochondrial outer membrane by crosslinking of translocation intermediates.“ *Nature*, 355, 84-87.
- Stoscheck, C.M. (1990) „Guide to protein purification.“ *Methods in Enzymology*, 182, 50-68.
- Stuart, R.A., Cyr, D.M., Craig, E.A. and Neupert, W. (1994) „Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation.“ *TIBS*, 19, 87-92.
- Stuart, R.A. and Neupert, W. (1996) „Topogenesis of inner membrane proteins of mitochondria.“ *TIBS*, 21, 261-267.
- Suzuki, H., Okazawa, Y., Komiya, T., Saeki, K., Mekada, E., Kitada, S., Ito, A. and Mihara, K. (2000) „Characterization of rat TOM40, a central component of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane.“ *J Biol Chem.*, 275, 37930-37936.
- Suzuki, H., Maeda, M. and Mihara, K. (2002) „Characterization of rat TOM70 as a receptor of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane.“ *J. Cell Science*, 115, 1895-1905.
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000) „Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*.“ *Nature*, 408, 796-815.
- Thiellement, H., Bahrman, N., Damerval, C., Plomion, C., Rossignol, M., Santoni, V., Vienne, D. and Zivy, M. (1999) „Proteomics for genetic and physiological studies in plants.“ *Electrophoresis*, 20, 2013-2026.
- 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.
- Tsugita, A., and Kamo, M. (1999) „2-D electrophoresis of plant proteins.“ *Methods in Molecular Biology*, 112, 95-97.
- Ungermann, C., Neupert, W. and Cyr, D.M. (1994) „The role of hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria.“ *Science*, 266, 1250-1253.
- Unsold, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P. and Brennicke, A. (1997) „The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366924 nucleotides.“ *Nature Genetics*, 15, 57-61.

- Vanlerberghe, G.C. and McIntosh, L. (1997) „Alternative oxidase: from gene to function. Annu. Rev. Plant Physiol.“ Plant Mol. Biol., 48, 703-734.
- van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J.T., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Hönlinger, A. and Pfanner N. (1999) „Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase.” Nature, 401, 485-489.
- von Heijne, G. (1990) „Protein targeting signals.“ Curr. Opin. Cell. Biol., 2, 604-608.
- Voos, W., Gambill, B.D., Guiard, B., Pfanner, N. and Craig, E.A. (1993) „Presequence and mature part of preproteins strongly influence the dependence of mitochondrial protein import on heat shock protein 70 in the matrix.“ J. Cell Biol., 123, 119-126.
- Wachter, C., Schatz, G. and Glick, B.S. (1994) „Protein import into mitochondria: the requirement for external ATP is precursor-specific whereas intramitochondrial ATP is universally needed for translocation into the matrix.“ Mol. Biol. Cell, 5, 465-474.
- Werhahn, W., Niemeyer, A., Jansch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K. and Braun, H.P. (2001) „Purification and characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from *Arabidopsis thaliana*: identification of multiple forms of TOM20.“ Plant Physiol., 125, 943-954.
- Werhahn, W. and Braun, H.P. (2002) „Biochemical dissection of the mitochondrial proteome from *Arabidopsis thaliana* by three-dimensional gel electrophoresis.“ Electrophoresis, 23 (4), 640-646.
- Werhahn, W., Jansch, L. and Braun, H.-P. (2003) “Identification of novel subunits of the TOM complex from *Arabidopsis thaliana*.” Plant Physiol. Biochem. 41, 407-416.
- Westermann, B., Prip-Buus, C., Neupert, W. and Schwarz, E. (1995) „The role of the GrpE homologue, Mge1p, in mediating protein import and protein folding in mitochondria.“ EMBO J., 14, 3452-3460.
- Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. and Deisenhofer, J. (1997) „Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria.“ Science, 277, 60-66.
- Zardeneta, G. and Horowitz, P.M. (1992) „Analysis of the perturbation of phospholipid model membranes by rhodanese and its presequence.“ J. Biol. Chem., 267, 24193-24198.

7 Anhang

Abkürzungen der Aminosäuren

<i>Aminosäuren</i>	<i>3-Buchstaben-Code</i>	<i>Ein-Buchstaben-Code</i>
u n p o l a r e A m i n o s ä u r e n		
Alanin	Ala	A
Glycin	Gly	G
Leucin	Leu	L
Isoleucin	Ile	I
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Tryptophan	Trp	W
Valin	Val	V
p o l a r e A m i n o s ä u r e n		
Asparagin	Asn	N
Glutamin	Gln	Q
Cystein	Cys	C
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tyrosin	Tyr	Y
p o s i t i v g e l a d e n e A m i n o s ä u r e n		
Arginin	Arg	R
Histidin	His	H
Lysin	Lys	K
n e g a t i v g e l a d e n e A m i n o s ä u r e n		
Asparaginsäure	Asp	D
Glutaminsäure	Glu	E

Glossar

Alignment	Ausrichtung von homologen Aminosäuresequenzen gemäß ihrer Identität
Blotten	Transferieren von Molekülen von Gelen auf Filterträger
Eluat	Gemisch von Proteinen und Proteinkomplexen, das bei der Elektroelution aus einem Gel isoliert wird
EST	Ansequenzierter cDNA-Klon
Screening	Durchsuchen einer Genbank
Spot	angefärbte Proteinbande in einer Gelmatrix oder auf einem Filterträger

Abkürzungen

2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
ACA	Aminocaprinsäure
ADP	Adenosindiphosphat
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCA	„Bicinchinonic Acid“
BN	„Blue Native“
BSA	„Bovine Serum Albumin“
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-dimethyl-ammonio]-1-propane sulfonate
Coomassie Blue	Coomassie Brillantblau G250
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Aminosäuresequenz
DAB	Diamino-Benzidin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	DL-Dithiothreitol; 1,4 Dimercaptobutan-2,3-Diol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycoltetraacetat
EST	„Expressed Sequence Tag“

EtOH	Ethanol
FeS-Protein	Eisenschwefel-Protein
GIP	„General Insertion Pore“
H ₂ O-bidest.	zweimal destilliertes Wasser
HPLC	„High Performance Liquid Chromatography“
HSP	„Heat Shock Protein“
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IEP	Isoelektrischer Punkt
IM	„Inner Membrane“
IMS	„Inter Membrane Space“
kDa	Kilodalton
Lys-C	<i>Lysobacter enzymogenes</i> Protease
MALDI-TOF MS	„Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization/ Time of Flight Mass Spectrometry“
MetOH	Methanol
MIP	„Mitochondrial Intermediate Protease“
MPP	„Matrix Processing Peptidase“
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MS	Massenspektrometrie
mt	mitochondrial(e)
MW	Molekulargewicht
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus einer Aminosäuresequenz
OM	„Outer Membrane“
P _i	Anorganisches Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	„rounds per minute“
RT	Raumtemperatur / 20°C
SDS	Natriumdodecylsulfonat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TIM	„Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane“

TOM	„Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane“
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TTBS	„Tris-Tween Buffer System“
UE	Untereinheit
xg	x-faches der Erdbeschleunigung

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1	Mitochondrium, Schema	5
Abb. 2	Der Proteinimport-Apparat pflanzlicher Mitochondrien.	9
Abb. 3	Schematischer Vergleich des TOM-Komplexes von <i>S. cerevisiae</i> und <i>A. thaliana</i> .	14
Abb. 4	Vergleich der Untereinheitenzusammensetzung von Proteinkomplexen aus Chloroplasten und Mitochondrien von Arabidopsis.	54
Abb. 5	Schematische Darstellung organellarer Proteinkomplexe nach Auftrennung mittels zweidimensionaler BN/SDS-PAGE.	55
Abb. 6	Dokumentation der Reinheit mitochondrialer Fraktionen aus grünem Gewebe (Blätter und Stengel) von Arabidopsis-Pflanzen.	56
Abb. 7	Dokumentation der Reinheit der Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von Erbse und Tabak isoliert wurden.	57
Abb. 8	Dokumentation der Reinheit der Mitochondrien, die aus grünem Gewebe von Arabidopsis isoliert wurden.	58
Abb. 9	Auftrennung der mitochondrialen Protein-Komplexe von <i>Arabidopsis thaliana</i> aus nicht-grüner Suspensions-Zellkultur mittels zweidimensionaler BN/SDS-PAGE.	60
Abb. 10	Zweidimensionale Auftrennung mitochondrialer Proteine von Arabidopsis-Mitochondrien aus nicht-grünen Suspensions-Zellkulturen	61
Abb. 11	Vergleich der Proteinkomplexe des mitochondrialen Gesamtproteoms mit den Proteinkomplexen der äußeren Mitochondrienmembran nach zweidimensionaler Auftrennung mittels BN/ SDS-PAGE.	63

Abb. 12	Vergleich des Proteoms von Arabidopsis Mitochondrien (A) und äußeren Mitochondrienmembranen (B) aus nicht-grünen Zellkulturen nach Auftrennung mittels zweidimensionaler IEF/ SDS-PAGE.	64
Abb. 13	Schematische Darstellung der 3D-PAGE.	67
Abb. 14	Charakterisierung mitochondrialer Proteinkomplexe von Arabidopsis mittels dreidimensionaler Gelelektrophorese.	68
Abb. 15	Bestimmung der Größe der TOM-Komplexes.	72
Abb. 16	Subkomplexe des TOM-Komplexes.	73
Abb. 17	Trypsinierung intakter Mitochondrien verursacht Degradation des TOM-Komplexes.	74
Abb. 18	Alignment der TOM40 Sequenzen von verschiedenen Organismen.	77
Abb. 19	Immunologische Identifizierung von TOM20.	78
Abb. 20	Alignment der vier TOM20 Sequenzen von Arabidopsis und der TOM20 Sequenz von Kartoffel.	80
Abb. 21	Vergleich der Hydrophobizitätsprofile der TOM20 Sequenzen von Arabidopsis und Kartoffel.	81
Abb. 22	Auftrennung der multiplen Formen von TOM20 von Arabidopsis.	82
Abb. 23	Vergleich der Sequenzen und der Hydrophobizitätsprofile der beiden TOM22-Proteine von Arabidopsis mit denen der TOM22-Proteine von <i>N. crassa</i> , der Hefe <i>S. cerevisiae</i> und des Menschen.	84
Abb. 24	Vergleich der Sequenzen und der Hydrophobizitätsprofile der beiden TOM7-Proteine von Arabidopsis mit denen der TOM22-Proteine der Hefe <i>S. cerevisiae</i> und der Kartoffel.	85
Abb. 25	Vergleich der Sequenz und des Hydrophobizitätsprofiles von At1g49410 (At-6,3 kDa) mit denen von TOM5 und TOM6-Proteinen von <i>S. cerevisiae</i> (Sc) und <i>N. crassa</i> .	86
Abb. 26	Vergleich der Sequenz und des Hydrophobizitätsprofiles von At5g08040 (At-6,0 kDa) mit denen von TOM5- und TOM6-Proteinen von <i>S. cerevisiae</i> und <i>N. crassa</i> .	87
Abb. 27	Der TOM-Komplex von Arabidopsis	88
Abb. 28	Der TOM-Komplex von Arabidopsis mit protein entry codes.	96
Abb. 29	Alignment der vier verschiedenen TOM20-Formen von Arabidopsis mit Exon-Grenzen.	99

Abb. 30	Phylogramm der vier TOM20 Proteine von Arabidopsis und der TOM20 Proteine von Kartoffel und Tomate.	100
Abb. 31	TOM5 und TOM6 gehören möglicherweise einer Proteinfamilie an.	103
Abb. 32	Homologe Proteine zu TOM5/6a Und TOM5/6b von Arabidopsis.	103

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1	Schwellungspuffervolumen in Abhängigkeit von der Mitochondrienmenge	28
Tab. 2	Biochemische und physiologische Charakterisierung mitochondrialer Fraktionen, die aus grünem Pflanzengewebe aufgereinigt wurden.	52
Tab. 3	Proteine der inneren Mitochondrienmembran, die nach dreidimensionaler Gelelektrophorese identifiziert wurden	69
Tab. 4	Peptide der Untereinheiten des TOM-Komplexes	76
Tab. 5	Klone, die für die TOM20-Formen von Arabidopsis thaliana kodieren	79
Tab. 6	Eigenschaften der TOM20-Proteine von Arabidopsis thaliana	80
Tab. 7	Die Untereinheiten des TOM-Komplexes von Arabidopsis	89
Tab. 8	Prozentuale Sequenz-Identität der TOM-Untereinheiten von verschiedenen Organismen	102
Tab. 9	Anzahl der sauren und basischen Aminosäurenreste der TOM-Untereinheiten von Hefe und Arabidopsis1	104

Lebenslauf

Name: Werhahn
Vorname: Wolf-Hubertus Conrad
Geburtsdatum und Ort: 28. Juli 1971 in Hannover
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1978 – 1982 Grundschule Mariensee
 1982 – 1984 Orientierungsstufe Süd in Neustadt am Rübenberge
 1984 – 1991 Gymnasium Neustadt
 Juni 1991 Abitur

Bundeswehr:

1991 – 1993 Soldat auf Zeit, letzter Dienstgrad Fähnrich (ROA)
 Juli 1994 Beförderung zum Leutnant der Reserve
 September 2001 Beförderung zum Oberleutnant der Reserve

Studium:

1993 – 1998 Studium der Biologie an der Universität Hannover
 1997 – 1998 Diplomarbeit in der Abteilung Angewandte Genetik der Universität Hannover zum Thema: „Charakterisierung der Präprotein-Translokase der äußeren Mitochondrienmembran von Arabidopsis thaliana.“
 Juli 1998 Abschluß des Studiums als Diplom-Biologe
 1998 – 2002 Doktorarbeit in der Abteilung Angewandte Genetik der Universität Hannover zum Thema: „Biochemische Charakterisierung von mitochondrialen Teilproteomen und Proteinkomplexen in Pflanzen“
 2000 – 2002 Promotionsstipendium der Universität Hannover