

**Cytochrom *c*-Oxidase-Untereinheit 2:  
mitochondrialer Import und proteolytische Reifung  
eines pflanzlichen Proteins in der Bäckerhefe  
(*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen)**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
des Fachbereiches Biologie  
der Universität Hamburg

vorgelegt von  
**Svenja Regina Qualmann**

Hamburg  
2003

Genehmigt vom  
Fachbereich Biologie der  
Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. E. PRATJE  
Weitere Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. M. BÖTTGER

Tag der Disputation: 11. April 2003

Hamburg, den 19. März 2003



A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Frühwald".

Professor Dr. A. Frühwald  
Dekan

*Das echte Rätsel der Welt ist das Sichtbare,  
nicht das Unsichtbare*

Oscar Wilde

## **Veröffentlichungen von Teilen dieser Dissertation**

Daley DO, Adams K, Clifton R, Qualmann S, Millar AH, Palmer JD, Pratje E, Whelan J (2002). Gene transfer from mitochondrion to the nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2  
Plant J. 30, 11-21

Qualmann SR, Daley DO, Whelan J, Pratje E (2003). Import pathway of nuclear encoded cytochrome *c* oxidase subunit 2 using yeast as a model  
eingereicht

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Einleitung</b> .....  | 1  |
| 1.1 Hefe als Modellorganismus für die Biogenese der Mitochondrien.....  | 1  |
| 1.2 Funktion und Aufbau der Mitochondrien.....  | 2  |
| 1.3 Entwicklung von Mitochondrien.....  | 4  |
| 1.4 Reduktion des mitochondrialen Genoms.....   | 4  |
| 1.5 Import von Proteinen in Mitochondrien.....  | 6  |
| 1.6 Prozessierung der Leitsequenzen und Sortierung mitochondrialer Proteine.....                                | 10 |
| 1.7 Assemblierung der mitochondrialen Komplexe.....   | 14 |
| 1.8 Mitochondriale AAA Proteasen.....   | 15 |
| 1.9 Zielsetzung.....  | 17 |
| <br>  |    |
| <b>2. Material und Methoden</b> .....   | 18 |
| <b>2.1 Material</b> .....   | 18 |
| 2.1.1 Geräte.....   | 18 |
| 2.1.2 Stämme und Kulturbedingungen.....   | 19 |
| 2.1.2.1 <i>Escherichia coli</i> .....   | 19 |
| 2.1.2.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....   | 19 |
| 2.1.2.3 <i>Glycine max</i> L.....   | 20 |
| 2.1.3 Medien.....   | 20 |
| 2.1.3.1 Medien für <i>Escherichia coli</i> .....  | 20 |
| 2.1.3.2 Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....  | 21 |
| 2.1.4 Plasmide.....   | 22 |
| 2.1.5 Oligonukleotid-Primer.....  | 23 |
| 2.1.5.1 Primer zur Amplifikation von GmCOX2.....  | 23 |
| 2.1.5.2 Primer zum Austausch des letzten Teils der GmCox2 Leitsequenz<br>LS3 gegen die Hefe Präsequenz pSc..... | 23 |
| 2.1.5.3 Primer zur Klonierung von Gm <sub>136</sub> GFP.....  | 23 |
| 2.1.5.4 Primer zur Klonierung von Gm <sub>126</sub> Sc <sub>15</sub> GFP.....                                   | 23 |
| 2.1.5.5 Primer zur Klonierung von Gm <sub>136</sub> TM1GFP und Gm <sub>126</sub> Sc <sub>15</sub> TM1GFP.....   | 23 |
| 2.1.5.6 Primer zur Amplifikation von ScCOX2.....  | 23 |
| 2.1.6 Antikörper.....   | 24 |
| 2.1.7 Chemikalien.....  | 24 |
| <b>2.2 Methoden</b> .....   | 25 |
| 2.2.1 Kulturführung.....  | 25 |
| 2.2.2 DNA-Standardmethoden.....   | 25 |
| 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....  | 25 |
| 2.2.3.1 Amplifikation von GmCOX.....  | 26 |
| 2.2.3.2 Amplifikation von ScCOX2.....   | 26 |
| 2.2.3.3 Austausch des letzten Teils der GmCOX2 Leitsequenz gegen<br>die Hefe COX2 Präsequenz.....               | 26 |
| 2.2.3.4 Klonierung des Konstruktes Gm <sub>136</sub> GFP.....   | 27 |
| 2.2.3.5 Klonierung des Konstruktes Gm <sub>126</sub> Sc <sub>15</sub> GFP.....                                  | 28 |
| 2.2.3.6 Herstellung des Konstruktes Gm <sub>136</sub> TM1GFP.....   | 28 |
| 2.2.3.7 Herstellung des Konstruktes Gm <sub>126</sub> Sc <sub>15</sub> TM1GFP.....                              | 28 |
| 2.2.4 DNA-Sequenzierung.....  | 29 |
| 2.2.5 Hefetransformation.....   | 29 |
| 2.2.6 Gesamt-RNA Isolation und „Northern-Blot“.....   | 30 |

|            |   |           |
|------------|---|-----------|
| 2.2.6.1    | Herstellung der DIG markierten LSCox2 Sonde.....  | 30        |
| 2.2.7      | Mitochondrienisolation aus Hefe.....  | 30        |
| 2.2.7.1    | Zellaufschluss mit Glasperlen.....  | 30        |
| 2.2.7.2    | Enzymatischer Zellaufschluss.....   | 31        |
| 2.2.8      | Quantifizierung mitochondrialer Proteine.....   | 31        |
| 2.2.9      | Mitochondrienisolation aus Sojabohne.....   | 32        |
| 2.2.10     | Fraktionierung isolierter Mitochondrien.....  | 32        |
| 2.2.11     | SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE).....   | 33        |
| 2.2.12     | Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D PAGE).....  | 33        |
| 2.2.13     | Proteintransfer auf Nitrozellulose („Western Blot“)......   | 34        |
| 2.2.14     | Ponceau-Färbung von Proteinen.....  | 34        |
| 2.2.15     | Immunodetektion von Proteinen.....  | 34        |
| 2.2.16     | Coomassie Färbung.....  | 34        |
| 2.2.17     | Kolloidale Coomassie Färbung.....   | 35        |
| 2.2.18     | <i>In vitro</i> Transkription/Translation.....  | 35        |
| 2.2.19     | <i>In vitro</i> Import in isolierte Mitochondrien.....  | 35        |
| <b>3.</b>  | <b>Ergebnisse.....</b>  | <b>36</b> |
| <b>3.1</b> | <b>Untersuchungen zur Prozessierung der Leitsequenz des GmCox2 Proteins in Hefe.....</b>  | <b>36</b> |
| 3.1.1      | Vergleich der Prozessierung von GmCox2 bei Import in Mitochondrien der Sojabohne und der Hefe.....  | 36        |
|            |   | 37        |
| 3.1.2      | Expression des GmCOX2 Gens in Hefe.....   | 40        |
| 3.1.3      | Komplementationsanalyse von GmCox2 in Hefe.....   | 40        |
| 3.1.4      | Nachweis des GmCox2 Proteins in Hefemitochondrien.....  | 42        |
| 3.1.5      | Austausch der Präsequenzen im GmCOX2 Gen.....   | 44        |
| 3.1.6      | Komplementationsanalyse von Gm <sub>126</sub> Sc <sub>15</sub> Cox2 in Hefe.....  | 45        |
| 3.1.7      | Nachweis von Gm <sub>126</sub> Sc <sub>15</sub> Cox2 in Hefemitochondrien.....  | 47        |
| 3.1.8      | <i>in vitro</i> Import der GmCox2 Konstrukte in Hefe Mitochondrien.....   | 51        |
| <b>3.2</b> | <b>Untersuchungen zur Prozessierung von GFP Fusionsproteinen.....</b>   | <b>51</b> |
| 3.2.1      | Klonierung der GFP Fusionskonstrukte.....   | 53        |
| 3.2.2      | Prozessierung der GFP Konstrukte .....  | 53        |
| 3.2.2.1    | Vergleich der Prozessierung der GFP Konstrukte <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....   |           |
| 3.2.2.2    | Einfluss der Präsequenz und der erten Transmembrandomäne auf die Prozessierung der GFP Konstrukte <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....            | 55        |
|            |   | 58        |
| 3.2.3      | Untersuchungen zur mitochondrialen Lokalisation der GFP Fragmente.....  |           |
| 3.2.4      | Untersuchungen zur Beteiligung der Mitochondrialen Prozessierungspeptidase MPP an der Prozessierung der GFP Konstrukte.....                           | 60        |
| 3.2.5      | Untersuchungen zur Beteiligung der Innermembran Peptidase IMP an der Prozessierung der GFP Konstrukte.....  | 64        |
| 3.2.6      | Untersuchungen zur Beteiligung von Oxa1 am Transport der GFP Konstrukte durch die innere Membran.....   | 66        |
| 3.2.7      | Untersuchungen zur Beteiligung der mAAA Proteaseuntereinheiten Yta10 und Yta12 und des Proteins Pcp1 an der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz..... | 67        |
| <b>3.3</b> | <b>Charakterisierung der Prozessierungsstellen in der Leitsequenz von GmCox2.....</b>   | <b>70</b> |
| 3.3.1      | Auftrennung der Gm <sub>126</sub> Sc <sub>15</sub> GFP Mitochondrien in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese.....                                | 70        |
|            |   | 74        |

|   |    |
|---|----|
| 3.3.2 Theoretische Analyse der I <sub>1</sub> und I <sub>2</sub> Intermediate von Gm <sub>126</sub> Sc <sub>15</sub> GFP..... | 76 |
| <b>4. Diskussion</b> .....  | 77 |
| 4.1 Hefe als Modellsystem zur Untersuchung der Prozessierung eines kernkodierten pflanzlichen Proteins.....                   | 77 |
| 4.2 Die GmCox2 Transmembrandomäne 1 ist notwendig für die Prozessierung zum reifen Protein.....                               | 79 |
| 4.3 Identifizierung der an der Drei-Stufen Prozessierung beteiligten Proteasen.....   | 84 |
| 4.4 Innermitochondrialer Transport der Leitsequenz-GFP Konstrukte.....  | 86 |
| 4.5 Modell zum Import und zur Prozessierung von GmCox2.....   | 89 |
| <b>5. Zusammenfassung</b> .....   | 91 |
| <b>6. Literatur</b> .....   | 91 |

## Abkürzungsverzeichnis

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Abb.                           | Abbildung  |
| ADP                            | Adenosindiphosphat   |
| Amp                            | Ampicillin   |
| AS                             | Aminosäure   |
| ATP                            | Adenosintriphosphat  |
| bp                             | Basenpaare   |
| ca.                            | circa  |
| Ci                             | Curie  |
| CSDP                           | 3-(4-methoxyspiro {1,2-dioxethan-3,2'-<br>(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1 <sup>3,7</sup> ]decan}-4-yl)Phenyl-phosphat |
| Cyt                            | Cytochrom  |
| Dig                            | Digitonin  |
| 2D                             | zweidimensional  |
| Da                             | Dalton   |
| DNA                            | Desoxyribonukleinsäure   |
| dNTP                           | Desoxy-Nukleotid   |
| EDTA                           | Ethylendiamintetraessigsäure   |
| FAD                            | Flavin-Adenin-Dinukleotid  |
| FMN                            | Flavinmononukleotid  |
| GIP                            | Generelle Importpore   |
| Glu                            | Glutaminsäure  |
| kb                             | Kilobasenpaare   |
| I <sub>1</sub> /I <sub>2</sub> | erstes/zweites Intermediat   |
| IEF                            | Isoelektrische Fokussierung  |
| IM                             | innere mitochondriale Membran  |
| IMS                            | Intermembranraum   |
| IMP                            | Innermembran Peptidase   |
| incl.                          | inclusive  |
| IPTG                           | Isopropyl-β-D-thiogalactosid   |
| LS                             | Leitsequenz  |
| lt.                            | laut   |
| M                              | Matrix   |
| M                              | Mitochondrien  |

|              |   |
|--------------|---|
| m            | reifes Protein                                    |
| MIP          | Mitochondriale Intermediatpeptidase               |
| MOPS         | $\gamma$ -Morpholino-propansulfonsäure            |
| mRNA         | messenger Ribonucleinsäure                        |
| MP           | Mitoplasten                                       |
| MPP          | Mitochondriale Prozessierungspeptidase            |
| MW           | Molekulargewicht                                  |
| N            | Niederschlag                                      |
| NADH         | Nicotinamid-adenin-dinucleotid-Hydrat             |
| NaOH         | Natriumhydroxid                                   |
| OM           | äußere mitochondriale Membran                     |
| P            | Vorstufenprotein                                  |
| PAGE         | Polyacrylamid-Gelelektrophorese                   |
| PCR          | Polymerase Ketten Reaktion                        |
| PEG          | Polyethylenglycol                                 |
| pI           | Isoelektrischer Punkt                             |
| PMSF         | Phenylmethylsulfonylfluorid                       |
| PK           | Proteinase K                                      |
| rpm          | Umdrehungen pro Minute                            |
| RT           | Raumtemperatur                                    |
| S            | Sojabohne   |
| s.           | siehe   |
| SDS          | Natriumdodecylsulfat                              |
| TIM          | Translokase der inneren Mitochondrien-Membran     |
| TM           | Transmembrandomäne                                |
| TOM          | Translokase der äußeren Mitochondrien-Membran     |
| Tris         | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                  |
| Triton X-100 | Octyl Phenoxy Polyethoxyethanol                   |
| ts           | temperatursensitiv                                |
| U            | Enzymaktivität                                    |
| Ü            | Überstand   |
| ura          | Uracil  |
| Wt           | Wildtyp   |
| X-Gal        | 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- $\beta$ -D-Galactosid |

Y                      Hefe  
z. B.                  zum Beispiel

Aminosäuren werden nach dem Einbuchstaben-Code bezeichnet. Gewichts- und andere Einheiten sind nach dem internationalen SI-System benannt.

Wildtypallele sind mit kursiven Großbuchstaben, Mutantallele mit kursiven Kleinbuchstaben geschrieben.

Bei Proteinen ist der erste Buchstabe groß geschrieben, teilweise sind Proteine zusätzlich durch ein nachgestelltes „p“ gekennzeichnet.

## 1. Einleitung

### 1.1 Hefe als Modellorganismus für die Biogenese der Mitochondrien

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* ist ein einzelliger Eukaryont. Die Vermehrung der Hefezellen erfolgt entweder vegetativ durch Knospung oder geschlechtlich durch das Verschmelzen zweier haploider Zellen der Paarungstypen a und  $\alpha$  zu einer diploiden Zygote. Die diploide Zygote bildet durch Knospung wiederum diploide Tochterzellen oder erzeugt nach einer Meiose vier Ascosporen, die zu haploiden Zellen beider Paarungstypen auswachsen.

Freilebende haploide Hefezellen sind in der Lage, ihren Paarungstyp autonom zu wechseln und bilden dadurch bevorzugt diploide Zellen. Bei den im Labor verwendeten Zellen ist der Genort, der für einen solchen Paarungstypwechsel verantwortlich ist, ausgeschaltet. Dadurch wird gewährleistet, dass die Zellen eine stabile Haploidie besitzen.

Für den Einsatz von Hefe in der Molekulargenetik sind vor allem die haploiden Zellen von Bedeutung, da bei diesen Zellen rezessive Genmutationen phänotypisch exprimiert werden.

Hefezellen sind in flüssigen Kulturen oder auf Agarplatten leicht zu kultivieren. Mit einer Generationszeit von ca. 2 Stunden vermehren sich die Organismen relativ schnell.

Die Hefe ist ein fakultativ anaerober Organismus, Hefezellen sind deshalb befähigt, Glukose zu Alkohol zu vergären. Hefe eignet sich besonders gut für die Untersuchung der an der mitochondrialen Atmung beteiligten Proteine, da Zellen mit einem Atmungsdefekt zwar nicht in der Lage sind, auf Medien zu wachsen, die unfermentierbare Kohlenstoffquellen wie Glycerin oder Ethanol enthalten, jedoch auf Glukosemedium wachsen können.

Hefe war der erste eukaryotische Organismus, dessen Genom vollständig durchsequenziert wurde (DUJON 1996).

Die Biogenese der Mitochondrien wurde bei der Hefe besonders gut analysiert. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass molekularbiologische Techniken, wie Transformation der Zellen und eine gezielte Gendisruption es ermöglichen, Mutanten einfach zu isolieren.

Funktion und Aufbau der Mitochondrien sind in allen Organismen weitgehend gleich und auch der Import von Proteinen in Mitochondrien aus verschiedenen Organismen läuft vergleichbar ab. So kann ein Protein mit einer mitochondrialen Leitsequenz der Hefe in pflanzliche Mitochondrien importiert werden (SCHMITZ UND LONSDALE 1989). Einige

mitochondriale Proteine der Pflanze, wie z.B. das Protein Oxa1, wurden durch eine funktionelle Komplementation von Hefe Mutanten identifiziert (HAMEL et al. 1997).

### *1.2 Funktion und Aufbau der Mitochondrien*

Mitochondrien sind Organellen eukaryotischer Zellen. Ihre Hauptfunktion besteht in der Bereitstellung von Energie- und Reduktionsäquivalenten für die Zelle, die durch den Citratzyklus und die mitochondriale Atmungskette in Form von ATP und NADH gebildet werden.

Die Mitochondrien sind im Cytoplasma der Zelle lokalisiert und werden von zwei Membranen umschlossen. Daraus ergeben sich vier mitochondriale Kompartimente: Die äussere (OM) und die innere mitochondriale Membran (IM), der Intermembranraum (IMS) und die Matrix (M). Die innere Membran ist stark eingefaltet und bildet sogenannte Cristae. Die IM ist Sitz der Atmungskettenkomplexe.

Mitochondrien besitzen in der Matrix mehrere zumeist ringförmige DNA Moleküle, die Gene für einige mitochondriale Proteine enthalten. Die Größen der DNA Moleküle und die Zahl der darauf kodierten Gene variieren stark von Organismus zu Organismus.

Die mitochondriale Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran besteht bei nahezu allen Organismen aus fünf Proteinkomplexen.

Komplex I, die NADH-Ubichinon-Reduktase, besitzt Flavinmononucleotid (FMN) als prosthetische Gruppe und besteht aus Eisen/Schwefel Proteinen. Der Komplex reduziert NADH<sub>2</sub> und überträgt dabei zwei H<sup>+</sup> Ionen auf FMN. Vom FMNH<sub>2</sub> wird Ubichinon zu Ubihydrochinon reduziert. In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist der Komplex I nicht vorhanden (SCHÄGGER 2002, GRIVELL 1995).

Komplex II der Atmungskette, die Succinat-Ubichinon-Reduktase, ist als Dimer katalytisch aktiv (ROBINSON UND LEMIRE 1995, SCHÄGGER 2002, SCHÄGGER UND PFEIFFER 2000). Der Komplex reduziert das im Citratzyklus anfallende Succinat und überträgt die Elektronen über Flavin-Adenin-Dinucleotid (FAD) und einen Eisen/Schwefel Cluster auf das Ubichinon.

Komplex III, die Ubichinon-Cytochrome *c* Reduktase, wird auch als *bc<sub>1</sub>* Komplex bezeichnet (TZAGOLOFF 1995). Dieser Komplex liegt als Dimer vor, jedes Monomer besteht aus mehreren Untereinheiten (SCHÄGGER UND JAGOW 1991, SCHÄGGER UND PFEIFFER 2000, SCHÄGGER 2002, TRUMPOWER 1990). Komplex III enthält zwei Cytochrome vom Typ *b*, einen Eisen/Schwefel Cluster und Cytochrom *c<sub>1</sub>*. Er reduziert Ubihydrochinon und oxidiert

Cytochrom *c*, welches wiederum die Elektronen auf den Komplex IV überträgt. Komplex III transportiert Protonen aus der Matrix über die innere Membran in den IMS und trägt damit zum Aufbau eines Membranpotentials über der IM bei.

Komplex IV, die Cytochrom *c* Oxidase, katalysiert die Übertragung der Elektronen vom Cytochrom *c* auf molekularen Sauerstoff. Wie vom Komplex III werden auch dabei Protonen über die IM in den IMS transportiert (BABCOCK UND WIKSTRÖM 1992).

Komplex IV der Hefe besteht aus 11 Untereinheiten (GEIER et al. 1995, SCHÄGGER UND PFEIFFER 2000). Drei dieser Untereinheiten, Cox1, Cox2 und Cox3 sind mitochondrial kodiert, die Gene aller anderen Untereinheiten sind im Zellkern lokalisiert (BONITZ et al. 1980, CORUZZI UND TZAGOLOFF 1979, FOX 1979, THALENFELD UND TZAGOLOFF 1980). Die drei großen mitochondrial kodierten Untereinheiten bilden das katalytische Zentrum des Enzyms (CAPALDI 1990). Cox1 enthält Häm a, Häm a<sub>3</sub> und Cu<sub>B</sub>, Cox2 enthält Cu<sub>A</sub> und bildet im Komplex den Bindungspartner für Cytochrom *c* (CAPALDI 1990, IWATA et al. 1995, TSUKIHARA et al. 1996).

Wie bereits erwähnt, werden während des Transportes der Elektronen entlang der Atmungskette von einigen Komplexen Protonen aus der Matrix in den IMS transportiert und dabei ein Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) über der Membran aufgebaut. Bei der oxidativen Phosphorylierung wird die Energie, die in diesem Protonengradienten enthalten ist, zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat verwendet. Die Bildung des ATP wird von der ATP-Synthase (Komplex V) katalysiert (LAW et al. 1995). Der Komplex besteht aus insgesamt 11 Untereinheiten (LAW et al. 1995) und kann in drei funktionelle Subkomplexe unterteilt werden: Der hydrophile katalytische F<sub>1</sub> Sektor ist über den F<sub>0</sub> Sektor mit der IM verankert. Der F<sub>0</sub> Sektor stellt den Protonenkanal in der Membran dar (MACINO UND TZAGOLOFF 1980). Dieser Subkomplex besteht aus den drei hydrophoben Untereinheiten 6, 8 und 9. Den dritten Subkomplex stellt der F<sub>A</sub> Sektor dar. Dieser Komplex koppelt funktionell die beiden anderen Subkomplexe (LAW et al. 1995).

Insgesamt bestehen die fünf Komplexe der mitochondrialen Atmungskette aus ungefähr 80 Proteinuntereinheiten, von denen etwa 15 mitochondrial kodiert sind. Die Gene aller anderen Untereinheiten sind im Zellkern lokalisiert.

Bei den verschiedenen Organismen weicht die Protein Zusammensetzung der Atmungsketten Komplexe voneinander ab.

### 1.3 Entwicklung von Mitochondrien

Der seriellen Endosymbiontentheorie gemäß, einer Erweiterung der von MARGULIS 1970 formulierten Endosymbiontentheorie, stammen Mitochondrien phylogenetisch von Bakterienzellen ab (TAYLOR 1974). Diese Bakterien wurden von einer sehr ursprünglichen Wirtszelle, die eventuell bereits einen Zellkern und ein Cytoskelett enthielt, umschlossen und aufgenommen (LANG et al. 1999, GRAY et al. 1999). Eine solche amitochondriale Wirtszelle kann aus den Archebakterien entstanden sein (GRAY et al. 1999).

Auf der Suche nach dem Ursprung der Mitochondrien führten Sequenzvergleiche von mitochondrialen und bakteriellen Genomen zu der Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien. Diese sind durch *Rickettsia prowazekii* charakterisiert, dessen Genom zu den meisten der bisher sequenzierten mitochondrialen Genomen die grösste Homologie aufweist (GRAY et al. 1999, LANG et al. 1999).

Im Verlauf der Phylogenese eukaryotischer Zellen bildete sich eine symbiontische Beziehung zwischen dem  $\alpha$ -Proteobakterium und der Wirtszelle aus. Eine anschliessend einsetzende selektive Reduktion des bakteriellen Genoms führte dazu, dass das endosymbiontische Bakterium seine Autonomie verlor (GRAY et al. 1999, LANG et al. 1999).

Die serielle Endosymbiontentheorie kann nicht erklären, warum die Gene für typische mitochondriale Proteine, wie z.B. Chaperonine, im Zellkern amitochondrialer Archezoa gefunden wurden (GRAY et al. 1999). Solche mitochondrialen Proteine kommen auch in Hydrogenosomen vor, ein Zellorganell, das auf anaerobem Weg ATP zu produzieren vermag. Das reduzierte Endprodukt des Energiemetabolismus der Archezoa stellt Wasserstoff dar.

Dieser Befund deutet darauf hin, dass die rezenten amitochondrialen Eukaryoten einst Mitochondrien besessen haben könnten, diese nachträglich aber wieder verloren gegangen sind (GRAY et al. 1999). Hydrogenosomen und Mitochondrien scheinen gleichen Ursprungs zu sein.

### 1.4 Reduktion des mitochondrialen Genoms

Im Verlauf der Phylogenie eukaryotischer Zellen wurde das mitochondriale Genom zunehmend reduziert. Die mitochondrialen Gene wurden in den Zellkern exportiert und in das Kerngenom integriert (GRAY et al. 1999, LANG et al. 1999). Die Reduktion erfolgte in zwei Schritten: Zunächst wurden die kodierenden Sequenzen im mitochondrialen Genom reduziert,

die durch die Symbiose mit der Wirtszelle im Mitochondrium nicht mehr essentiell waren. Ihre Funktion wurde von den Kerngenen des Wirtes übernommen. Diese waren Gene, die für den Nukleotid-Stoffwechsel, sowie für Fett- und Aminosäuresynthese notwendig waren. In einem zweiten Schritt wurden essentielle Gene aus den Mitochondrien in den Zellkern exportiert. Der Vorteil einer Verlagerung genetischer Information in den Zellkern besteht darin, dass sich Mutationen in sexuellen Populationen nicht so leicht manifestieren wie in den asexuell vererbten mitochondrialen Genomen (MARTIN UND HERRMANN 1998).

Insgesamt besitzt eine typische eukaryotische Zelle etwa 10.000 verschiedene Proteine, von denen 1.000 in den Mitochondrien lokalisiert sind. Das mitochondriale Genom selbst kodiert durchschnittlich für etwa 1% der mitochondrialen Proteine, alle übrigen mitochondrialen Proteine sind kernkodiert und werden nach ihrer Synthese im Zytoplasma in die Mitochondrien importiert (SCHATZ 1997).

Ein rezentes Beispiel für den Transfer eines mitochondrialen Gens in den Zellkern findet sich in dem Gen für die Untereinheit 2 der Cytochrom *c* Oxidase (*COX2*). Während das *COX2* Gen in den meisten Organismen mitochondrial kodiert ist, finden sich bei den *Fabaceae* verschiedene Stadien, die den Transfer des *COX2* Gens in den Zellkern widerspiegeln (NUGENT UND PALMER 1991, COVELLO UND GRAY 1992, ADAMS et al. 1999).

Einige Vertreter der *Fabaceae*, wie z.B. die Erbse *Pisum sativum*, besitzen ein mitochondriales *COX2* Gen, andere, wie die Gartenbohne *Phaseolus vulgaris* oder die Mungobohne *Vigna radiata*, besitzen ein kernkodiertes *COX2* Gen. Weitere Vertreter der *Fabaceae*, wie *Pseudovignia* und *Pachyrhizus*, besitzen sowohl ein mitochondriales *COX2* Gen als auch ein weiteres *COX2* Gen im Zellkern. Bei *Pseudovignia* und *Pachyrhizus* wird nur das mitochondriale Gen aktiv transkribiert. Auch die Sojabohne *Glycine max* besitzt sowohl ein mitochondriales *COX2* Gen als auch ein weiteres *COX2* Gen im Zellkern, bei der Sojabohne wird allerdings nur das Kerngen aktiv transkribiert. Es lassen sich somit bei den *Fabaceae* verschiedene Stadien für den Transfer eines mitochondrialen Gens in den Zellkern ableiten: Nach Duplikation des mitochondrialen Gens wird die Gen Kopie zunächst in das Kerngenom integriert, das mitochondriale Gen wird jedoch weiterhin aktiv transkribiert (ADAMS et al. 1999).

Zur Funktionsübernahme durch das Kerngen muss dieses zunächst aktiviert werden. Eine solche Aktivierung wurde am *COX2* Gen der Sojabohne untersucht (ADAMS et al. 1999, DALEY et al. 2002a): Im Vergleich zum mitochondrialen Gen kodiert das Kerngen zusätzlich für eine N-terminale Erweiterung, die eine mitochondriale Leitsequenz darstellt. Diese 124 Aminosäurereste lange Leitsequenz ist von zwei Introns flankiert, was darauf hindeutet, dass

der für die Leitsequenz kodierende DNA Abschnitt durch einen als „Exon shuffling“ bezeichneten Prozess an das Gen angefügt wurde. Gleiches gilt für *cis* regulatorische Elemente, die stromaufwärts des kernkodierten *COX2* Gens lokalisiert sind und die Expression des Gens regulieren. Da das Kerngen die edierte Form des mitochondrialen Gens widerspiegelt, wird angenommen, dass der Transfer des *COX2* Gens in den Kern über den Transfer der edierten mitochondrialen RNA stattfand (NUGENT UND PALMER 1991, COVELLO UND GRAY 1992).

### 1.5 Import von Proteinen in Mitochondrien

Kernkodierte mitochondriale Proteine werden meistens als Vorstufenproteine mit einer Leitsequenz synthetisiert. In den meisten Fällen wird die Leitsequenz nach dem Import des Proteins in das Mitochondrium von mitochondrialen Proteasen abgespalten (NEUPERT 1997, PFANNER UND GEISSLER 2001).

Lösliche Proteine der mitochondrialen Matrix werden bei *Saccharomyces cerevisiae* in der Regel mit einer 10-80 Aminosäure umfassenden N-terminalen Leitsequenz synthetisiert (HURT et al. 1987). Diese Leitsequenz enthält viele positiv geladene, hydrophobe und hydroxylierte Aminosäurereste (VON HEIJNE 1986, 1992) und bildet eine amphipathische  $\alpha$ -Helix mit einer positiv geladenen und einer hydrophoben Seite (SCHATZ 1986).

Proteine der inneren Membran, wie z.B. der ADP/ATP Translokator (AAC) (PFANNER et al. 1987) und Bcs1, ein Protein, das an der Biogenese des Rieske-Eisen-Schwefel Proteins beteiligt ist (NOBREGA et al. 1992, FÖLSCH et al. 1996), besitzen interne Leitsequenzen. Diese Leitsequenzen werden nicht prozessiert.

Andere Proteine, die in der inneren mitochondrialen Membran oder im Intermembranraum lokalisiert sind, werden mit mehrteiligen N-terminalen Leitsequenzen synthetisiert. Die einzelnen Abschnitte solcher Leitsequenzen werden in der Regel von unterschiedlichen Proteasen abgespalten (PFANNER UND GEISSLER 2001).

Auch die meisten pflanzlichen mitochondrialen Proteine, die kernkodiert sind, besitzen zum Import in die Mitochondrien eine N-terminale Leitsequenz. Die pflanzlichen Leitsequenzen sind im Vergleich zu den Leitsequenzen der Hefe Proteine etwas verlängert und besitzen einen höheren Serin Gehalt (GLASER et al. 1998, SJÖLING UND GLASER 1998, TANUDJI et al. 1999). Pflanzliche mitochondriale Leitsequenzen sind durchschnittlich 80 Aminosäurereste

lang und weisen viele basische und hydroxylierte Aminosäurereste auf. Auch sie bilden amphipathische  $\alpha$ -Helices.

Zum Import kernkodierter Proteine sind in der äusseren und der inneren mitochondrialen Membran Translokase Komplexe lokalisiert (NEUPERT 1997, PFANNER UND GEISSLER 2001). Der Translokase Komplex der äusseren Membran (TOM) besteht bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aus mindestens acht Proteinen, die entweder Rezeptorfunktion besitzen oder die generelle Import Pore (GIP) bilden (Abb. 1.1, Tab. 1.1). Die Vorstufenproteine werden nach ihrer Synthese im Zytoplasma der Zelle zunächst durch Bindung von zytosolischen Chaperonen, wie dem Hitzeschock Protein Hsp70, an einer vorzeitigen Aggregation gehindert und zur äusseren mitochondrialen Membran transportiert (ZIMMERMANN UND NEUPERT 1980, PFANNER UND NEUPERT 1987, PFANNER UND GEISSLER 2001).

Proteine mit N-terminalen Leitsequenzen binden an die Rezeptoren Tom20 und Tom22, Proteine mit mehreren internen Leitsequenzen an Tom70/72 und Tom37 und mit geringerer Effizienz auch an Tom20 (PFANNER UND GEISSLER 2001). Von den Rezeptoren aus werden die Proteine durch die GIP mit Tom40 als Hauptbestandteil durch die äussere Membran transportiert.

Nach der Translokation der Proteine durch die äussere Membran werden sie an den Translokase Komplex der inneren mitochondrialen Membran (TIM) weitergeleitet.

Proteine mit einer N-terminalen Leitsequenz werden an den TIM23 Komplex weitergeleitet. Der TIM23 Komplex besteht aus den Untereinheiten Tim23 und Tim17. Beide Untereinheiten besitzen mehrere transmembrane Segmente und bilden eine oder mehrere Import Poren.

Für den Transport der Vorstufenproteine durch die innere Membran wird das Membranpotential der inneren Membran sowie ein ATP abhängiger Import-„Motor“, bestehend aus mtHsp70 und dem co-Chaperon Mge1, benötigt (PFANNER UND GEISSLER 2001). Das Membranpotential bewirkt einen Transport der positiv geladenen Leitsequenz durch die innere Membran zu der negativ polarisierten Matrix Seite der inneren Membran (MARTIN et al. 1991, BAUER et al. 1996, VOISINE et al. 1999). Für die Wirkungsweise des mtHsp70 bei der Translokation der Vorstufenproteine über die innere Membran werden derzeit zwei Modelle diskutiert: mtHsp70 bindet entweder an die Leitsequenz und verhindert passiv, dass das Protein zurück durch die Import Pore in den IMS gelangt („trapping“) oder durchläuft ATP abhängig eine Konformationsänderung und zieht das Protein damit durch die Import Pore („pulling“) (PFANNER UND GEISSLER 2001).

Proteine mit mehreren internen Leitsequenzen werden nach Translokation durch die äussere mitochondriale Membran an den TIM22 Komplex übertragen (SIRRENBURG et al. 1996, KERSCHER et al. 1997, 2000, PFANNER UND GEISSLER 2001). Der TIM22 Komplex besteht aus den Untereinheiten Tim22, Tim54 und Tim18. Diese drei Untereinheiten besitzen jeweils mehrere transmembrane Domänen und benötigen für den Transport des Proteins ebenfalls das Membranpotential.

Auch pflanzliche Mitochondrien enthalten zum Transport kernkodierter Proteine durch die äussere und die innere mitochondriale Membran jeweils einen Translokase Komplex. Diese Komplexe sind denen der Hefe ähnlich (Abb. 1.1, Tab. 1.1).

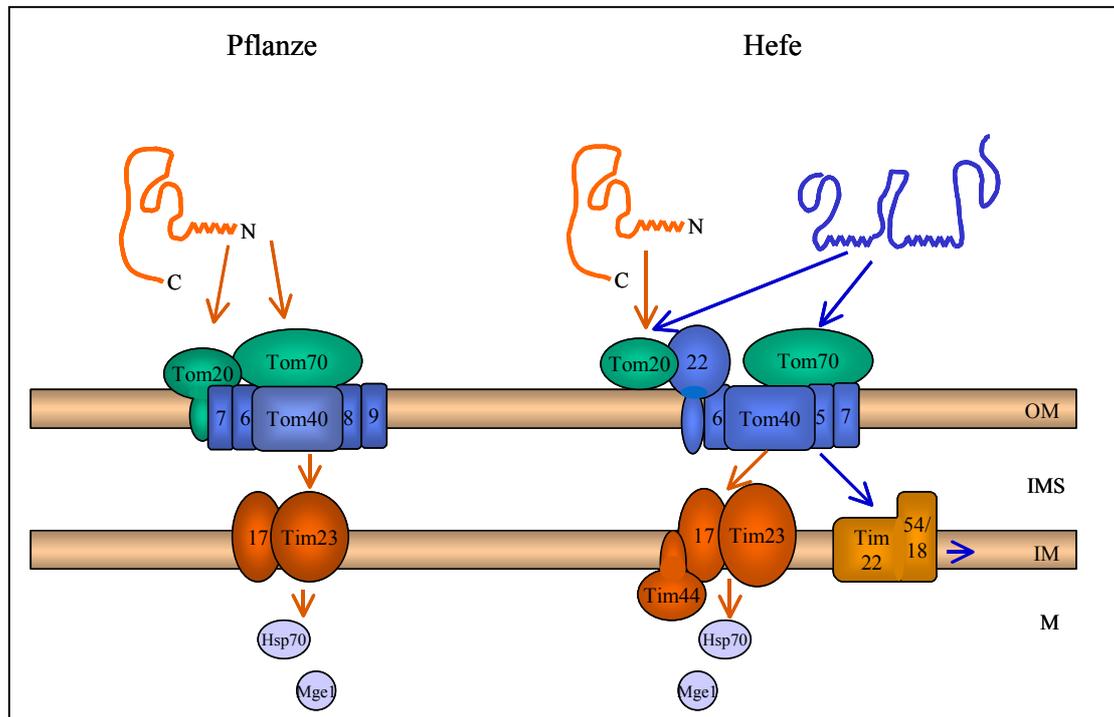
Untersuchungen zur Zusammensetzung des TOM Komplexes der Kartoffel ergaben, dass dieser aus mindestens sieben Untereinheiten besteht (HEINS und SCHMITZ 1996, JÄNSCH et al. 1998, BRAUN und SCHMITZ 1999). Als Rezeptoren fungieren Proteine mit den Molekulargewichten 23 kDa und 70 kDa, diese sind homolog zu den Hefeproteinen Tom20 und Tom70/72 (PERRYMAN et al. 1995, HEINS und SCHMITZ 1996, JÄNSCH et al. 1998, BRAUN und SCHMITZ 1999).

Die generelle Import Pore der pflanzlicher Mitochondrien besteht aus einem Protein mit einem Molekulargewicht von 42 kDa. Dieses Protein ist homolog zum Hefeprotein Tom40 (PERRYMAN et al. 1995). Mit diesem Protein sind weitere Proteine mit Molekulargewichten von 9 kDa, 8 kDa, 7 kDa und 6 kDa assoziiert. Das 7 kDa-Protein besitzt eine Homologie zu Tom7 (JÄNSCH et al. 1998).

Bei der Pflanze konnte bisher nur ein Translokase Komplex der inneren Membran identifiziert werden. Dieser Komplex besteht aus zwei Untereinheiten, die eine molare Masse von 20 und 25 kDa aufweisen. Das 20 kDa-Protein ist homolog zu dem Hefeprotein Tim23, das 25 kDa-Protein zu Tim17 (BÖMER et al. 1996, BRAUN und SCHMITZ 1999). Zu dem TIM22-54 Komplex der Hefe und zu weiteren Tim Proteinen, die bei anderen Pilzen nachgewiesen werden konnten, konnten bisher keine pflanzlichen Homologe gefunden werden (BRAUN und SCHMITZ 1999).

**Tab. 1.1: Komponenten der mitochondrialen Importkomplexe von Hefe und Pflanze**  
(BRAUN UND SCHMITZ 1999, ESSER et al. 2001)

| Lokalisation    | Funktion             | Komponenten | Hefe    | Pflanze |
|-----------------|----------------------|-------------|---------|---------|
| Äussere Membran | Rezeptoren           | Tom70/72    | +       | +       |
|                 |                      | Tom37       | +       | -       |
|                 |                      | Tom20       | +       | +       |
|                 | Import Pore          | Tom40       | +       | +       |
|                 |                      | Tom22       | +       | -       |
|                 | assoziierte Faktoren | Tom5        | +       | -       |
|                 |                      | Tom6        | +       | +       |
|                 |                      | Tom7        | +       | +       |
|                 |                      | Tom8        | -       | +       |
|                 |                      | Tom9        | -       | +       |
| Innere Membran  | TIM23-Kanal          | Tim23       | +       | +       |
|                 |                      | Tim17       | +       | +       |
|                 | TIM22-Kanal          | Tim22       | +       | -       |
|                 |                      | Tim54       | +       | -       |
|                 |                      | Tim18       | +       | -       |
|                 | assoziierte Faktoren | Tim9        | +       | -       |
|                 |                      | Tim10       | +       | -       |
|                 |                      | Tim12       | +       | -       |
|                 |                      | Tim44       | +       | -       |
|                 | Matrix               | Chaperone   | mtHsp70 | +       |
|                 |                      | Mge1        | +       | +       |



**Abb. 1.1 Importkomplexe der äußeren und der inneren mitochondrialen Membran bei Pflanze und Hefe**  
 grün: Rezeptorproteine der äußeren Membran, blau: generelle Import Pore und assoziierte Faktoren, rot: TIM23-Komplex, orange: TIM22-Komplex, violett: Chaperone  
 OM: äussere Membran, IMS: Intermembranraum, IM: innere Membran, M: Matrix  
 nach: BRAUN UND SCHMITZ 1999, PFANNER UND GEISSLER 2001

### 1.6 Prozessierung der Leitsequenzen und Sortierung mitochondrialer Proteine

Nach dem Import eines Vorstufenproteins mit N-terminaler Leitsequenz wird die Leitsequenz der meisten Proteine von der in der Matrix lokalisierten Mitochondrialen Prozessierungs Peptidase (MPP) proteolytisch abgespalten. Bei der Hefe ist die MPP ein löslicher Komplex in der Matrix, der aus den Untereinheiten  $\alpha$ -MPP und  $\beta$ -MPP besteht. Die Untereinheiten werden von den Kerngenen *MAS2* und *MAS1* kodiert und besitzen ein Molekulargewicht von 51 kDa und 48 kDa (BRUNNER et al. 1994, YANG et al. 1991). Für die Aktivität der MPP sind beide Untereinheiten notwendig.

Die MPP pflanzlicher Mitochondrien ist mit dem Ubichinol : Cytochrom *c* Oxidoreduktase Komplex, Komplex III der mitochondrialen Atmungskette in der inneren Membran, assoziiert (BRAUN UND SCHMITZ 1995, ERIKSSON UND GLASER 1992), die drei größten Untereinheiten des Komplexes III mit den Molekulargewichten 51 kDa, 53 kDa und 55 kDa weisen die MPP

Aktivität auf. Die kleine Untereinheit zeigt eine Homologie zu  $\alpha$ -MPP, die beiden großen zu  $\beta$ -MPP. Neben dieser membrangebundenen MPP konnte bei Spinat und der Sojabohne eine weitere MPP Aktivität in der Matrix pflanzlicher Mitochondrien nachgewiesen werden (SZIGYARTO et al. 1998). Die Spezifität dieser löslichen MPP entspricht der der membrangebundenen MPP.

Die MPP aller bisher untersuchten Organismen stellt eine Metallo-Protease dar, die durch EDTA und *o*-Phenanthrolin inhibiert und durch  $Zn^{2+}$ ,  $Co^{2+}$  und  $Mn^{2+}$  Ionen aktiviert werden kann (BÖHNI et al. 1983, BRUNNER et al. 1994). Die typische Schnittsequenz, die durch die MPP geschnitten wird, besitzt an Position -2 oder -3 ein Arginin (R), sowie an Position +1 kleine Aminosäurereste wie Serin (S) oder Alanin (A) (R X (X) ↓ (S/A)) (GAVEL UND VON HEIJNE 1990, NIIDOME et al. 1994, SCHNEIDER et al. 1998). Eine weitere typische Schnittstelle für die MPP besitzt ein Arginin an Position -10 (SCHNEIDER et al. 1998). Abweichungen von dieser typischen Schnittsequenz sind jedoch nicht selten.

Einige Proteine der Matrix und der inneren Membran, wie z.B. das Rieske Eisen/Schwefel Protein (Fe/S) oder die Untereinheit 4 der Cytochrom *c* Oxidase (Cox4) der Hefe, besitzen eine zweigeteilte N-terminale Leitsequenz. Der erste Teil dieser Leitsequenz wird durch die MPP proteolytisch prozessiert bevor eine weitere in der Matrix lokalisierte Protease, die Mitochondriale Intermediat Peptidase (MIP), in einem zweiten Schritt das Oktapeptid (F/L/I) X X (T/S/G) X X X X abspaltet (ISAYA et al. 1991, 1994b). Die MIP ist wie die MPP eine Metalloprotease und kann durch EDTA inhibiert und durch  $Mn^{2+}$  Ionen aktiviert werden (ISAYA et al. 1994a).

Eine MIP konnte in pflanzlichen Mitochondrien bisher nicht nachgewiesen werden. Da das typische Erkennungsmotiv zur Prozessierung von Leitsequenzen durch die MIP in pflanzlichen Leitsequenzen nicht vorkommt und Hefeproteine, die eine Erkennungssequenz zur Prozessierung durch die MIP aufweisen, in pflanzlichen Mitochondrien nicht prozessiert werden, ist es eher unwahrscheinlich, dass eine MIP bei Pflanzen existiert (EMMERMANN et al. 1994).

Einige Proteine der IM oder des IMS, wie z.B. das Cytochrom *c*<sub>1</sub> (Cyt c<sub>1</sub>) und das Cytochrom *b*<sub>2</sub> (Cyt b<sub>2</sub>) der Hefe, besitzen ebenfalls zweigeteilte N-terminale Leitsequenzen. Auch diese Leitsequenzen werden in zwei Schritten proteolytisch abgespalten. Der erste Teil der Leitsequenz wird wiederum nach Import des Proteins in die Matrix von der MPP prozessiert (POLLOCK et al. 1988). Der zweite Teil der Leitsequenz wird nach dem Export des Proteins

durch die innere Membran und der Insertion des Proteins in die Membran durch die Innermembran Peptidase (IMP) abgespalten (BEHRENS et al. 1991, NUNNARI et al. 1993, PRATJE UND GUIARD 1986, PRATJE et al. 1994).

Die Innermembran Peptidase besteht aus den Untereinheiten Imp1, Imp2 und Som1 (NUNNARI et al. 1993, SCHNEIDER et al. 1994, PRATJE et al. 1994, ESSER et al. 1999, JAN et al. 2000) und ist mit der inneren Membran assoziiert (SCHNEIDER et al. 1991).

Die Untereinheiten Imp1 und Imp2 sind sowohl zueinander als auch zu anderen pro- und eukaryotischen Signalpeptidasen homolog (BEHRENS et al. 1991, DALBEY UND VON HEIJNE 1992, VAN DIJL et al. 1992). Sie besitzen beide katalytische Aktivität, prozessieren aber unterschiedliche Proteine (NUNNARI et al. 1993). So prozessiert Imp1 die Proteine Cyt b<sub>2</sub> und Mcr1, während Imp2 das Protein Cyt c<sub>1</sub> prozessiert (HAHNE et al. 1994, NUNNARI et al. 1993, PRATJE UND GUIARD 1986). Imp2 ist für die Stabilität der Imp1 Untereinheit notwendig (NUNNARI et al. 1993).

Auch einige mitochondrial kodierte Proteine, wie die Untereinheit 2 der Cytochrom *c* Oxidase (Cox2) der Hefe, werden als Vorstufenprotein mit einer N-terminalen Präsequenz in der Matrix synthetisiert (PRATJE et al. 1983). Die Präsequenz ist für die Funktion des Hefe Cox2 Proteins notwendig (TORELLO et al. 1997), der Bereich der Cox2 mRNA, der für die ersten 6 Aminosäuren der Präsequenz kodiert, besitzt einen Einfluss auf die Translation des Cox2 Proteins (BONNEFOY et al. 2001). Nach dem Export des Proteins durch die innere Membran und nach der Integration des Proteins in die Membran wird die Präsequenz von der Imp1 Untereinheit der IMP abgespalten (PRATJE et al. 1983).

Die Abspaltung erfolgt zwischen den Aminosäureresten Asparagin (N) und Asparaginsäure (D) (PRATJE et al. 1983), die des intermediären Cyt b<sub>2</sub> zwischen den Aminosäureresten Asparagin (N) und Glutaminsäure (E) (GUIARD UND BUHLER 1984, PRATJE UND GUIARD 1986). An Position -1 sind neben Asparagin auch Alanin, Serin, Cystein, Leucin und Methionin zulässig (CHEN et al. 1999).

Som1 ist notwendig für die Prozessierung der Imp1 Substrate Cox2 und Mcr1, nicht aber für die Prozessierung von Cyt b<sub>2</sub> (JAN et al. 2000).

Die Aktivität der IMP wird durch EDTA, Zn<sup>2+</sup> und N-ethylmaleimid inhibiert und durch Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> oder Mn<sup>2+</sup> Ionen aktiviert (SCHNEIDER et al. 1991). Eine temperatursensitive Mutation von *imp1* kann durch die Überexpression von Som1 komplementiert werden (ESSER et al. 1996).

In pflanzlichen Mitochondrien konnte eine IMP bisher experimentell nicht nachgewiesen werden. Da jedoch auch pflanzliche mitochondriale Proteine mehrteilige Leitsequenzen

besitzen, ist es sehr wahrscheinlich, dass in pflanzlichen Mitochondrien eine IMP existiert (BRAUN et al. 1992). Zu den Imp1 und Imp2 Untereinheiten sind homologe Proteine mit 35% bzw. 39% Identität im Proteom von *Arabidopsis thaliana* nachweisbar (LISTER et al. 2003).

Ein alternativer Weg der Prozessierung einer zweiteiligen N-terminalen Leitsequenz konnte für das Cytochrom *c* Peroxidase (Ccp1) Protein der Hefe identifiziert werden. Der erste Schritt der Prozessierung wird von der mitochondrialen mAAA Protease katalysiert, deren Hauptaufgabe der Abbau nicht assemblierter Untereinheiten der mitochondrialen Atmungskette ist (siehe 1.8). Die mAAA Protease besteht aus den Untereinheiten Yta10 und Yta12, für die proteolytische Prozessierung von Ccp1 sind beide Untereinheiten notwendig (ESSER et al. 2002). Der zweite Teil der Leitsequenz wird durch das Protein Pcp1 (Ygr101w) abgespalten. Pcp1 gehört zur Rhomboid-GlpG Familie vermeintlicher Intermembran Peptidasen (ESSER et al. 2002). Weitere Substrate der mAAA Protease und von Pcp1 konnten bisher nicht nachgewiesen werden.

Das mitochondrial kodierte Cox2 Proteins der Hefe benötigt für den Transport durch die innere Membran das kernkodierte Oxa1 Protein der Hefe (BAUER et al. 1994, MEYER et al. 1997a, 1997b, HE UND FOX 1997). Oxa1 ist ein Mitglied der evolutiv stark konservierten Oxa1p/YidC/Alb3 Protein Familie, die in Mitochondrien, Chloroplasten und Prokaryoten vorkommt (HELL et al. 1998, STUART UND NEUPERT 2000) und vermittelt den Export der N-terminalen Region des Proteins durch die innere Membran (HE UND FOX 1997, HELL et al. 1997, 1998).

Neben seiner Rolle für den N-terminalen Export des Hefe Cox2 Proteins konnte für Oxa1 auch eine Interaktion mit den Untereinheiten 1 und 3 der Cytochrom *c* Oxidase (Cox1, Cox3) sowie mit Cytochrom *b* nachgewiesen werden (HELL et al. 2001, MEYER et al. 1997). Das legt die Vermutung nahe, dass Oxa1 generell an der Integration mitochondrial kodierter Proteine in die Membran beteiligt ist.

Oxa1 konnte in *Arabidopsis thaliana* durch eine funktionelle Komplementation einer *oxa1* Hefemutante nachgewiesen werden (HAMEL et al. 1997). In *Arabidopsis* ist Oxa1 am Transport von Proteinen über die innere Membran und an der Assemblierung von Atmungskettenkomplexen beteiligt.

Für den Export des Cox2 C-Terminus durch die Innere Membran und die Stabilisierung des Hefe Cox2 Proteins ist das Mss2 Protein notwendig (BROADLEY et al. 2001). Mss2 ist ein

kernkodiertes mitochondriales Protein, das in der Matrix lokalisiert ist. Es liegt mit der inneren Membran assoziiert vor (BROADLEY et al. 2001).

Auch das kernkodierte mitochondriale Protein Pnt1 besitzt eine Rolle beim Export des C-Terminus des mitochondrial kodierten Cox2 Proteins der Hefe (HE UND FOX 1999). Eine Deletion des *PNT1* Gens hat bei *Saccharomyces cerevisiae* kaum Auswirkungen, bei *Klyveromyces lactis* hingegen führt die Deletion des *PNT1* Gens zu einem strikten Atmungsdefekt der Zellen (HE UND FOX 1999). Pnt1 ist in die innere Membran integriert (HE UND FOX 1999).

### 1.7 Assemblierung der mitochondrialen Komplexe

Zur Assemblierung der Atmungsketten Komplexe in der IM werden weitere kernkodierte Proteine benötigt.

Die importierten Komplexuntereinheiten werden von dem mtHsp-Mdj-Mge Chaperon System an die mitochondrialen Chaperone Hsp60 und Hsp10 weitergeleitet (NEUPERT 1997), die in der Matrix die endgültige Faltung der Proteine in ihre native Form bewirken und für die Assemblierung der Komplexe essentiell sind (CHENG et al. 1989, HÖHFELD UND HARTL 1994). An der Faltung der Proteine in der Matrix ist darüber hinaus zusammen mit dem mtHsp70 und mtHsp60 das mitochondriale Cyclophilin beteiligt (MATOUSCHEK et al. 1995, RASSOW et al. 1995).

Mitochondrial kodierte Proteine werden im Gegensatz zu den importierten Proteinen in der Regel cotranslational in die innere Membran inseriert (POYTON et al. 1992). Die an der Synthese dieser Proteine beteiligten Ribosomen sind mit der inneren Membran assoziiert. Die Integration der neusynthetisierten Proteine in die Membran wird durch die Chaperone mtHsp70 und Mdj1 vermittelt (HERRMANN et al. 1994, WESTERMANN et al. 1996).

Für die Atmungsketten Komplexe konnten Assemblierungsfaktoren identifiziert werden, die die Zusammenlagerung der Komplexe aus den Protein Untereinheiten vermitteln.

Für die Assemblierung des Komplexes II ist das Protein Abc1 notwendig (POYTON UND MCEWEN 1996), die Proteine Cbp3, Cbp4, Bcs1 und Abc1 vermitteln die Assemblierung des Komplexes III (TZAGALOFF 1995, POYTON UND MCEWEN 1996).

Die Proteine Pet100, Pet117, Pet191, Sco1, Cox10, Cox11, Cox14, Cox18, Cox20 und Oxa1 vermitteln die Assemblierung des Komplexes IV (POYTON UND MCEWEN 1996, HELL et al.

2000, LOPEZ SOUZA et al. 2000), weitere sechs Genprodukte könnten ebenfalls an der Assemblierung der Cytochrom Oxidase beteiligt sein (MEWES et al. 1997).

Zur Assemblierung des Komplexes V werden die Proteine Atp10, Atp11 und Atp12 benötigt (LAW et al. 1995, MEWES et al. 1997).

Eine weitere Gruppe von Proteinen, die an der Assemblierung mitochondrialer Komplexe beteiligt ist, stellt die AAA Protein Familie dar („ATPases, associated with a variety of cellular activities“) (KUNAU et al. 1993, CONFALONIERI UND DUGUET 1995).

AAA Proteine sind unter anderem an der Kontrolle des Zellzyklus und der homotypischen Membranfusionen beteiligt, sowie an der Regulation der Genexpression, der Biogenese von Organellen und dem Abbau von Proteinen (CONFALONIERI UND DUGUET 1995).

Mitochondriale AAA Proteine stellen mit der Membran assoziierte ATP-abhängige Proteasen dar und werden zusammen mit dem homologen prokaryotischen Protein FtsH als AAA Proteasen bezeichnet (ARLT et al. 1996).

### *1.8 Mitochondriale AAA Proteasen*

In den Mitochondrien konnten bisher drei AAA Proteasen identifiziert werden: Yta10/Afg3 (GUÉLIN et al. 1994, TAUER et al. 1994), Yta11/Yme1 (THORSNESS et al. 1993) und Yta12/Rca1 (SCHNALL et al. 1994, TZAGOLOFF et al. 1994).

Yta11/Yme1 bildet einen homooligomeren Komplex (LEONHARD et al. 1996) und ist mit der inneren Membran assoziiert. Da die katalytische Aktivität des Komplexes im Intermembranraum nachgewiesen wurde, wird der Yta11/Yme1 Komplex auch als iAAA Protease bezeichnet (LEONHARD et al. 1996).

Yta11/Yme1 baut spezifisch die Untereinheit 2 der Cytochrom *c* Oxidase ab, wenn diese nicht in den Komplex IV eingebaut werden kann (NAKAI et al. 1995, PEARCE UND SHERMAN 1995). Ein Ausfall von Yta11/Yme1 führt in der Zelle zum Verlust der mitochondrialen DNA (Yme = „Yeast mitochondrial escape“) (THORSNESS et al. 1993).

Yta10/Afg3 und Yta12/Rca1 bilden zusammen einen Komplex, der ebenfalls mit der inneren Membran assoziiert ist. Der Komplex besitzt seine katalytische Aktivität jedoch auf der Matrix Seite der Mitochondrien (ARLT et al. 1996). Der Yta10/Yta11 Komplex wird deshalb als mAAA Protease bezeichnet (LEONHARD et al. 1996).

Der mAAA Protease Komplex ist essentiell für die Assemblierung des Komplexes V der Atmungskette (PAUL UND TZAGOLOFF 1995, ARLT et al. 1996). Untereinheiten dieses Komplexes, die nicht assembliert wurden, werden von der mAAA Protease abgebaut (ARLT et al. 1996).

Abgesehen von der Untereinheit 2 der Cytochrom *c* Oxidase werden alle anderen Komplex Untereinheiten von der mAAA Protease abgebaut, wenn sie nicht in die Komplexe integriert werden können (PAJIC et al. 1994, GUÉLIN et al. 1996). Fällt Yta11/Yme1 jedoch aus, so scheint der Abbau nicht assemblierter Cox2 Untereinheiten auch vom Komplex Yta10/Yta12 übernommen zu werden (BROADLEY et al. 2001).

Das Protein Lon/Pim1 kann im überexprimierten Zustand den Ausfall der Proteine Yta10 und Yta12 komplementieren (REP et al. 1996b). Lon/Pim1 besitzt ebenfalls eine Rolle bei dem Abbau nicht assemblierter Protein Untereinheiten in den Mitochondrien (SUZUKI et al. 1994, VAN DYCK et al. 1994), es ist eine ATP-abhängige Protease und baut in der Matrix vor allem Untereinheiten des Komplexes V, die  $\beta$ -Untereinheit der MPP und mitochondriale ribosomale Proteine ab. Komplementation der Proteine Yta10 und Yta12 durch Lon/Pim1 ist auch dann möglich, wenn Lon/Pim1 selbst proteolytisch nicht aktiv ist (REP et al. 1996a).

Auch Mba1 und Oxa1 können bei Überexpression den Ausfall von Yta10/Yta12 komplementieren (REP et al. 1996b), obwohl beide Proteine keine Protease Funktionen aufweisen (BAUER et al. 1994, REP UND GRIVELL 1996). Das lässt darauf schließen, dass die mitochondrialen AAA Proteasen neben dem Abbau nicht assemblierter Protein Untereinheiten eine Chaperon Funktion besitzen und die Assemblierung der Komplexe kontrollieren (ARLT et al. 1996, SUZUKI et al. 1997).

### 1.9 Zielsetzung

Zielsetzung der vorliegenden Arbeit war es, die Prozessierung der Leitsequenz des kernkodierten Cox2 Proteins der Sojabohne (GmCox2) und den Transport des Proteins durch die innere mitochondriale Membran näher zu charakterisieren.

Zunächst musste geprüft werden, ob die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als Modellorganismus verwendet werden kann, um die Untersuchungen zur Drei-Stufen Prozessierung *in vivo* durchzuführen. Im weiteren Verlauf galt es dann die Faktoren zu identifizieren, die am Transport und an der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz beteiligt sind.

Um Hinweise auf den Importweg von GmCox2 zu bekommen, sollte geklärt werden, in welchen mitochondrialen Kompartimenten die Prozessierungen zu den verschiedenen intermediären Formen und zum reifen Protein ablaufen. Es galt mit Hilfe von Proteasemutanten, die daran beteiligten Proteasen zu identifizieren und deren Schnittstellen in der GmCox2 Leitsequenz durch eine Sequenzanalyse zu bestimmen.

Weiterhin sollte die Beteiligung des Proteins Oxa1 am Export des GmCox2 Proteins über die innere mitochondriale Membran untersucht werden. Da Oxa1 am Export des mitochondrialen Hefe Cox2 Proteins beteiligt ist und auch in der Sojabohne vorkommt, lag die Vermutung nahe, dass es auch am Export des GmCox2 Proteins über die IM beteiligt sein könnte.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte

|   |   |
|---|---|
| Agarose-Gelelektrophoresekammer         | WELABO, Düsseldorf                              |
| Autoradiographiesystem „Phosphorimager“ | Fuji, Tokyo                                     |
| Biofuge 17 RS                           | Heraeus Sepatech, Osterode                      |
| Biofuge B                               | Heraeus Sepatech, Osterode                      |
| Cellulosenitrat 0,45 µm                 | Schleicher & Schüll, Dassel                     |
| Entwicklermaschine Processor M45        | Protec Gerätebau GmbH, Oberstenfeld             |
| Feinwaage 1219MP                        | Sartorius, Göttingen                            |
| Glashomogenisator 35S                   | Glas-Col, Terre Haute IN, USA                   |
| Glasperlen 0,45-0,5 mm                  | Braun, Melsungen                                |
| Gradientenmischer (20 ml)               | Hölzel, G., Dorfen-München                      |
| Heizschüttler                           | Infors, Bottmingen (CH)                         |
| Kühlzentrifuge J2-21 mit Rotoren        | Beckmann, München                               |
| JA-20 (8 x 50 ml)                       |   |
| JA-7.5 (4 x 250 ml)                     |   |
| Mikrowelle R3V10(B)                     | Sharp Corporation, Hamburg                      |
| 3MM-Papier                              | Whatman, Maidstone, Großbritannien              |
| Photometer UV-120-02                    | Shimadzu, München                               |
| Photometer Ultrospec 2000               | Pharmacia Biotech, Cambridge (GB)               |
| UV/Visible Spectrophotometer            |   |
| Power Supply Modell 200/2.0             | Bio-Rad Laboratories GmbH, München              |
| Schwenktisch Swip KM2                   | Edmund Bühler, Bodelshausen                     |
| Thermomixer 5436                        | Eppendorf, Hamburg                              |
| Trans-Blot™ Cell                        | Bio-Rad Laboratories GmbH, München              |
| TRIO-Thermoblock, Vers. 2.5.1bb         | Biometra, Göttingen                             |
| Vortex VF2                              | Janke & Kunkel GmbH & Co. KG, Werk IKA, Staufen |

## 2.1.2 Stämme und Kulturbedingungen

### 2.1.2.1 *Escherichia coli*

#### *E. coli* XL1-Blue

BULLOCK et al. (1987)

*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F' *proAB lacI<sup>f</sup>ZΔM15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)*]<sup>c</sup>

Kulturbedingungen:

Alle *E. coli* Kulturen wurden in den angegebenen Medien bei 37°C angezogen.

### 2.1.2.2 *Saccharomyces cerevisiae*

#### JRY675

RINE, unveröffentlicht

MATa *leu2 ura3 his4* ρ<sup>+</sup>

#### 777-3A/mit<sup>-</sup>167/3, 414/5, 427/1

PRATJE et al. 1979

MATα *ade1 ura3 op1 cox2*

#### MY111-2

YAFFEE et al. 1985

MATα *ade2 his3 ura3 mas1<sup>ts</sup>*

#### GM103-4D

JAN et al. 2000

MATα *his4 ura3 leu2 trp1 IMP1::LEU2*

#### JRYΔ3

ESSER et al. 1996

MATα *his4 ura3 Δleu2 som1::LEU2*

#### EP4-20A

BAUER et al. 1994

MATα *leu2 his4 ura3 pet ts1402* ρ<sup>+</sup>

#### Δyta10

EUROSCARF

MATa *his3 leu2 lys2 ura3 YER017c::kanMX4*

#### Δyta12

EUROSCARF

MATα *his3 met lys2 ura3 YMR089c::kanMX4*

*Δpcp1*

EUROSCARF

MATα *his3 leu2 lys2 ura3 YGR101w::kanMX4*

## Kulturbedingungen:

Alle *S. cerevisiae* Kulturen wurden in den angegebenen Medien bei 28°C angezogen.

Zur Induktion des temperatursensitiven Phänotyps wurden die Mutanten für 6-14 Std. bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C inkubiert.

2.1.2.3 *Glycine max* L.

*Glycine max* L. Merr, c.v. Stevens

**2.1.3 Medien**2.1.3.1 Medien für *Escherichia coli*

|            |                         |         |
|------------|-------------------------|---------|
| LB-Medium  | Trypton                 | 10 g/l  |
|            | Hefe-Extrakt            | 5 g/l   |
|            | NaCl                    | 10 g/l  |
| LB-Platten | LB-Medium               |         |
|            | 15 g/l Agar             |         |
|            | verwendete Antibiotika: |         |
|            | Ampicillin              | 50 mg/l |

Zur Blau / Weiß – Selektion wurden den Platten 0,005% X-Gal und 0,0048% IPTG hinzugefügt.

2.1.3.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

|               |   |          |
|---------------|---|----------|
| YPGc-Medium   | Glucose   | 20 g/l   |
|               | Pepton  | 10 g/l   |
|               | Hefe-Extrakt  | 10 g/l   |
|               | Adenin  | 100 mg/l |
|               | Threonin  | 20 mg/l  |
|               | Tryptophan  | 20 mg/l  |
|               | Uracil  | 20 mg/l  |
| YPGc-Platten  | YPGc-Medium   |          |
|               | 23 g/l Agar   |          |
| N3-Puffer     | Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *2H <sub>2</sub> O | 17,8 g/l |
|               | KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 54,4 g/l |
|               | pH 6,2  |          |
| N3-Medium     | Hefe-Extrakt  | 10 g/l   |
|               | Pepton  | 10 g/l   |
|               | Glycerin  | 2 %      |
|               | N3-Puffer   | 10 %     |
| N3-Platten    | N3-Medium   |          |
|               | 23 g/l Agar   |          |
| WA-ura-Medium | Difco Yeast Nitrogen Base                           | 6,7 g/l  |
|               | Glucose   | 20 g/l   |
|               | N3-Puffer   | 5 %      |
|               | zusetzte Aminosäuren:                               |          |
|               | Adenin  | 0,001 %  |



## 2.1.5 Oligonukleotid-Primer

2.1.5.1 Primer zur Amplifikation von GmCOX2:

GmCO2.5 5' ACG GTA CCA TGG GCC TGC TAT CTT GTT T 3'  
*Kpn I*

GmCO2.6 5' ACG AAT TCG GGA TTA GTT GAC TTG ACT GG 3'  
*Eco RI*

2.1.5.2 Primer zum Austausch des letzten Teils der GmCox2 Leitsequenz LS3 gegen die Hefe Präsequenz pSc (*kursiv*):

GmSc1 5' AAT GAA CGT TGT TAA TTG TAA TCT TAA TAA ATC TAA CAT CCA TCT  
*Psp 1406I*  
 TGA GAC CTC TGG TGT 3'

GmSc2 5' TTA ACA ACG TTC ATT ATG AAT GAT GTA CCA ACA CCA TGG CAA CTA  
*Psp 1406I* *Nco I*  
 GGG TTT CAA 3'

2.1.5.3 Primer zur Klonierung von Gm<sub>136</sub>GFP:

GmCO2.9 5' TAG AGT CGA CGC ATC TTG AAA CCC TAG TTG 3'  
*Sal I*

2.1.5.4 Primer zur Klonierung von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP:

ScCO2.7 5' TAG AGT CGA CGG TGT TGG TAC ATC ATT CAT 3'  
*Sal I*

2.1.5.5 Primer zur Klonierung von Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP:

GmCO2.8 5' TAG AGT CGA CGC ATC TTG AAA CCC TAG TTG 3'  
*Sal I*

2.1.5.6 Primer zur Amplifikation von ScCOX2:

Primer P1 und Primer P2

MEYER 1998

M13 Forward (-20)

Promega

### 2.1.6 Antikörper

| Antikörper     | Beschreibung         | Konzentration         | Herkunft  |              |
|----------------|----------------------|-----------------------|-----------|--------------|
| Anti-ScCox2    | <i>S. cerevisiae</i> | Kaninchen, polyklonal | 1:1000    | Dr. G Schatz |
| Anti-GmCox2    | <i>Glycine max</i>   | Kaninchen, polyklonal | 1:5000    | Dr. J Whelan |
| Anti-GFP       | Klone 7.1 und 13.1   | Maus, monoklonal      | 0,4 µg/ml | Roche        |
| Anti-Kaninchen | IgG-AP               | Schaf                 | 100 mU/ml | Roche        |
| Anti-Maus      | IgG-AP               | Ziege                 | 0,1 µg/ml | Dianova      |

### 2.1.7 Chemikalien

Feinchemikalien in p.a.-Qualität wurden bezogen von:

Merck, Darmstadt

Roth, Karlsruhe

Sigma, München

Zellkulturmedien wurden bezogen von:

Difco, Detroit (USA)

Serva, Heidelberg

Sigma, München

Restriktionsendonukleasen und andere Enzyme wurden bezogen von:

Roche, Mannheim

MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Pharmacia Biotech, Freiburg

Das verwendete Wasser wurde durch eine Milli-Q- Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) gereinigt.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Kulturführung

Hefe Flüssigkulturen wurden in den entsprechenden Medien bei 28°C unter Schütteln angezogen. Zur Induktion eines temperatursensitiven Phänotyps wurden die Zellen bei einer nicht-permissiven Temperatur von 36°C inkubiert.

Die Anzucht von Hefekulturen auf festen Medien erfolgte bei 28°C im Klimaschrank. Eine längerfristige Lagerung von Hefekulturen erfolgte für etwa 1 Jahr bei +4°C oder nach Zugabe von 25% Glycerin bei -70°C.

*E. coli* Zellen wurden auf Platten oder in flüssigem Medium bei 36°C inkubiert. Eine längerfristige Lagerung erfolgte für etwa 6 Monate bei +4°C oder nach Zugabe von 50% Glycerin bei -70°C.

### 2.2.2 DNA-Standardmethoden

Molekulare Standardmethoden zur Klonierung von DNA, Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen, Transformation von *E. coli*, Plasmidisolierung aus *E. coli* und Agarose-Gelelektrophorese wurden nach SAMBROOK et al. 1989 durchgeführt.

Restriktionsendonukleasen zum Verdau von DNA wurden nach Angaben des jeweiligen Herstellers verwendet, die Eluation von DNA aus Agarosegelen erfolgte mittels JETsorb™ der Firma Genomed.

Die Aufreinigung von Plasmiden zur *in vitro*-Transkription/Translation erfolgte mittels Wizard™ Minipreps DNA Purification System der Firma Promega.

### 2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA erfolgte mittels PCR nach SAIKI et al. 1988. Die Primer wurden jeweils spezifisch von den bekannten Gensequenzen abgeleitet. Zur Standard PCR-Reaktion wurden 50 ng/100 µl Plasmid-DNA, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM Primer, 0,2 mM dNTPs und 2,5 u/100 µl Taq-Polymerase eingesetzt. Reaktionstemperaturen zur Hybridisierung der Primer an den DNA-Strang richteten sich nach dem GC-Gehalt der verwendeten Primer.

Die Denaturierung der DNA erfolgte bei 96°C für 30 sek., die Synthese des DNA-Stranges bei 72°C für 2 min., die Hybridisierung der Primer erfolgte für jeweils 30 sek.

PCR Reaktionen wurden mit 30 Zyklen durchgeführt.

#### 2.2.3.1 Amplifikation von GmCOX2:

Zur Amplifikation von GmCOX2 aus dem Klon M3cox2(SRL) (J. Whelan und D. Daley, Perth, Australien) wurden die Primer GmCO2.5 und GmCO2.6 verwendet.

GmCO2.5 bindet im 5'-Bereich des GmCOX2 Gens und enthält eine *Kpn* I Schnittstelle.

GmCO2.6 bindet im 3'-Bereich des Gens und enthält eine *Eco* RI Schnittstelle.

Das Primerpaar GmCO2.5/GmCO2.6 wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 55°C verwendet. Das amplifizierte GmCOX2 Gen wies eine Größe von 1,1 kb auf.

#### 2.2.3.2 Amplifikation von ScCOX2:

Zur Amplifikation von ScCOX2 wurden die Primer P1 und P2 verwendet. Primer 1 bindet am 5'-Ende des COX2 Gens und enthält eine *Bam* HI Schnittstelle, Primer 2 Bindet am 3'-Ende des COX2 Gens und enthält eine *Eco* RI Schnittstelle. Das Primerpaar P1/P2 wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 55°C verwendet. Das amplifizierte ScCOX2 Gen wies eine Größe von 1,1 kb auf.

#### 2.2.3.3 Austausch des letzten Teils der GmCOX2 Leitsequenz gegen die Hefe COX2 Präsequenz:

Zum Austausch des letzten Teils der Sojabohnen Cox2 Leitsequenz gegen die Präsequenz des Hefe Cox2 Proteins (pSc) im Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 wurden Primer verwendet, die jeweils eine Hälfte des Gens für die pSc-Sequenz sowie einen Teil der GmCOX2 Sequenz enthielten. Die Amplifikation des Konstruktes erfolgte somit in zwei Teilen:

1. Leitsequenz GmCOX2-pSc(1/2)
2. pSc(1/2)-GmCOX2

Zur Amplifikation des ersten Teils des Konstruktes wurden die Primer GmCO2.5 und GmSc1 verwendet. Primer GmCO2.5 bindet am 5'-Ende des GmCOX2 Gens und enthält eine *Kpn* I Schnittstelle. GmSc1 bindet am 3'-Ende im Bereich der GmCOX2 Leitsequenz unmittelbar

vor dem Übergang in die Präsequenz pGm und enthält eine *Psp* 1406I Schnittstelle. Das Primerpaar GmCO2.5/GmSc1 wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 55°C verwendet. Das amplifizierte Produkt wies eine Größe von etwa 0,4 kb auf.

Die Amplifikation des zweiten Teils des Konstruktes wurde mit den Primern GmSc2 und GmCO2.6 durchgeführt. Primer GmSc2 bindet am 5'-Ende im Bereich der Sequenz für das reife GmCOX2 Protein und enthält eine *Psp* 1406I Schnittstelle. Primer GmCO2.6 bindet am 3'-Ende des GmCOX2 Gens und enthält eine *Eco* RI Schnittstelle. Das Primerpaar GmSc1/GmCO2.6 wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 55°C verwendet. Das amplifizierte Produkt wies eine Größe von etwa 0,7 kb auf.

Das Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 wurde unter Verwendung der *Psp* 1406I Schnittstelle im Bereich der Hefe Präsequenz zusammengefügt. Die Einführung dieser Schnittstelle in die pSc Sequenz führte zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz. Das vollständige Konstrukt konnte unter Verwendung der Restriktionsendonukleasen *Kpn* I und *Eco* RI in den Vektor pUC19 inseriert werden. Danach erfolgte eine Umklonierung des Konstruktes in den Vektor pGEM3-Zf(+) und den Hefevektor YEp352. In den Hefevektor war der ADH1 Promotor mit 5' *Sph* I und 3' *Sal* I inseriert (YEp352-pADH1).

#### 2.2.3.4 Klonierung des Konstruktes Gm<sub>136</sub>GFP:

Zur Herstellung des Konstruktes Gm<sub>136</sub>GFP wurden der ADH1-Promotor und die Leitsequenz des GmCOX2 Gens incl. des letzten Teils der GmCOX2 Leitsequenz mit den Primern M13Fwd und GmCO2.9 aus dem Vektor YEp352-pADH1-GmCOX2 amplifiziert. Der Primer M13Fwd bindet im Vektor YEp353 stromaufwärts des inserierten ADH1 Promotors. Der Primer GmCO2.9 bindet stromabwärts des Bereiches für die GmCOX2 Präsequenz innerhalb des Gens für das reife GmCox2p und enthält eine *Sal* I Schnittstelle. Das Primerpaar M13Fwd/GmCO2.9 wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 55°C verwendet. Das amplifizierte Produkt pADH1-LSGmCOX2 wies eine Größe von etwa 0,8 kb auf.

Das GFP Gen wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Sal* I und *Eco* RI aus dem Vektor pGFP der Firma Clontech isoliert und in den Vektor YEp352 inseriert (YEp352-GFP). Das in der PCR amplifizierte Fragment pADH1-Gm<sub>136</sub> wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Sal* I geschnitten und den Vektor YEp352-GFP Gen eingefügt. Das fertiggestellte Konstrukt Gm<sub>136</sub>GFP wurde außerdem mit *Eco* RI aus dem YEp352 Vektor ausgeschnitten und in den Vektor pGEM3-Zf(+) inseriert.

#### 2.2.3.5 Klonierung des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP:

Zur Herstellung des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP wurden der ADH1-Promotor und die Leitsequenz des GmCOX2 Gens incl. der Präsequenz des Hefe COX2 Gens pSc aus dem Vektor YEp352-pADH1-Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 mit den Primern M13Fwd und ScCO2.7 amplifiziert.

Der Primer ScCO2.7 bindet am 3'-Ende der Hefe Präsequenz und enthält eine *Sal* I Schnittstelle. Das Primerpaar M13Fwd/ScCO2.7 wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 55 °C verwendet. Das amplifizierte Fragment pADH1-Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub> wies eine Größe von etwa 800 bp auf.

Das Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Sal* I geschnitten und in den Vektor YEp352-GFP inseriert. Das Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP wurde mit *Eco* RI isoliert und in den Vektor pGEM3-Zf(+) umklontiert.

#### 2.2.3.6 Herstellung des Konstruktes Gm<sub>136</sub>TM1GFP:

Zur Herstellung des Konstruktes Gm<sub>136</sub>TM1GFP wurden der pADH1 Promotor, die GmCOX2 Leitsequenz und die erste Transmembrandomäne des GmCOX2 Gens (TM1) mit den Primern M13Fwd und GmCO2.8 aus dem Vektor YEp352-pADH1GmCOX2 amplifiziert. Der Primer GmCO2.8 bindet unmittelbar am 3'-Ende der ersten Transmembrandomäne und beinhaltet eine *Sal* I Schnittstelle. Das Primerpaar M13Fwd/GmCO2.8 wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 55°C verwendet. Das amplifizierte Fragment besitzt eine Größe von etwa 900 bp.

Das Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Sal* I verdaut und in den Vektor YEp352-GFP inseriert. Das Konstrukt Gm<sub>136</sub>TM1GFP wurde mit der Restriktionsendonuklease *Eco* RI isoliert und in den Vektor pGEM3-Zf(+) umklontiert.

#### 2.2.3.7 Herstellung des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP:

Zur Herstellung des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP wurden der pADH1 Promotor, die GmCOX2 Leitsequenz incl. der Hefe Präsequenz und die erste Transmembrandomäne des GmCOX2 Gens (TM1) mit den Primern M13Fwd und GmCO2.8 aus dem Vektor YEp352-pADH1-Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 amplifiziert. Der Primer GmCO2.8 bindet unmittelbar am 3'-Ende der ersten Transmembrandomäne und beinhaltet eine *Sal* I Schnittstelle. Das Primerpaar

M13Fwd/GmCO2.8 wurde mit einer Hybridisierungstemperatur von 55°C verwendet. Das amplifizierte Fragment besitzt eine Größe von etwa 900 bp.

Das Fragment wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Hind* III und *Sal* I geschnitten und in den Vektor YEp352-GFP inseriert. Das Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP wurde unter Verwendung von *Eco* RI isoliert und in den Vektor pGEM3-Zf(+) umklontiert.

#### 2.2.4 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde nach SANGER et al. 1977 mit Hilfe des BigDye Terminator Cycle Sequencing Kits der Firma Applied Biosystems durchgeführt. 1-1,5 µg Plasmid-DNA wurden in einem 12 µl Ansatz mit 3 µl BigDye-Lösung, 5 µl 2,5 x Puffer und 20 pmol eines spezifischen Primers versetzt. Die Reaktion im Thermocycler erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elektrophorese und die Dokumentation der Sequenzreaktion erfolgte im Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie (Universitätskrankenhaus Eppendorf, Hamburg).

#### 2.2.5 Hefetransformation

Hefezellen der Stämme JRY 675, 777-3A/mit<sup>-</sup>427/1, MY111-2, GM103-4D, JRYΔ3, EP4-20A, Δyta10, Δyta12 und Δygr101w wurden modifiziert nach GIETZ et al. 1992 transformiert. Die Zellen wurden in YPGc Medium zu einer Dichte von  $1 \times 10^7$  Zellen/ml ( $OD_{600} = 0,5$ ) angezogen, abzentrifugiert und mit LiAc-TE (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris/HCl pH 7,0, 1 mM EDTA) gewaschen. Nach Resuspension der Zellen in 50 µl LiAc-TE wurden die Zellen mit 2,5 µl Spermien-DNA (20 mg/ml) und der zu transformierenden DNA versetzt. Es erfolgte eine weitere Zugabe von 350 µl 40% (v/v) PEG (20% PEG 4000, 20% PEG 600 in LiAc-TE). Die Ansätze wurden 30 min. bei 30°C und 15 min. bei 42°C inkubiert, abzentrifugiert, in TE gewaschen und auf Selektivmedium ausplattiert.

## 2.2.6 Gesamt-RNA Isolation und „Northern-Blot“

Hefe Gesamt-RNA wurde nach KÖHRER UND DOMDEY 1991 isoliert und in einem 1,5%igen Agarose-Formaldehyd Gel nach SAMBROOK et al. aufgetrennt.

Die RNA wurde nach SAMBROOK et al. 1989 auf eine Nylonmembran übertragen („Northern Blot“). Der Nachweis der spezifischen GmCox2 mRNA erfolgte mittels Hybridisierung mit einer DIG-markierten DNA-Sonde gegen die GmCOX2 Leitsequenz (SAMBROOK et al. 1989). Der Nachweis der Sonde erfolgte mit dem „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma „Roche“ lt. Anweisung des Herstellers. Als Chemilumineszenz Substrat wurde CSPD der Firma „Roche“ verwendet.

### 2.2.6.1 Herstellung der DIG markierten LSCox2 Sonde

Zur Herstellung der Sonde wurde mit den Restriktionsendonukleasen *Eco* RV und *Sal* I ein 360 bp großes Fragment aus der GmCOX2 Leitsequenz des Klons M3cox2(SRL) isoliert und die DNA mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma „Roche“ mit der „Random primed“ Methode lt. Anweisung des Herstellers markiert.

## 2.2.7 Mitochondrienisolation aus Hefe

### 2.2.7.1 Zellaufschluss mit Glasperlen

Hefe Mitochondrien wurden in einem Zellaufschluss mit Glasperlen modifiziert nach PRATJE UND MICHAELIS 1977 isoliert.

Die Zellen aus einer Über-Nacht-Kultur wurden geerntet, mit Wasser gewaschen und die Zellausbeute in g Nassgewicht bestimmt. Pro 1g Nassgewicht wurden die Zellen in 2 ml Lysiermedium (0,6 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA pH 7,4) resuspendiert und mit 3g Glasperlen (0,45-0,5 mm) versetzt. Die Zellen wurden durch neunmaliges Vortexen von je 30 sek. aufgeschlossen und der Überstand abgenommen.

Durch eine differentielle Zentrifugation bei 10 min. 3000 x g und 10 min. 15000 x g wurden die Mitochondrien von den Zellresten getrennt und geerntet.

Die Mitochondrien wurden wiederum in 1 ml Lysiermedium resuspendiert und die differentielle Zentrifugation bei 5 min. 1200 x g und 10 min. 17300 x g in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen wiederholt.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die isolierten Mitochondrien wurden bei -20°C gelagert.

#### 2.2.7.2 Enzymatischer Zellaufschluss

Hefe Zelle wurden in der logarithmischen Wachstumsphase ( $OD_{600} = 0,75 - 1,0$ ) geerntet und mit Na-K-Cl-Lösung (0,2% (w/v) NaCl, 0,2% (w/v) KCl) gewaschen. Pro 1g Nassgewicht wurden die Zellen in 3 ml SCK-Puffer (1,08 M Sorbit, 10 mM Citronensäure, 50 mM  $K_2HPO_4$ ) resuspendiert und der Suspension pro 1g Nassgewicht 0,15 ml  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1 mg Zymolyase-20T sowie 2 Tropfen 2M NaOH zugegeben. Durch eine 90minütige Inkubation der Suspension bei 30°C unter leichtem Schütteln wurden die Zellen sphäroblastiert.

Die Sphäroblasten wurden mit 1,2 M Sorbit gewaschen und in 10 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbit, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0,5% (w/v) BSA) aufgenommen. Durch 25 Stöße in einem Glashomogenisator wurden die Zellen aufgeschlossen.

Die Mitochondrien wurden durch differentielle Zentrifugation von 5 min. 1100 x g, 5 min. 1900 x g und 10 min. 15000 x g gewonnen und geerntet.

Die Mitochondrien wurden in 1 ml Waschpuffer (0,3 M Sucrose, 10 mM MOPS pH 7,5, 0,1% (w/v) BSA) aufgenommen und die differentielle Zentrifugation in 1,5 ml-Reaktionsgefäßen bei 5 min. 1200 x g und 10 min. 17300 x g wiederholt.

Alle Zentrifugationsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Mitochondrien wurden in Waschpuffer resuspendiert und bei -70°C gelagert.

#### 2.2.8 Quantifizierung mitochondrialer Proteine

Die Quantifizierung mitochondrialer Proteine wurde nach YAFFE 1991 durchgeführt.

Mitochondrien wurden 1:100 in 0,6% SDS gelöst und 5 min. bei 99°C denaturiert. Es wurde die  $OD_{280}$  dieser Lösung gegen 0,6% SDS gemessen. Eine Extrinktion von 0,21 entspricht 10  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  mitochondriales Protein.

### 2.2.9 Mitochondrienisolation aus Sojabohne

Mitochondrien wurden aus 7 Tage alten Sojabohnen Kotyledonen (*Glycine max* L. Merr, c.v. Stevens) nach DAY et al. 1985 isoliert. 100-200 g der Kotyledonen wurden in Homogenisierungspuffer (0,3 M Sucrose, 25 mM Natriumpyrophosphat, 2 mM EDTA, 10 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 1% (w/v) PVP-40, 1% (w/v) BSA, 20 mM Natriumascorbat, pH 7,5) in einem Mixer aufgeschlossen. Das Homogenat wurde filtriert und Zelltrümmer durch 10 min. Zentrifugation bei 1500 x g abgetrennt. Der Überstand wurde erneut 20 min. bei 17400 x g zentrifugiert und der resultierende Niederschlag in Waschpuffer (0,3 M Sucrose, 10 mM TES-NaOH pH 7,5, 0,1% (w/v) BSA mit einem Pinsel resuspendiert. Nach weiteren Waschungen in Waschpuffer wurde der Niederschlag 40 min. bei 40000 x g durch einen 0 – 4,4% PVP/Percollgradient (0,3 M Sucrose, 10 mM TES-NaOH pH 7,5, 0,1% (w/v) BSA, 28% (w/v) Percoll, 0 – 4,4% (w/v) PVP-40) zentrifugiert und die Mitochondrien als gelb erscheinende Bande am Grund des Zentrifugenbeckers gewonnen. Die Mitochondrien wurden erneut mit Waschpuffer gewaschen und bei  $-20^\circ\text{C}$  gelagert oder direkt für die *in vitro* Import Reaktionen verwendet.

### 2.2.10 Fraktionierung isolierter Mitochondrien

Die Fraktionierung von Mitochondrien wurde modifiziert nach GLICK et al. 1992 durchgeführt.

Mitochondrien wurden mittels Zellaufschluss mit Zymolyase und Glashomogenisator isoliert und quantifiziert. Je ein Teil der Mitochondrien wurde in M-Puffer (0,6 M Mannit, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA) und zur Generierung von Mitoplasten in MP-Puffer (0,06 M Mannit, 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 1 mM EDTA) resuspendiert und Mitochondrien bzw. Mitoplasten durch 10 min. Zentrifugation bei 17300 x g geerntet.

Die IMS Proteine, die im Überstand des MP-Puffer Ansatzes enthalten sind, wurden durch Zugabe von 1/10 Vol. 50% TCA gefällt, durch 10 min. Zentrifugation bei 17300 x g sedimentiert und mit Aceton gewaschen.

Je ein Teil der Mitochondrien und Mitoplasten wurde mit Proteinase K (0,1 mg/ml Endkonzentration) versetzt, die Ansätze wurden 30 min. auf Eis inkubiert und die Reaktion durch Zugabe von PMSF (1 mM Endkonzentration) abgestoppt. Die mit Proteinase K

behandelten Mitochondrien und Mitoplasten wurden ebenfalls durch Zentrifugieren von 10 min. 17300 x g geerntet.

Mitochondrien, Mitoplasten und die Proteine des IMS wurden in 2 x SDS Probenpuffer nach Laemmli 1970 resuspendiert und 5 min. bei 99°C erhitzt.

### **2.2.11 SDS Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS PAGE)**

Proteine wurden in einer eindimensionalen SDS PAGE nach LAEMMLI (1970) aufgetrennt.

Es wurde ein diskontinuierliches System mit einem Trenngel von 12% (w/v) Acrylamid und einem Sammelgel von 4% (w/v) Acrylamid verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 20-30 mA und 150-250 V durchgeführt.

Alternativ zum 12%igen Trenngel wurden exponentielle Gradientengele mit 10-15% (w/v) Acrylamid nach PRATJE et al. 1979 zur Auftrennung der mitochondrialen Proteine verwendet, da sie eine bessere Bandenschärfe erlaubten.

### **2.2.12 Zweidimensionale Polyacrylamidgelelektrophorese (2D PAGE)**

Die 2D PAGE wurde unter Verwendung des IPGphor IEF Systems der Firma Amersham Biosciences durchgeführt. Zur isoelektrischen Fokussierung der mitochondrialen Proteine wurden Immobiline DryStrips der pH Reichweite 3 – 10 NL, die in dem entsprechenden IPGphor Puffer hydriert wurden, verwendet. Die Durchführung der 2D PAGE erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Mit jeder Mitochondrien Präparation wurden jeweils mindestens zwei 2D PAGEs parallel durchgeführt, eines der Gele wurde mit kolloidaler Coomassie Lösung gefärbt und das andere auf eine Nitrozellulose Membran übertragen („Western BLot“). Die übertragenen Proteine wurden mit Ponceau S gefärbt und die GFP Proteine anschließend mit dem Anti GFP Antikörper spezifisch nachgewiesen („Immunodetektion“). Anhand der spezifischen Signale aus der Immunodetektion wurden die GFP Proteine in dem gefärbten Gel identifiziert und aus dem Gel isoliert.

### **2.2.13 Proteintransfer auf Nitrozellulose („Western Blot“)**

In einer SDS PAGE aufgetrennte Proteine wurden nach TOWBIN et al. 1979 mit Blottingpuffer (0,3% (w/v) Tris, 1,4% (w/v) Glycin, 20% Methanol) auf eine Nitrozellulosemembran (0,45 µm) übertragen.

Der Transfer erfolgte in einer Trans-Blot™ Cell Apparatur für 16 Std. bei 12 V und 50 mA.

### **2.2.14 Ponceau-Färbung von Proteinen**

Zur Färbung von Proteinen auf einer Nitrozellulose Membran wurde die Membran unter leichtem Schütteln für 15-30 min. in Ponceau S-Lösung inkubiert. Die Membran wurde anschließend mit 5% Essigsäure entfärbt und der Proteingehalt durch Scannen der Membran dokumentiert.

### **2.2.15 Immunodetektion von Proteinen**

Die Immunodetektion wurde mit dem Western Light™ Chemiluminescent Detection System der Firma Tropix nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Der Blocking Lösung wurden 4% Magermilchpulver zugegeben, die verwendeten primären und sekundären Antikörper wurden in Blocking Lösung verdünnt.

Als Chemilumineszenz Substrat wurde CSPD der Firma Roche verwendet.

### **2.2.16 Coomassie Färbung**

Zur Färbung von Proteinen im SDS Gel wurde das Gel 1 Std. in Coomassie Lösung (45% Methanol, 1% Eisessig, 0,125% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit 45% Methanol und 1% Eisessig entfärbt. Bei dem Färben und Entfärben von Gelen, die anschließend getrocknet wurden, wurde beiden Lösungen 2% Glycerin zugegeben.

### 2.2.17 Kolloidale Coomassie Färbung

Zur Färbung der Proteine im SDS Gel mit größerer Sensitivität wurde alternativ eine kolloidale Coomassie Lösung (17% (w/v) Ammoniumsulfat, 34 % Methanol, 3% Phosphorsäure 0,1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250) verwendet. Die Färbung der Gele erfolgte über Nacht. Gele, die mit kolloidaler Coomassie Lösung gefärbt worden waren, wurden anschließend mit 0,5% Phosphorsäure für mindestens 3 Stunden entfärbt.

### 2.2.18 *In vitro* Transkription/Translation

Die radioaktive Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin erfolgte in dem Kaninchenretikulozytenlysat-System TNT<sup>TM</sup> der Firma Promega nach Angaben des Herstellers.

Die markierten Proteinen wurden bei -20°C gelagert.

### 2.2.19 *In vitro* Import in isolierte Mitochondrien

*In vitro* Import Reaktionen von radioaktiv markierten Proteinen in isolierte Mitochondrien aus der Hefe und der Sojabohne wurden nach WHELAN et al. 1996 durchgeführt.

100-200 µg Mitochondrien wurden mit 180 µl Import-Puffer (0,3 M Sucrose, 50 mM KCl, 10 mM MOPS pH 7,5, 5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% (w/v) BSA, 1 mM Methionin, 0,2 mM ADP, 2 mM ATP, 2 mM GTP, 2 mM NADH, 5 mM Succinat, 5 mM DTT) sowie 5 µl radioaktiv markierter Proteine aus dem Kaninchenretikulozytenlysat versetzt und der Ansatz 1,5 Std. bei 25°C inkubiert. Die Hälfte des Ansatzes wurde mit Proteinase K (100 µg/ml) behandelt, der Proteinase K Verdau anschliessend durch Zugabe von 2 mM PMSF abgestoppt. Die Mitochondrien wurden geerntet, in 2 x SDS Probenpuffer nach LAEMMLI 1970 resuspendiert und in einer SDS PAGE aufgetrennt.

Das Gel wurde nach dem Lauf mit Coomassie gefärbt und getrocknet und die Autoradiographie durch Auflegen einer Tritium-Phosphorimagerplatte für 2 Tage bzw. eines Röntgenfilms für 4 Wochen nachgewiesen.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Untersuchungen zur Prozessierung der Leitsequenz des GmCox2 Proteins in Hefe

##### 3.1.1 Vergleich der Prozessierung von GmCox2 bei Import in Mitochondrien der Sojabohne und der Hefe

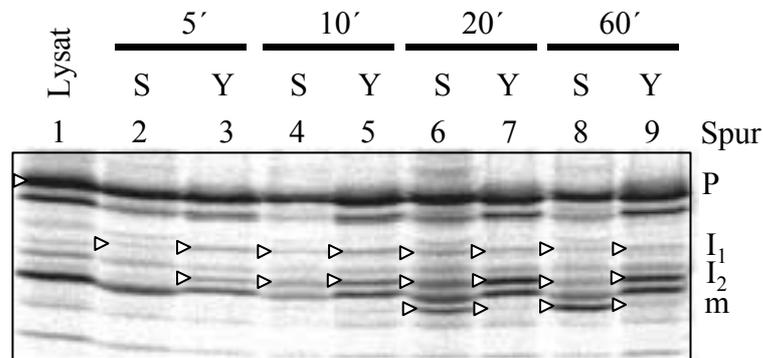
Das Cox2 Protein der Sojabohne (GmCox2) besitzt zum Import in die Mitochondrien eine 136 Aminosäurereste lange Leitsequenz, die in drei Schritten proteolytisch abgespalten wird. Es stellte sich die Frage, ob der Modellorganismus Hefe geeignet ist, diese Drei-Stufen Prozessierung näher zu charakterisieren. Es sollte deshalb zunächst überprüft werden, ob die GmCox2 Leitsequenz bei Import in isolierte Mitochondrien der Sojabohne und der Hefe gleichermaßen prozessiert wird.

In Zusammenarbeit mit dem Labor von Dr. Whelan wurde das GmCox2 Vorstufenprotein *in vitro* in einem Retikulozytenlysatsynthetisiert und durch den Einbau von [<sup>35</sup>S] Methionin radioaktiv markiert. Der Import des GmCox2 Proteins in isolierte Mitochondrien der Sojabohne und der Hefe wurde nach 5, 10, 20 und 60 Minuten abgebrochen, die mitochondrialen Proteine wurden in einem SDS Gel aufgetrennt und die Prozessierungsformen in einem Autoradiogramm nachgewiesen (Abb. 3.1.1).

Bei Import von GmCox2 in isolierte Mitochondrien der Sojabohne war nach 5 Minuten eine Bande nachweisbar die in dem Lysat nicht vorkommt und folglich durch die Prozessierung in den Mitochondrien entstanden war (Abb. 3.1.1, Spur 2). Diese Bande repräsentierte die erste intermediäre Form (I<sub>1</sub>) des Proteins. Die zweite intermediäre Form des Proteins (I<sub>2</sub>) war in den Sojabohnen Mitochondrien nach 10 Minuten nachweisbar (Spur 4), das reife Protein m nach 20 Minuten (Spur 6). Bei Import des Proteins in isolierte Mitochondrien der Hefe waren I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> bereits nach 5 Minuten nachweisbar (Spur 3), eine schwache Bande für das reife Protein konnte nach 20 Minuten detektiert werden (Spur 7).

Dieses Experiment zeigte, dass das GmCox2 Protein in den Sojabohnen und den Hefe Mitochondrien zu den gleichen Intermediaten sowie auch zum reifen Protein prozessiert wurde. Die Prozessierung in den Hefe Mitochondrien führte allerdings nur zu wenig reifem Protein, was darauf schließen lässt, dass in den Sojabohnen Mitochondrien weitere Faktoren vorhanden sind, die die Prozessierung beeinflussen.

Das Hefe System kann jedoch für die Identifizierung von Faktoren, die beim Import und der Prozessierung beteiligt sind, verwendet werden.



**Abb. 3.1.1: Vergleich der GmCox2 Prozessierung in Mitochondrien aus der Sojabohne und der Hefe**

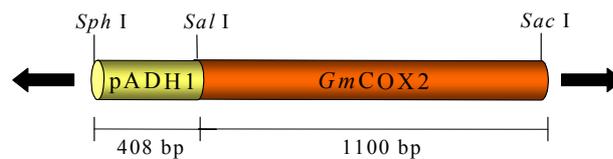
Das GmCox2 Protein wurde *in vitro* synthetisiert (Lysat) und in isolierte Mitochondrien aus der Sojabohne (S) und der Hefe (Y) importiert. Die Importreaktion wurde nach 5, 10, 20 und 60 Minuten abgestoppt, um die Entstehung der Prozessierungsformen zu analysieren.

P: Vorstufenprotein, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form des Proteins, m: reifes Protein

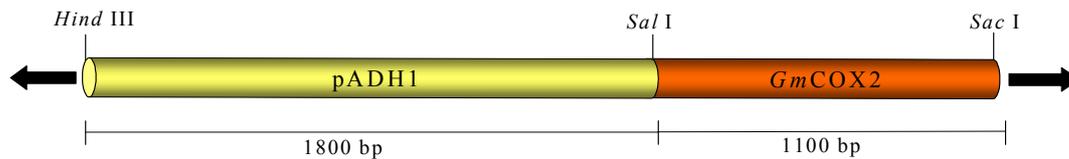
### 3.1.2 Expression des GmCOX2 Gens in Hefe

Zur Expression von GmCox2 in der Hefe wurde das GmCOX2 Gen stromabwärts des ADH1 Hefepromotors in den Hefevektor YEp352 kloniert (Abb. 3.1.2). Der Promotor der Alkoholdehydrogenase I (ADH1) wurde zur Expression des GmCOX2 Gens ausgewählt, da er ein konstitutiv exprimierender Promotor eines in Hefe stark exprimierten Gens ist. In dem Konstrukt pADH1(L)-GmCOX2 wurde das GmCOX2 Gen stromabwärts des gesamten ADH1 Promotors von 1,8 kb Länge inseriert, in dem Konstrukt pADH1(S)-GmCOX2 stromabwärts des minimalen 408 bp großen Promotor Fragmentes, das für die Expression des Gens in Hefe als ausreichend gilt.

YE<sub>p</sub> 352 - pADH1(S)-GmCOX2



YE<sub>p</sub> 352 - pADH1(L)-GmCOX2



**Abb. 3.1.2: Schematische Darstellung der GmCOX2 Konstrukte**

oben: Konstrukt pADH1(S)-GmCOX2 mit 408 bp ADH1 Promotor Fragment

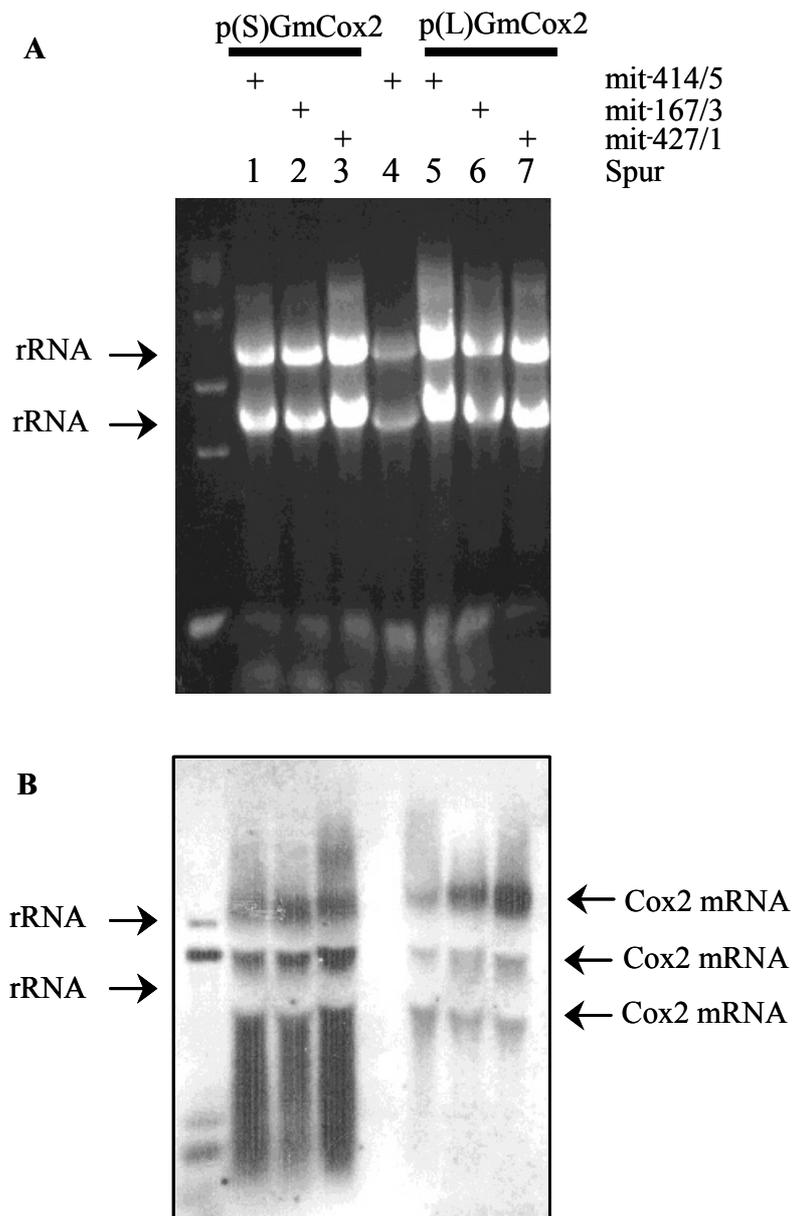
unten: Konstrukt pADH1(L)-GmCOX2 mit dem langen 1800bp ADH1 Promotor

In beiden Konstrukten wurde das GmCOX2 Gen über die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen *Sal* I und *Sac* I in den Vektor YE<sub>p</sub> 352 (→) stromabwärts des ADH1 Promotors inseriert.

Das GmCox2 Protein sollte zunächst in den Cox2 defizienten Hefe Mutanten 777-3A/mit<sup>-</sup>414/5, mit<sup>-</sup>167/3 und mit<sup>-</sup>427/1 exprimiert und die Expression des GmCOX2 Gens in einem „Northern Blot“ Experiment überprüft werden. Die mit<sup>-</sup> Mutanten besitzen Punktmutationen im mitochondrialen Genom, die einen Ausfall des Hefe Cox2 Proteins bedingen.

Die mit<sup>-</sup> Mutanten wurden mit den Konstrukten pADH1(S)-GmCOX2 und pADH1(L)-GmCOX2 transformiert und aus den Transformanten wurde Gesamt-RNA isoliert. Nach Auftrennung in einem Formaldehyd-Gel und Übertragung der RNA auf eine Nylonmembran („Northern Blot“) wurde die GmCOX2 mRNA mit einer Dig markierten DNA Sonde nachgewiesen, die von der Leitsequenz des kernkodierten GmCOX2 Gens abgeleitet worden war. Die Spezifität der Sonde wurde mit einer Gesamt RNA Extraktion aus dem untransformierten Stamm 777-3A/mit<sup>-</sup>414/5 überprüft (Abb. 3.1.3, Spur 4).

Die Detektion des Northern Blots zeigte in den Spuren der aus den Transformanten isolierten RNA Signale der Größen 4,0 kb, 2,6 kb und 1,5 kb (Abb. 3.1.4, Spuren 1-3, 5-7). Diese Signale waren in der RNA Präparation aus dem untransformierten Stamm nicht detektierbar und waren bei Expression des Gens durch den vollständigen Promotor und durch das minimale Promotor Fragment in allen transformierten mit<sup>-</sup> Stämmen gleich stark. Die 1,5 kb-Bande weist die für die GmCOX2 mRNA erwartete Größe auf, die anderen Banden sind darauf zurückzuführen, dass die Transkription über das Gen hinaus in den Vektor fortgesetzt wurde.



**Abb. 3.1.3: Nachweis der GmCOX2 mRNA in den Hefetransformanten 777-3A/mit<sup>-</sup> 414/5, mit<sup>-</sup>167/3 und mit<sup>-</sup>427/1**

In einem Agarose Gel wurden Gesamt RNA Präparationen aus den Cox2 defizienten mit<sup>-</sup> Mutantanten, die mit dem GmCOX2 Gen transformiert worden waren, aufgetrennt, mit Ethidiumbromid angefärbt (A) und auf eine Nitrozellulose Membran übertragen („Northern Blot“). Die GmCOX2 mRNA wurde auf der Membran mit einer Dig markierten Sonde gegen die Leitsequenz des GmCOX2 Gens nachgewiesen (B).

Aus dem Northern Blot Experiment konnte geschlossen werden, dass das GmCOX2 Gen in allen Hefe Transformanten durch den *ADHI* Promotor transkribiert wird. Das 408 bp große Promotor Fragment ist für die Transkription von GmCOX2 ausreichend.

Der 408 bp große Minimal Promotor wurde im Folgenden zur Expression aller GmCOX2 Konstrukte in Hefe verwendet.

### 3.1.3 Komplementationsanalyse von GmCox2 in Hefe

Das Northern Blot Experiment hat gezeigt, dass das GmCOX2 Konstrukt in den Hefemutanten transkribiert wird. Es sollte daran anschließend untersucht werden, ob das GmCox2 Protein in der Lage ist, den Atmungsdefekt der mit<sup>-</sup>414/5, mit<sup>-</sup>167/3 und mit<sup>-</sup>427/1 Mutanten zu komplementieren.

Aus dem Ausfall des Hefe Cox2 Proteins resultiert ein Atmungsdefekt der mit<sup>-</sup> Zellen. Die Mutanten sind deshalb nicht in der Lage, auf Medien zu wachsen, die als Kohlenstoffquelle Glycerin enthalten, da Glycerin nicht vergoren werden kann.

Die mit dem Konstrukt pADH1(S)-GmCOX2 transformierten mit<sup>-</sup> Mutanten wurden auf Glukose Medium angezogen und auf Glycerin Medium übertragen.

Keine Transformante konnte auf dem Glycerin Medium wachsen. Das GmCox2 Protein ist demnach nicht in der Lage, die Funktion des Hefe Cox2 Proteins zu übernehmen.

### 3.1.4 Nachweis des GmCox2 Proteins in Hefemitochondrien

Nachdem die vorausgehenden Untersuchungen gezeigt hatten, dass das GmCOX2 Gen zwar transkribiert wird, das GmCox2 Protein den Atmungsdefekt der mit<sup>-</sup> Mutanten jedoch nicht zu komplementieren vermag, sollte mit einem Western Blot Experiment untersucht werden, ob das GmCox2 Protein *in vivo* in den Hefe Mitochondrien nachweisbar ist.

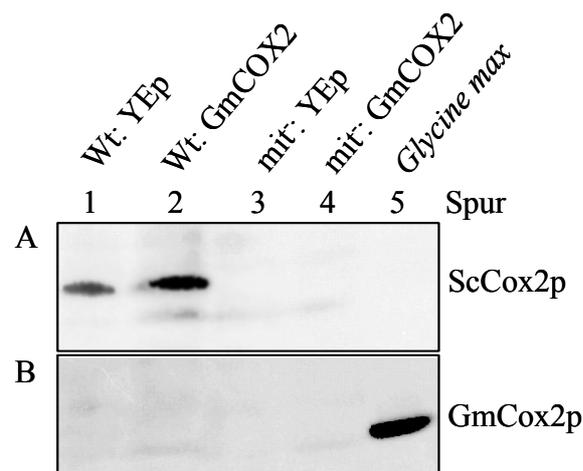
Mitochondriale Proteine, die aus den mit dem Konstrukt pADH1(S)-GmCOX2 transformierten Wildtyp und mit<sup>-</sup>427/1 Zellen isoliert worden waren, wurden in einer SDS PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran übertragen („Western Blot“). Das GmCox2 Protein wurde mit einem spezifischen Antikörper gegen das Hefe und das Sojabohnen Cox2 Protein detektiert (Abb. 3.1.4). Als Kontrolle für die Spezifität der Antikörper wurden Mitochondrien verwendet, die aus den mit dem Vektor YEp 352 transformierten Hefestämmen und aus der Sojabohne isoliert worden waren.

Bei Detektion mit dem Antikörper gegen das Hefe Cox2 Protein (ScCox2p) konnte in den Spuren der aufgetrennten Wildtyp Mitochondrien eine Bande nachgewiesen werden, die eine molare Masse von 29 kDa aufwies. Diese Bande repräsentierte das reife ScCox2 Protein (Abb. 3.1.4 A, Spur 1 und 2). In den Spuren der aus den mit<sup>-</sup> Mutanten isolierten Mitochondrien war das ScCox2 Protein nicht nachweisbar (Spur 3 und 4).

In der Spur der aufgetrennten Sojabohnen Mitochondrien Proteine konnte mit dem Antikörper gegen das Hefe Cox2 Protein kein Signal detektiert werden (Spur 5).

Bei Detektion der Membran mit dem Antikörper gegen das Sojabohnen Cox2 Protein (GmCox2p), konnte nur in der Spur der aufgetrennten Sojabohnen Mitochondrien Proteine eine Bande mit einer molaren Masse von 28 kDa nachgewiesen werden (Abb. 3.1.4 B, Spur 5). Diese Bande repräsentierte das reife GmCox2 Protein. Das Hefe Cox2 Protein konnte mit dem Antikörper gegen das pflanzliche Cox2 Protein in den Hefe Mitochondrien nicht nachgewiesen werden.

Das Western Blot Experiment zeigte, dass das GmCox2 Protein in den Mitochondrien der Wildtyp und der mit Transformanten weder mit dem Antikörper gegen das Hefe Cox2 Protein, noch mit dem Antikörper gegen das Sojabohnen Cox2 Protein nachweisbar war (Spuren 2 und 4).



**Abb. 3.1.4: Western Blot Analyse der GmCOX2 Transformanten**

Aus den mit dem GmCOX2 Gen transformierten Wildtyp (Wt) und mit<sup>427/1</sup> Zellen wurden mitochondriale Proteine isoliert, in einer SDS PAGE aufgetrennt und in einem Western Blot Experiment analysiert. Als Kontrolle für die Spezifität der Antikörper wurden Mitochondrien aufgetrennt, die aus der Sojabohne und aus den mit dem Vektor YEp352 (YEp) transformierten Hefe Zellen des Wildtypstammes und der Cox2 defizienten mit<sup>427/1</sup> Mutante isoliert worden waren.

A: Detektion der Membran mit einem Antikörper gegen das Hefe Cox2 Protein (ScCox2p)

B: Detektion der Membran mit einem Antikörper gegen das Sojabohnen Cox2 Protein (GmCox2p)

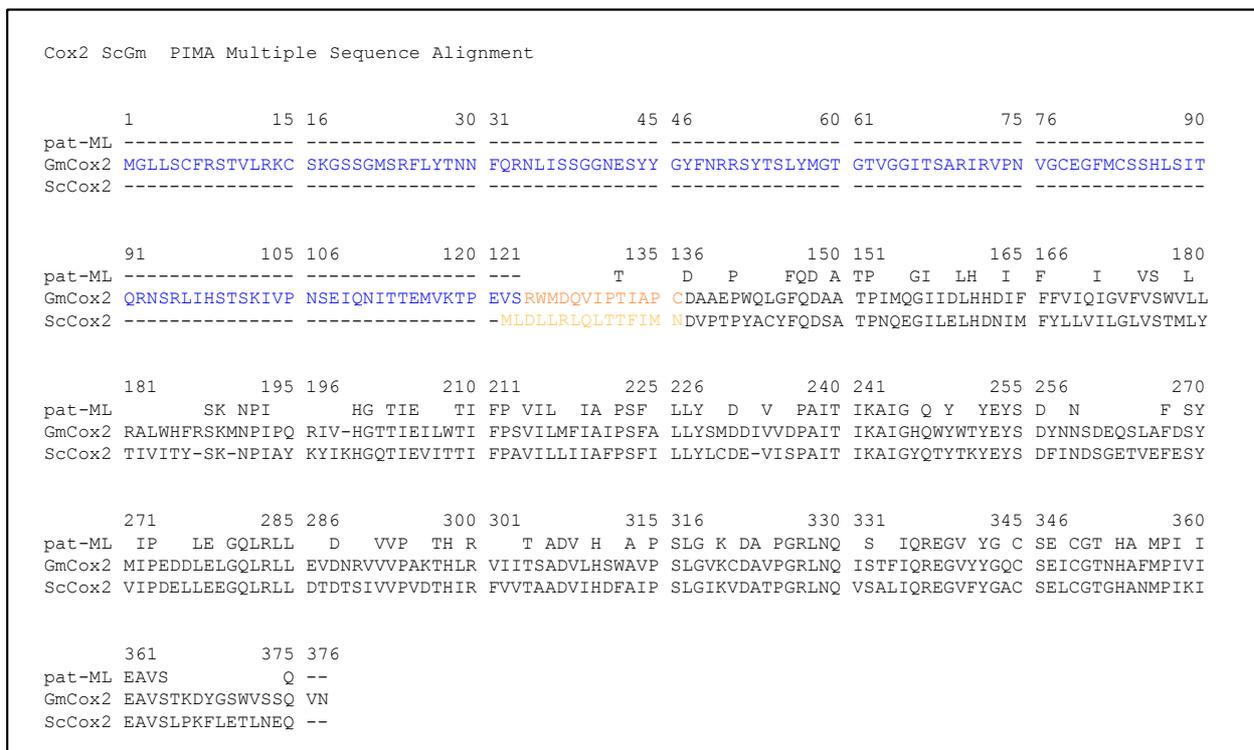
### 3.1.5 Austausch der Präsequenzen im GmCOX2 Gen

Das Western Blot Experiment in Abschnitt 3.1.4 hat gezeigt, dass das GmCox2 Protein in den Hefemitochondrien nicht nachweisbar war. Dies könnte möglicherweise dadurch bedingt sein, dass das GmCox2 Protein in der Hefe *in vivo* nicht korrekt in die Mitochondrien importiert, prozessiert oder in die innere Membran integriert wird. Ursachen dafür könnten auf Unterschiede im Bereich der Präsequenz der Cox2 Proteine zurückzuführen sein:

In Abb. 3.1.5 sind das kernkodierte Cox2 Protein der Sojabohne und das mitochondrial kodierte Cox2 Protein der Hefe vergleichend dargestellt.

Die Sequenz der reifen Cox2 Proteine beider Organismen zeigt eine Identität von 50,6%. Die Präsequenz des mitochondrial kodierten ScCox2p (gelb) und der vermutete letzte Teil der Leitsequenz des kernkodierten GmCox2p (orange) unterscheiden sich ihrer Sequenz jedoch in 14 von 15 Aminosäureresten.

Um zu klären, ob die Unterschiede in den Präsequenzen den Transport oder die Prozessierung des Cox2 Proteins beeinflussen, wurde für weitere Versuche die Präsequenz des GmCox2 Proteins gegen die Präsequenz des ScCox2 Proteins ausgetauscht.

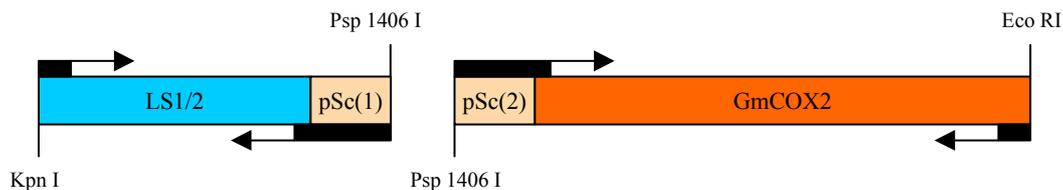


**Abb. 3.1.5: Vergleich der Sequenz des Cox2p aus der Sojabohne und der Hefe**  
 GmCox2p: Sequenz des kernkodierten Sojabohnen Cox2 Proteins – blau: Leitsequenz zum Import des Proteins in die Mitochondrien, orange: dritter Teil der Leitsequenz  
 ScCox2p: Sequenz des mitochondrial kodierten Hefe Cox2 Proteins – gelb: Präsequenz  
 pat-ML: identische Aminosäuren in den Cox2 Sequenzen der Hefe und Sojabohne  
 Die Sequenzen wurden mit dem Programm „PIMA Multiple Sequence Alignment“ verglichen

Der Austausch der Präsequenz des GmCox2 Proteins gegen die Präsequenz des ScCox2 Proteins sollte mittels PCR Amplifikation erfolgen. Dazu wurden Primer abgeleitet, die jeweils eine Hälfte des Gens für die Hefe Präsequenz enthielten. Die Hefesequenz in diesen Primern wurde von dem Teil des GmCOX2 Gens flankiert, der zum einen für die Leitsequenz und zum anderen für das reife GmCox2 Protein kodiert.

Da es möglich war, in die Sequenz der Hefe eine Schnittstelle für die Restriktionsendonuklease *Psp*1406 I einzuführen ohne die Aminosäuresequenz des Proteins zu verändern, konnten die amplifizierten Fragmente nach Restriktionsverdau mit *Psp* 1406 I ohne Verschiebung des Leserahmens zusammengefügt werden (s. Abb. 3.1.6).

Das resultierende Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 wurde durch eine 5' *Kpn* I- und eine 3' *Eco* RI-Schnittstelle in den *E. coli*-Vektor pUC 19 inseriert.

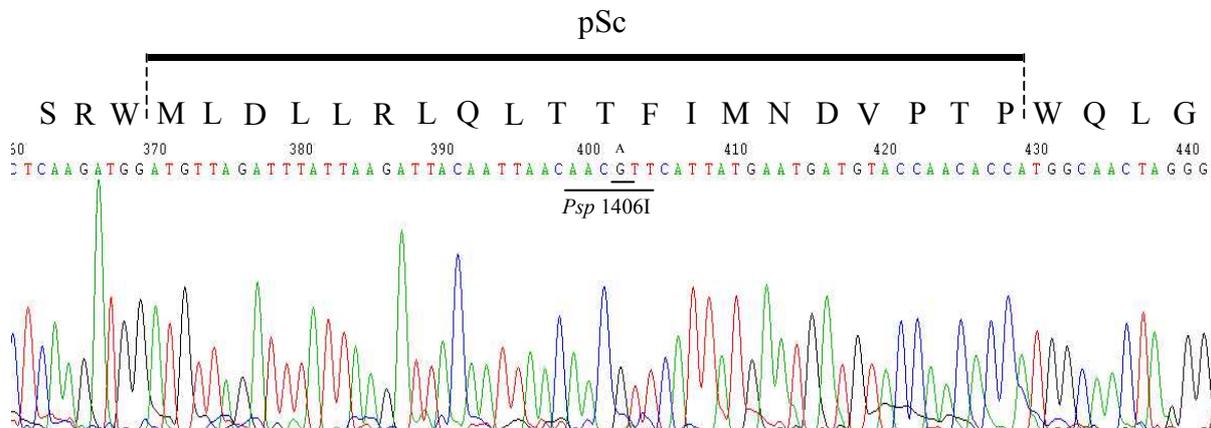


**Abb. 3.1.6: Schematische Darstellung der PCR Fragmente zum Austausch der Präsequenz im GmCOX2 Gen**

Mit den Primern GmCO2.5 und GmSc1 wurde in einer PCR Reaktion ein 400 bp großes Fragment amplifiziert, mit den Primern GmSc2 und GmCO2.6 ein 700 bp großes Fragment.

Beide Fragmente wurden nach Restriktion mit *Psp* 1406I zusammenligiert und unter Verwendung der *Kpn* I und der *Eco* RI Schnittstelle in den Vektor pUC 19 inseriert.

Eine Sequenzierung des pUC Klonen zeigte, dass die Hefe Präsequenz im Sojabohnen Gen ohne Verschiebung des Leserahmens und ohne Mutation inseriert war (Abb. 3.1.7).



**Abb. 3.1.7: Sequenzausschnitt des Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 Gens**

Die Präsequenz des Hefe Cox2 Proteins (pSc) wurde an der Stelle der Präsequenz des Sojabohnen Cox2 Proteins in das GmCOX2 Gen inseriert. Die in der Sequenz dargestellte *Psp* 1406I Schnittstelle, die durch den Austausch von Adenin zu Guanin in die Sequenz eingefügt werden konnte, wurde zur Ligation beider in der PCR amplifizierten Fragmente verwendet (s. Abb. 3.1.6).

Das Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 wurde aus dem Vektor pUC19 mit den Enzymen *Kpn* I und *Eco* RI ausgeschnitten und in den Vektor YEp 352 stromabwärts des ADH1 Promotors inseriert.

### 3.1.6 Komplementationsanalyse von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 in Hefe

In den Abschnitten 3.1.3 und 3.1.4 wurde gezeigt, dass das GmCOX2 Gen den Atmungsdefekt von Cox2 defizienten mit Hefezellen nicht komplementieren konnte und das Protein in den Mitochondrien der Hefe in einem Western Blot Experiment nicht nachweisbar war. Es sollte nun untersucht werden, ob nach Austausch der Präsequenzen Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 den Atmungsdefekt Cox2 defizienter Hefezellen komplementieren kann.

Der Cox2 defiziente Hefe Stamm mit 427/1 wurde mit dem Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 transformiert. Die Transformanten wurden nach Wachstum auf Glukose Medium auf Glycerin Medium übertragen.

Die Transformanten konnten auf dem Glycerin Medium nicht wachsen. Das GmCox2 Protein konnte auch nach Austausch der Präsequenz den Atmungsdefekt des mit<sup>-</sup> Stammes nicht komplementieren. Die fehlende Funktionalität des GmCox2 Proteins in Hefe war folglich eher auf eine unterschiedliche Assemblierung der Cytochrom *c* Oxidase Komplexe der Sojabohne und der Hefe zurückzuführen.

### 3.1.7 Nachweis von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 in Hefemitochondrien

In einem Western Blot Experiment sollte untersucht werden, ob das Protein Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 durch den Austausch der Präsequenz mit dem Antikörper gegen das Hefe- oder das Sojabohnen Cox2 Protein in den Mitochondrien der Hefetransformanten nachweisbar ist.

Dazu wurden aus Wildtyp und mit<sup>-</sup>427/1 Hefezellen, die mit den Konstrukten GmCOX2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 transformiert waren, Mitochondrien isoliert.

Als Kontrolle für die Spezifität beider Antikörper dienten Mitochondrien, die aus der Sojabohne *Glycine max* und aus den mit dem Vektor YEp 352 transformierten Hefestämmen isoliert worden waren.

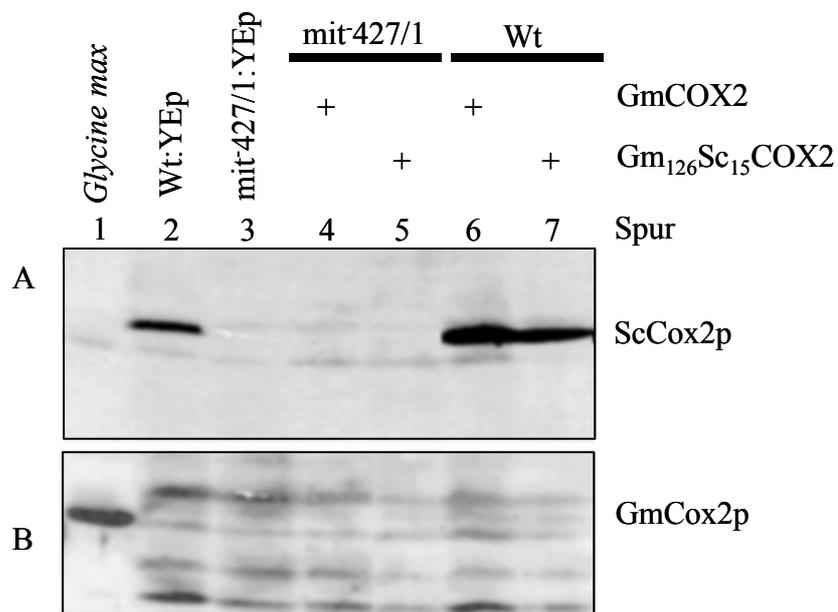
Bei Detektion der Membran mit dem Antikörper gegen das Hefe Cox2 Protein konnte das ScCox2 Protein in den Spuren der aus den Wildtypzellen isolierten Mitochondrien nachgewiesen werden (Abb. 3.1.8 A, Spur 2, 6 und 7). In den Mitochondrien, die aus den mit<sup>-</sup> Zellen isoliert wurden, war das ScCox2p nicht nachweisbar (Abb. 3.1.8 A, Spur 3, 4 und 5).

Das GmCox2 Protein war mit dem Antikörper gegen das Hefe Cox2 Protein nicht nachweisbar (Abb. 3.1.8 A, Spur 1, 4 und 7).

Bei Detektion der Membran mit dem Antikörper gegen das Sojabohnen Cox2 Protein (Abb. 3.1.8 B) konnte in der Spur der aus Sojabohnen isolierten Mitochondrien das GmCox2 Protein nachgewiesen werden (Abb. 3.1.8 B, Spur 1). Alle Signale, die in den Spuren der transformierten Hefezellen detektiert wurden (Abb. 3.1.8 B, Spuren 4 - 7), waren auch in den mit dem Vektor transformierten Zellen detektierbar und waren somit unspezifisch (Abb. 3.1.8 B, Spur 2 und 3).

Das GmCox2 Protein war folglich auch nach Austausch der Präsequenz im Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 in den Hefemitochondrien mit keinem der beiden Antikörper detektierbar.

Der Austausch der Präsequenz des kernkodierten Cox2 Proteins der Sojabohne gegen die Präsequenz des mitochondrial kodierten Cox2 Proteins der Hefe führte nicht zu einer Stabilisierung des GmCox2 Proteins in den Hefemitochondrien.



**Abb. 3.1.8: Western Blot Analyse der Cox2 Proteine mit ausgetauschter Präsequenz**

Mit den Konstrukten GmCOX2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 wurden Wildtyp (Wt) und mit Hefezellen transformiert und aus den Transformanten mitochondriale Proteine isoliert. Die Proteine wurden in einem Western Blot Experiment mit einem Antikörper gegen das Hefe und das Sojabohnen Cox2 Protein analysiert. Als Kontrolle wurden Mitochondrien aus der Sojabohne, sowie aus den mit dem Vektor YEp352 transformierten Hefezellen verwendet.

A: Detektion mit dem Antikörper gegen das Hefe Cox2 Protein (ScCox2p)

B: Detektion mit dem Antikörper gegen das Sojabohnen Cox2 Protein (GmCox2p)

### 3.1.8 *in vitro* Import der GmCox2 Konstrukte in Hefe Mitochondrien

Das GmCox2 Protein wird *in vitro* beim Import in isolierte Mitochondrien aus der Sojabohne in drei Schritten proteolytisch prozessiert. Beim Import des GmCox2 Proteins in Mitochondrien aus der Hefe wird jedoch nur sehr wenig reifes Protein gebildet (s. Abschnitt 3.1.1). Da weder das Protein GmCox2, noch das Protein Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 *in vivo* in den Hefemitochondrien nachweisbar waren, sollte untersucht werden, ob der Austausch der Präsequenz des GmCox2p gegen die Präsequenz des ScCox2p *in vitro* einen Einfluß auf den Import des Proteins oder auf die Prozessierung des Konstruktes zeigt.

Zur Untersuchung der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz *in vitro* wurden die Proteine GmCox2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 in einem Retikulozytenlysat *in vitro* synthetisiert und bei der Synthese durch den Einbau von [<sup>35</sup>S]-Methionin radioaktiv markiert.

Die markierten Proteine wurden mit isolierten Wildtyp Hefe Mitochondrien inkubiert und die Prozessierung der Proteine nach Auftrennung in einem SDS Gel in einem Autoradiogramm analysiert (Abb. 3.1.9). Zu einem Teil des Importansatzes wurde Proteinase K zugegeben, um diejenigen Proteine abzubauen, die nicht oder nicht vollständig in die Mitochondrien importiert waren.

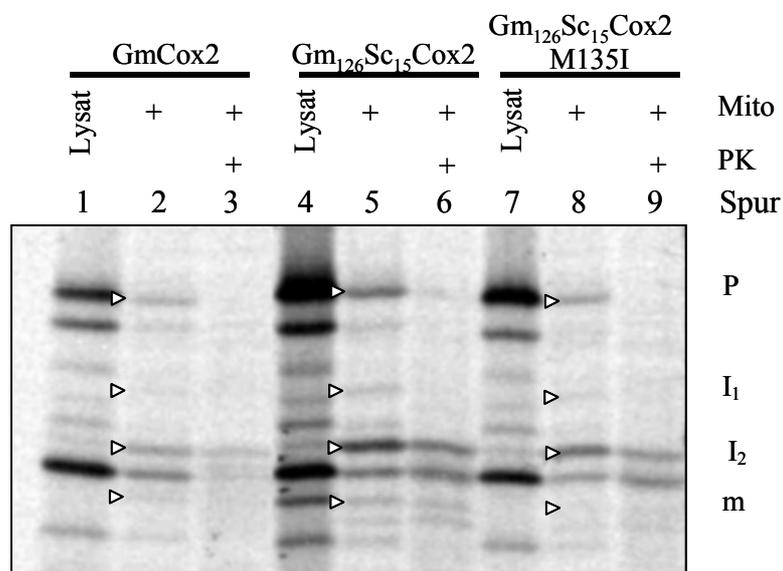
In der Spur des Importansatzes von GmCox2 (Abb. 3.1.9, Spuren 2 und 3) traten drei Banden auf, die in dem Lysat (Spur 1) nicht enthalten waren und folglich durch die Prozessierung in den Mitochondrien der Hefe entstanden waren. Diese Fragmente stellten die Prozessierungsintermediate I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> und das reife Protein m dar. I<sub>1</sub> war vor einem Abbau durch Proteinase K nicht geschützt, I<sub>2</sub> hingegen war Proteinase K resistent. Daraus ließ sich schließen, dass die Prozessierung zu I<sub>1</sub> zwar in den Mitochondrien stattfand, das Protein zu diesem Zeitpunkt jedoch nicht vollständig in die Hefemitochondrien importiert war. I<sub>2</sub> war hingegen vollständig in den Mitochondrien lokalisiert.

Die Prozessierung zum reifen Protein m war bei Import des GmCox2 Proteins in die Hefemitochondrien kaum nachzuweisen.

Beim Import des *in vitro* translatierten Proteins Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 (Abb. 3.1.9, Spur 4) in die Hefe Mitochondrien waren die Intermediate I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>, sowie das reife Protein m detektierbar (Abb. 3.1.9, Spur 5). I<sub>2</sub> und m waren durch den Import vor einem Abbau durch Proteinase K geschützt (Abb. 3.1.9, Spur 6). Im Lysat der *in vitro* Translation von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 lässt sich ebenfalls ein Protein erkennen, dessen molare Masse der des reifen Proteins entspricht (Abb. 3.1.9, Spur 4). Das ist darauf zurückzuführen, dass in der Gen Sequenz von

Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 im Bereich der Präsequenz ein Codon für ein Methionin enthalten ist, das eine alternative Startstelle für die Translation des Proteins darstellt. Aus dem Gebrauch dieses Startcodons resultiert ein Protein mit der molaren Masse der reifen Form. Um sicher zu stellen, dass das Fragment, das in der PK behandelten Spur (Spur 6) an der Stelle des reifen Proteins nachgewiesen wurde, tatsächlich ein Produkt der Prozessierung ist, wurde das entsprechende Methionin Codon in dem Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 M135I gegen das Codon für Isoleucin ausgetauscht. In Kooperation mit dem Labor von Dr. James Whelan wurde mir das Konstrukt für diese Untersuchungen freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Die Auftrennung des Lysates nach der *in vitro* Translation von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 M135I zeigte, dass die Eliminierung des Startcodons die Translation des Proteins mit der molaren Masse der reifen Form verhinderte (Abb. 3.1.9, Spur 7). Ein *in vitro* Import dieses Proteins wies jedoch weiterhin eine Bande mit der molaren Masse der reifen Form auf (Abb. 3.1.9, Spur 8), die vor dem Abbau durch Proteinase K geschützt war und folglich in den Mitochondrien lokalisiert ist (Abb, 3.1.9, Spur 9; Allerdings ist in den Spuren 8 und 9 das reife Protein kaum zu erkennen). Der Import der Cox2 Proteine in die Hefe Mitochondrien ist insgesamt nur sehr schwach.



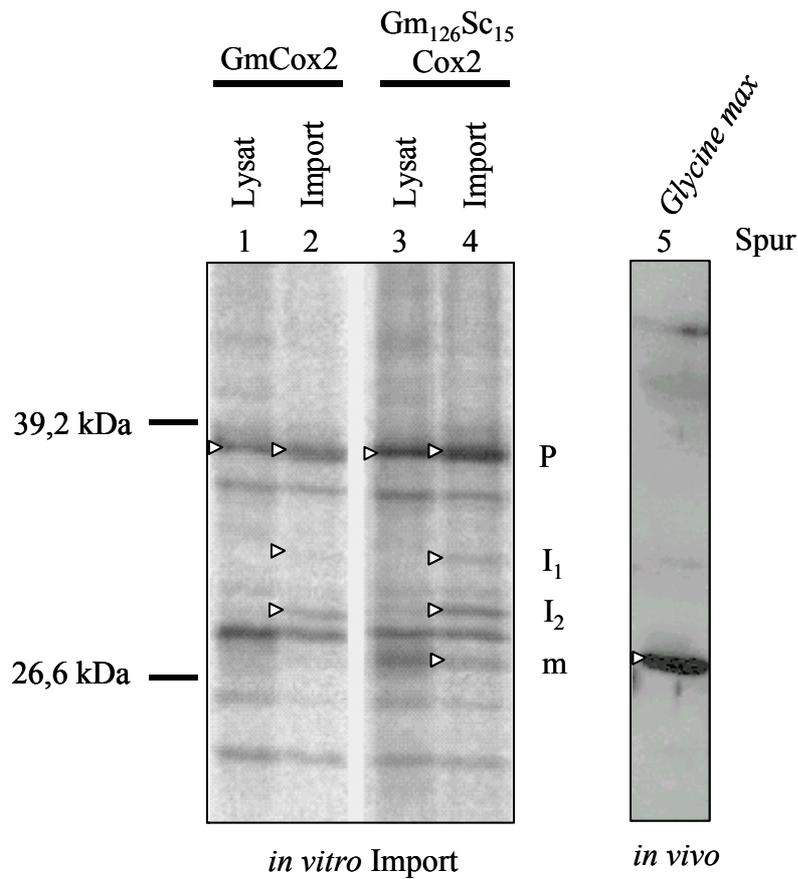
**Abb. 3.1.9: *In vitro* Import von GmCox2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 in isolierte Hefe Mitochondrien**

Die Proteine GmCox2, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 M135I wurden *in vitro* in einem Retikulozytenlysat synthetisiert und durch den Einbau von [<sup>35</sup>S] Methionin radioaktiv markiert (Spuren 1, 4 und 7). Die *in vitro* translatierten Proteine wurden anschließend mit isolierten Mitochondrien eines Hefe Wildtypstammes inkubiert (Spuren 2 und 3, 5 und 6, 8 und 9). Zur Kontrolle diente jeweils ein mit Proteinase K (PK) behandelter Ansatz, in dem nicht oder nicht vollständig importierte Proteine abgebaut wurden (Spuren 3, 6 und 9).

P: Vorstufenform, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form, m: reifes Protein

Um sicher zu stellen, dass das *in vitro* in den Hefe Mitochondrien entstandene reife Protein mit dem reifen Protein der Sojabohne übereinstimmt, wurden aus der Sojabohne isolierte mitochondriale Proteine und die *in vitro* Import Ansätze in einem SDS Gel aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Nach dem Transfer wurden die radioaktiv markierten Proteine autoradiographisch detektiert und das GmCox2 Protein der Sojabohne mit dem Anti-GmCox2 Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.1.10).

Der *in vitro* Import Ansatz des Proteins GmCox2 zeigte die Formen I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> (Abb. 3.1.10, Spur 2), der *in vitro* Import Ansatz des Proteins Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 zeigte zusätzlich das reife Protein m (Abb. 3.1.10, Spur 4). I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> beider Importansätze wiesen jeweils die gleiche molekulare Masse auf. Das reife Protein, das bei Import des Proteins Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 detektiert werden konnte, korrelierte mit der Bande für das reife GmCox2 Protein aus Sojabohnen Mitochondrien (Abb. 3.1.10, Spur 5). Die *in vitro* Prozessierung von GmCox2 in den Hefe Mitochondrien führt folglich zu einem reifen Protein mit gleicher molarer Masse wie die Prozessierung in der Sojabohne *in vivo*.



**Abb. 3.1.10: Vergleich der Prozessierung von GmCox2 in Hefe Mitochondrien *in vitro* mit der Prozessierung in Sojabohnen Mitochondrien *in vivo***

Die Proteine GmCox2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 wurden *in vitro* translatiert (Lysat) und in isolierte Hefe Mitochondrien importiert (Import). Nach dem Import wurden die Importansätze zusammen mit mitochondrialen Proteinen, die aus der Sojabohne isoliert worden waren, in einer SDS PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrozellulose Membran übertragen. Das Autoradiogramm (*in vitro* Import) wurde mit einer Detektion des reifen GmCox2 Proteins durch den Anti GmCox2 Antikörper verglichen (*in vivo*).

P: Vorstufenprotein, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form, m: reifes Protein

### 3.2 Untersuchungen zur Prozessierung von GFP Fusionsproteinen

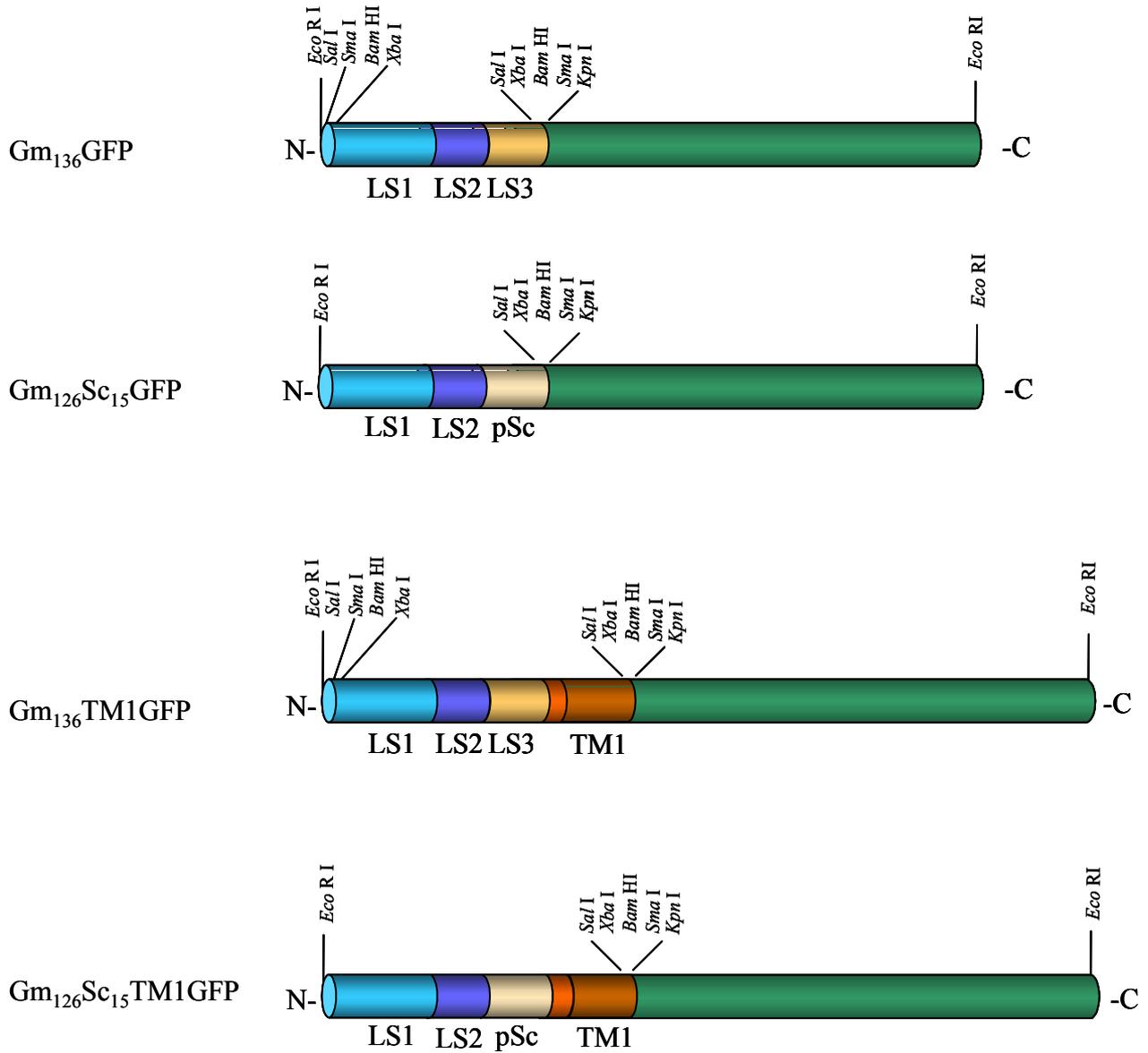
#### 3.2.1 Klonierung der GFP Fusionskonstrukte

Die *in vivo* und *in vitro* Experimente zur Prozessierung der GmCox2-Leitsequenz in Abschnitt 3.1 zeigten, dass das Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2, in dem die Präsequenz des Sojabohnen Cox2 Proteins gegen die des Hefe Cox2 Proteins ausgetauscht war, in die Hefe Mitochondrien importiert und in drei Schritten proteolytisch zur reifen Form prozessiert wurde. Das Protein war jedoch mit Antikörpern gegen das Hefe oder das Sojabohnen Cox2 Protein in den Hefe Mitochondrien *in vivo* nicht nachweisbar.

*In vitro* wurde das Protein in die Hefe Mitochondrien nur mit sehr geringer Effizienz importiert. Um die Untersuchungen zur Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz in den Mitochondrien unterschiedlicher Hefe Mutanten *in vivo* durchführen zu können, sollte die Leitsequenz der Konstrukte GmCox2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 mit einem Reporter gen fusioniert werden (Abb. 3.2.1). Für die Fusionskonstrukte wurde das "Green fluorescence protein" (GFP) verwendet, da das GFP Protein ein lösliches Protein ist, das in der Hefe nicht vorkommt. Gegen GFP sind spezifische monoklonale Antikörper für einen Proteinnachweis käuflich zu erwerben.

Zur Herstellung der Fusionskonstrukte Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP (Abb. 3.2.1) wurde das GFP Gen aus dem Vektor pGFP der Firma „Clontech“ isoliert und in den Hefe Vektor YEp352 inseriert. Die Leitsequenzen aus den Konstrukten GmCOX2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 wurden zusammen mit dem ADH1 Promotor in einer Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) amplifiziert und mit dem GFP Gen fusioniert.

Bei weiteren Konstrukten, Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP, wurde zusätzlich zur Leitsequenz aus den Konstrukten GmCOX2 und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>COX2 die erste Transmembrandomäne des GmCox2 Proteins (TM1) in der PCR amplifiziert, da gezeigt werden konnte, dass die erste Transmembrandomäne des Hefe Cox2 Proteins für den Transport des Proteins über die innere mitochondriale Membran und damit auch zur Prozessierung des Proteins in die reife Form notwendig ist (HE UND FOX 1997).



**Abb. 3.2.1: Schematische Darstellung der GFP Fusionskonstrukte**

Die GFP Fusionsgene wurden in den Vektor YEp352 hinter dem ADH1 Promotor (pADH1) inseriert.

blau: erster und zweiter Teil der Leitsequenz des Sojabohnen *COX2* Gens (LS1, LS2)

orange: dritter Teil der Leitsequenz des Sojabohnen *COX2* Gens (LS3)

beige: Präsequenz des Hefe *COX2* Gens (pSc)

rot: Sequenz aus dem Gm*COX2* Gen

braun: erste Transmembrandomäne des Sojabohnen *COX2* Gens (TM1)

GFP: Gen für das „Green fluorescence protein“

### 3.2.2 Prozessierung der GFP Konstrukte

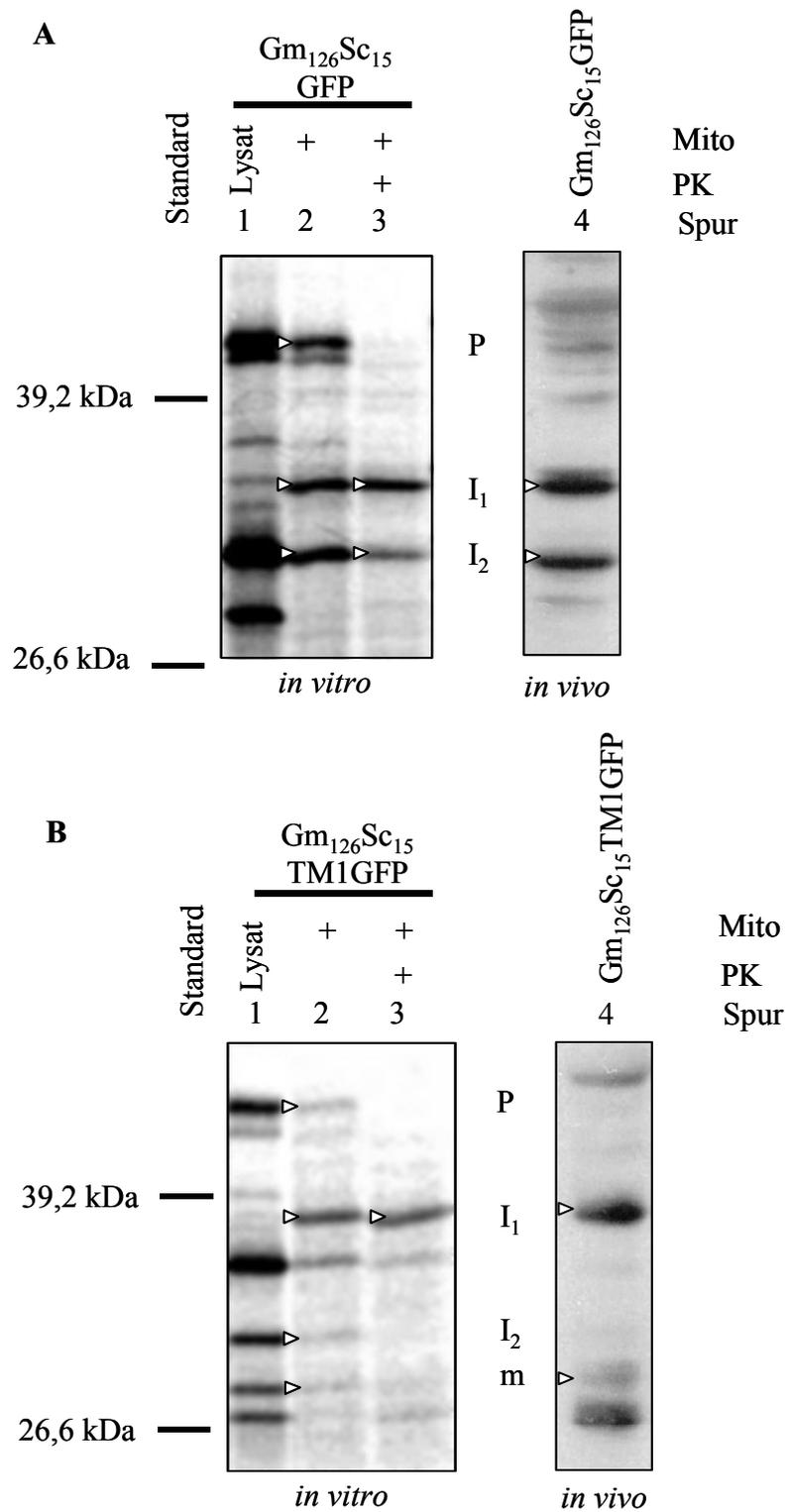
#### 3.2.2.1 Vergleich der Prozessierung der GFP Konstrukte *in vitro* und *in vivo*

Zunächst sollte untersucht werden, ob das GFP Protein *in vivo* in den verschiedenen Prozessierungsformen nachweisbar ist und ob die verschiedenen Prozessierungsformen der GFP Fusionsproteine *in vivo* mit dem Antikörper nachweisbar sind und denen entsprechen, die *in vitro* beim Import in isolierte Hefe Mitochondrien entstehen (Abb. 3.2.2).

Der *in vitro* Import des Proteins Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP in isolierte Hefe Mitochondrien zeigte die Prozessierung des Vorstufenproteins P zu den Intermediaten I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> (Abb. 3.2.2 A, Spuren 1 bis 6). In einem Western Blot Experiment mit dem Anti GFP Antikörper konnten in Hefe Mitochondrien aus den mit dem Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten Zellen ebenfalls beide intermediären Formen detektiert werden (Abb. 3.2.2 A, Spur 7). Alle Proteine wiesen *in vitro* und *in vivo* die gleiche molekulare Masse auf.

Ein *in vitro* Import des Proteins Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP zeigte die Prozessierung des Vorstufenproteins P zu den Intermediaten I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> und zur reifen Form m (Abb. 3.2.2, B Spuren 1 bis 6). In einer Western Blot Analyse mit dem Anti GFP Antikörper konnten in Hefe Mitochondrien, aus den mit dem Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten Zellen die erste intermediäre Form I<sub>1</sub> und das reife Protein m detektiert werden (Abb. 3.2.2, B Spur 7). I<sub>2</sub> war *in vivo* nicht nachweisbar.

Mit dem Vergleich der Prozessierung *in vitro* und *in vivo* konnte gezeigt werden, dass die GFP Fusionsproteine *in vivo* in den Hefe Mitochondrien mit dem Anti GFP Antikörper detektierbar sind. Die Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz unterscheidet sich *in vitro* und *in vivo* nicht. Die GFP Konstrukte können folglich dazu verwendet werden, die Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz *in vivo* in der Hefe zu untersuchen.



**Abb. 3.2.2: Identifizierung der Prozessierungsformen der Konstrukte Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP**  
 Radioaktiv markierte Vorstufenproteine der Konstrukte Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP wurden *in vitro* in isolierte Mitochondrien der Hefe importiert und zusammen mit Mitochondrien, die aus den mit Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten Hefe Stämmen isoliert worden waren, in einem SDS Gel aufgetrennt. Die Prozessierung der radioaktiv markierten Proteine wurde mittels Autoradiographie analysiert, das GFP Protein der Transformanten wurde mit dem Anti GFP Antikörper detektiert.

I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form, m: reife Form des Proteins, m<sub>k</sub>: Degradationsprodukt

A: *in vitro* Import und Western Blot (*in vivo*) von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP

B: *in vitro* Import und Western Blot (*in vivo*) von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP

### 3.2.2.2 Einfluss der Präsequenz und der ersten Transmembrandomäne auf die Prozessierung der GFP Konstrukte *in vivo* und *in vitro*

Ein Vergleich der Prozessierung von Gm<sub>136</sub>GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP *in vivo* sollte zeigen, ob die erste Transmembrandomäne des reifen GmCox2 Proteins oder der Austausch der Präsequenz des Sojabohnen Cox2 Proteins gegen die Präsequenz des Hefe Cox2 Proteins einen Einfluss auf die Prozessierung oder den Reexport des Proteins durch die innere mitochondriale Membran besitzen.

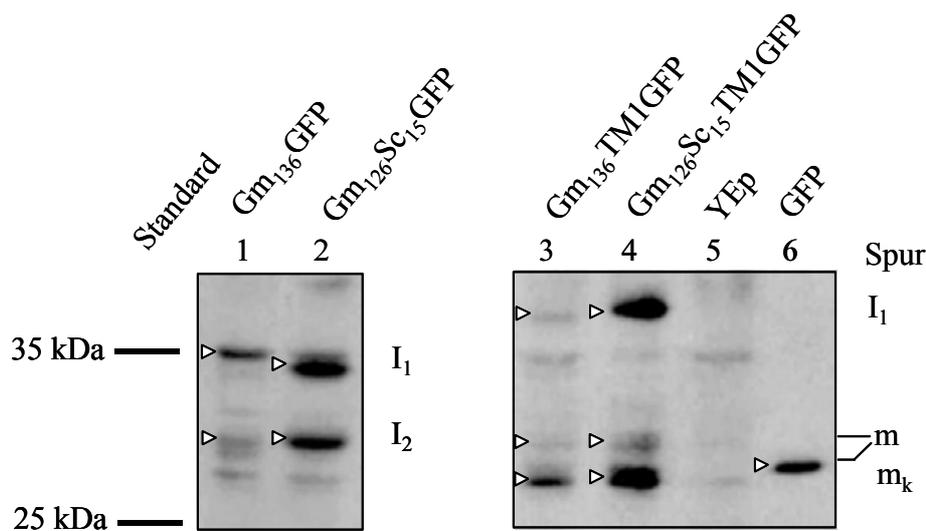
Ein Hefe Wildtypstamm wurde mit den Konstrukten Gm<sub>136</sub>GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformiert und die GFP Proteine in einem Western Blot Experiment mit einem monoklonalen Anti GFP Antikörper in den Mitochondrien der Transformanten nachgewiesen (Abb. 3.2.3).

Als Kontrolle für die Spezifität des verwendeten GFP Antikörpers dienten das in *E. coli* überexprimierte GFP Protein (Abb. 3.2.3, Spur 6) und Mitochondrien, die aus dem mit dem Hefe Vektor YEp352 transformierten Wildtyp Stamm isoliert worden waren (Abb. 3.2.3, Spur 5).

In den Mitochondrien aus den Konstrukten Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP Transformanten konnten die intermediären Formen I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> detektiert werden (Abb. 3.2.3, Spuren 1 und 2). Die Intermediate besaßen eine apparente molare Masse von 35 kDa und 32 kDa. I<sub>1</sub> des Proteins Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP migrierte in dem SDS Gel etwas schneller als das des Gm<sub>136</sub>GFP.

In den Mitochondrien aus den Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP Transformanten konnten die erste intermediäre Form I<sub>1</sub> mit einer molaren Masse von 38 kDa und das reife Protein m mit einer molaren Masse von 32 kDa detektiert werden (Abb. 3.2.3, Spuren 3 und 4). Zusätzlich war ein Fragment mit einer molaren Masse von 28 kDa nachweisbar (m<sub>k</sub>), das durch Abbau des GFP Proteins entstanden sein könnte. Das in den Transformanten nachweisbare reife Protein m besitzt wegen der ersten Transmembrandomäne des Cox2 eine größere molare Masse als das in *E. coli* exprimierte GFP Protein (Abb. 3.2.3, Spur 6).

Dieses Experiment zeigte, dass die Konstrukte ohne Transmembrandomäne *in vivo* nur zu den Intermediaten I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> prozessiert wurden, für die Prozessierung zum reifen Protein ist die erste Transmembrandomäne des reifen GmCox2 Proteins notwendig. Der Austausch der Präsequenz des Sojabohnen Cox2 Proteins gegen die Präsequenz des Hefe Cox2 Proteins hat keinen Einfluss auf die Prozessierung des Proteins.



### Abb. 3.2.3: Nachweis der GFP Fusionsproteine in Hefe Mitochondrien

Die in Abb. 3.2.1 dargestellten GFP Fusionsproteine wurden in einem Wildtyp Hefestamm exprimiert und das Protein in einem Western Blot Experiment mit einem Anti GFP Antikörper in den aus den Transformanten isolierten Mitochondrien nachgewiesen. Als Kontrolle wurde das GFP Protein in *E. coli* exprimiert und aufgetrennt.

$I_1$ ,  $I_2$ : erste und zweite intermediäre Form, m: reifes Protein,  $m_k$ : degradierte Form

Der *in vivo* durchgeführte Vergleich der Prozessierung der Konstrukte  $Gm_{136}GFP$ ,  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$ ,  $Gm_{136}TM1GFP$  und  $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$  sollte im folgenden in einem *in vitro* Import Experiment mit allen Vorstufenproteinen bestätigt werden.

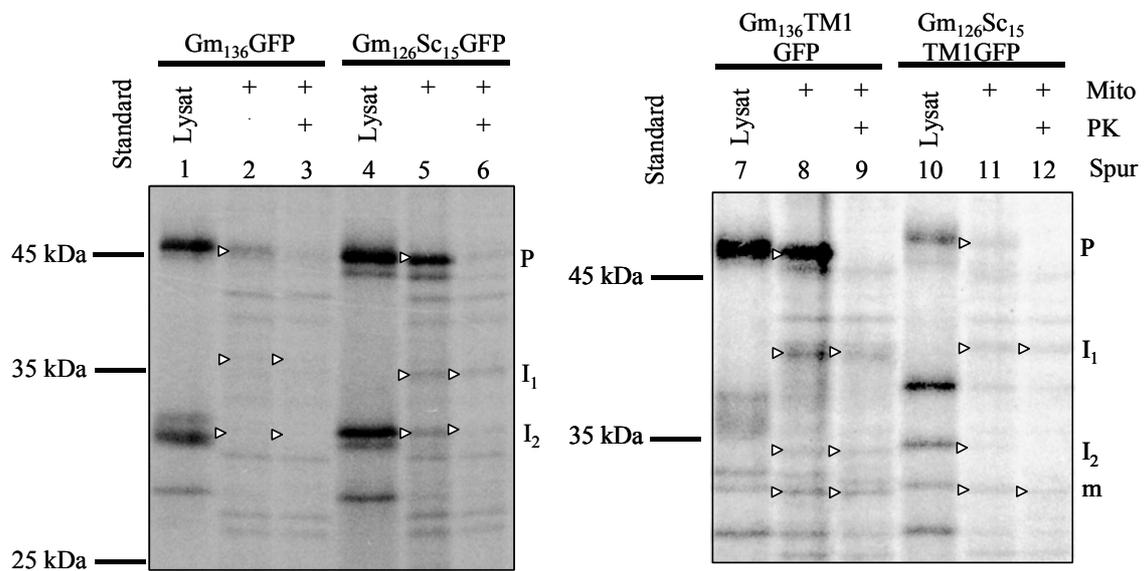
Die radioaktiv markierten Proteine  $Gm_{136}GFP$ ,  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$ ,  $Gm_{136}TM1GFP$  und  $Gm_{126}Sc_{15}M1GFP$  wurden in isolierte Mitochondrien eines Hefe Wildtypstammes importiert, ein Teil der Ansätze wurde jeweils mit Proteinase K verdaut, um alle Proteine zu degradieren, die nicht in die Mitochondrien importiert worden waren (Abb. 3.2.4).

Die Proteine  $Gm_{136}GFP$  (Abb. 3.2.4, Spuren 2 und 3) und das Protein  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  (Abb. 3.2.4, Spuren 5 und 6) wurden zu den Formen  $I_1$  und  $I_2$  prozessiert.

Das Protein  $Gm_{136}TM1GFP$  (Abb. 3.2.4, Spuren 8 und 9) und das Protein  $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$  (Abb. 3.2.4, Spuren 11 und 12) wurde zu  $I_1$ ,  $I_2$  und zum reifen Protein m prozessiert.

Die Prozessierung aller Vorstufenproteine ist demnach *in vitro* konform mit ihrer Prozessierung *in vivo*, allerdings ist *in vitro* das  $I_2$  Intermediat der Konstrukte mit Transmembrandomäne nachweisbar (Abb. 3.2.3). Das reife Protein m kann nur beim Import der Konstrukte entstehen, in denen die erste Transmembrandomäne des reifen  $GmCox2$  Proteins enthalten ist. Diese Domäne könnte, wie für das Hefe  $Cox2$  Protein bereits gezeigt

wurde, für den Reexport des Proteins durch die innere Membran notwendig sein. Das wäre ein Hinweis darauf, dass die Prozessierung zum reifen Protein im Intermembranraum stattfindet.



**Abb. 3.2.4: Vergleich der Prozessierung der GFP Konstrukte bei Import in isolierte Hefe Mitochondrien**

Radioaktiv markierte Vorstufenproteine von Gm<sub>136</sub>GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP (Lysat) wurden *in vitro* in isolierte Mitochondrien eines Hefe Wildtypstammes importiert (Mito) und die Prozessierung der Vorstufenproteine nach Auftrennung in einem SDS Gel in einem Autoradiogramm analysiert. Je ein Teil der Ansätze wurde mit Proteinase K (PK) verdaut, um zu überprüfen, ob die Proteine in die Mitochondrien importiert waren.

P: Vorstufenprotein, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form, m: reifes Protein

### 3.2.3 Untersuchungen zur mitochondrialen Lokalisation der GFP Fragmente

Um Hinweise auf den Importweg von GmCox2 und die Proteasen, die an den jeweiligen Prozessierungsschritten beteiligt sein könnten, zu erhalten, sollte die submitochondriale Lokalisation der Prozessierungsintermediate von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP untersucht werden.

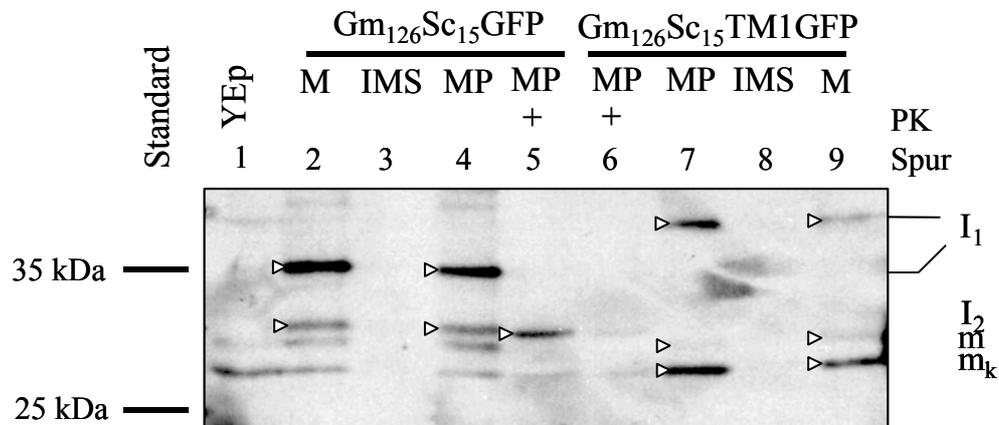
Aus den mit den Konstrukten Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten Wildtyp Zellen wurden Mitochondrien, Mitoplasten und lösliche Proteine des Intermembranraumes isoliert. Die Mitoplasten wurden zum Teil mit Proteinase K verdaut, um die Proteine abzubauen, die mit der inneren Membran assoziiert, größtenteils jedoch im Intermembranraum exponiert vorlagen. Proteine, die vollständig in der mitochondrialen Matrix lokalisiert waren, sollten hingegen vor dem Proteinase K Verdau geschützt sein.

Die Untersuchungen zur Lokalisation der Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP Intermediate ergaben, dass die I<sub>1</sub> Form beider Konstrukte durch den Proteinase K Verdau der Mitoplasten abgebaut werden konnte (Abb. 3.2.6, Spuren 5 und 6). Damit konnte gezeigt werden, dass nur ein Teil dieses Intermediates, obwohl es durch die Prozessierung beim Import in die Mitochondrien entstand, in der mitochondrialen Matrix lokalisiert war.

Die I<sub>2</sub> Form des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP (Abb. 3.2.6, Spur 2), war vor einem Abbau durch Proteinase K nahezu vollständig geschützt (Abb. 3.2.6, Spur 5), wurde nur geringfügig verkleinert. Dieses deutet darauf hin, dass der größte Teil des I<sub>2</sub> Intermediates in der mitochondrialen Matrix lokalisiert war, einige Aminosäurereste des N-Terminus jedoch in den Intermembranraum ragte, so dass diese durch Proteinase K abbaubar waren.

Das schwach zu detektierende reife Protein m der Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP Transformanten sowie die degradierte Form m<sub>k</sub>, die zusätzlich entstand, waren durch Proteinase K Behandlung der Mitoplasten vollständig abbaubar (Abb. 3.2.6, Spuren 6 und 7). Beide Formen waren demnach mit der inneren Membran assoziiert und in den Intermembranraum exponiert.

Diesen Ergebnissen zu folge könnte die Prozessierung der Leitsequenz durch die Mitochondriale Prozessierungspeptidase und die Innermembran Peptidase katalysiert werden.



**Abb. 3.2.6: Lokalisationsanalyse der GFP Fragmente**

Aus den mit den Konstrukten Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten Wildtypzellen wurden Mitochondrien (M), Mitoplasten (MP) und Proteine des Intermembranraumes (IMS) isoliert. Ein Teil der Mitoplasten wurde mit Proteinase K verdaut (MP+).

I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form, m: reifes Protein, m<sub>k</sub>: degradierte Form

### 3.2.4 Untersuchungen zur Beteiligung der Mitochondrialen Prozessierungspeptidase MPP an der Prozessierung der GFP Konstrukte

Nachdem die Fraktionierungen der Mitochondrien gezeigt haben, dass die Intermediate I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> des Proteins Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP in der Matrix lokalisiert sind und das reife Protein des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP in den Intermembranraum exponiert ist, sollten die Proteasen identifiziert werden, die an der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenzen beteiligt sind.

Wie erwähnt, katalysiert die MPP sowohl in der Hefe als auch in der Pflanze die Abspaltung des ersten Teils einiger mehrteiliger N-terminaler Leitsequenzen. Es sollte daher getestet werden, ob die MPP die Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz zu den Formen I<sub>1</sub> und eventuell auch zu I<sub>2</sub> katalysiert. Für diese Versuche stand die temperatursensitive Mutante *mas1ts* zur Verfügung, in der die MPP nach Inkubation der Zellen bei 37°C inaktiv ist.

Diese *mas1ts* Mutante wurde mit den GFP Fusionsproteinen Gm<sub>136</sub>GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformiert, die Transformanten 10 Std. bei Raumtemperatur angezogen und anschließend für 6 Std. bei 36°C inkubiert. Die Prozessierung der Fusionsproteine wurde in einem Western Blot Experiment mit isolierten Mitochondrien analysiert (Abb. 3.2.7). Die Intermediate, die in den *mas1ts* Mitochondrien gebildet wurden, wurden mit denen verglichen, die in den Mitochondrien der Wildtyp Transformanten detektiert werden konnten.

Zusätzlich zu den Intermediaten I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub>, die in den Wildtyp Mitochondrien detektierbar waren, waren in den *mas1ts* Mitochondrien mit dem Anti GFP Antikörper drei weitere Proteine mit einer molaren Masse von 45 kDa, 42 kDa und 40 kDa nachweisbar (Abb. 3.2.7 A, Spuren 1 und 2, 5 und 6). Die 45 kDa Proteine repräsentierten die unprozessierten Vorstufenproteine Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, die Proteine mit geringerer molarer Masse könnten entweder durch spätere Initiationen der Translation oder Abbau der Proteine entstanden sein.

In den *mas1ts* Mitochondrien, die aus den mit den Konstrukten Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten Zellen isoliert worden waren, waren mit dem Anti GFP Antikörper zusätzlich zu den in den Wildtyp Mitochondrien detektierten I<sub>1</sub> Form, dem reifen Protein m und dem degradierten Protein m<sub>k</sub> ebenfalls drei Proteine mit einer molaren Masse von 48 kDa, 45 kDa und 43 kDa nachweisbar (Abb. 3.2.7 B, Spuren 1 und 2, 5 und 6). Die 48 kDa Proteine repräsentierten die unprozessierten Vorstufenproteine Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP.

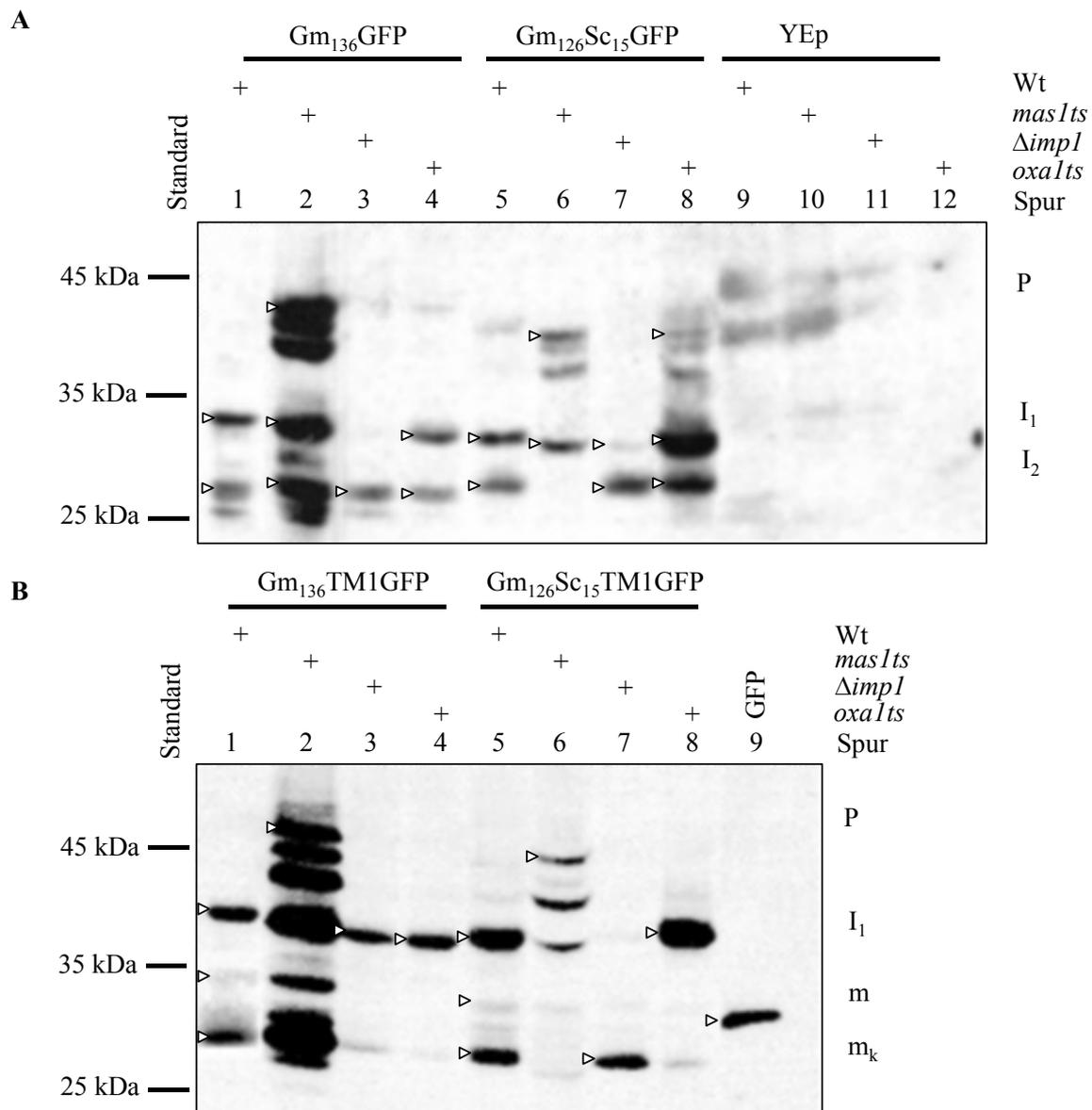
Durch das Auftreten der unprozessierten Vorstufenproteine in den Mitochondrien der *mas1ts* Mutante war nachgewiesen, dass die MPP eine Rolle bei der Prozessierung der Leitsequenz des GmCox2 Proteins hat. Die MPP könnte die Prozessierung zu I<sub>1</sub>, oder aber zu I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> katalysieren. In den *mas1ts* Mitochondrien waren zusätzlich zu den Vorstufenproteinen alle Intermediate, das reife Protein und m<sub>k</sub> nachweisbar, da in einer temperatursensitiven Mutante die Prozessierung der Proteine zunächst wie im Wildtyp abläuft, bevor der Mutanten Phänotyp durch Inkubation der Zellen bei höherer Temperatur induziert wird.

Eine Fraktionierung der Mitochondrien sollte zeigen, in welchem mitochondrialen Kompartiment das Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP Vorstufenprotein in der *mas1ts* Mutante lokalisiert ist. Mitochondrien, Mitoplasten und lösliche Proteine des Intermembranraumes wurden dazu in einem Western Blot Experiment mit dem Anti GFP Antikörper analysiert, ein Teil der Mitoplasten wurde mit Proteinase K verdaut, um die Proteine zu degradieren, die mit der inneren Membran assoziiert und in den Intermembranraum exponiert waren.

Das Vorstufenprotein P des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP war in den Mitochondrien und den Mitoplasten nachweisbar (Abb. 3.2.8, Spuren 2 und 4). Durch den Proteinase K Verdau der Mitoplasten konnte das Protein nicht degradiert werden (Abb. 3.2.8, Spur 5).

Zur Überprüfung der Mitoplasten Generierung wurde in den selben Fraktionen das Cytochrom *b*<sub>2</sub> Protein (Cyt *b*<sub>2</sub>) untersucht. Cyt *b*<sub>2</sub>, das ein lösliches Protein im Intermembranraum ist, war in den Mitochondrien und in der löslichen IMS Fraktion nachweisbar (Abb. 3.2.8, Spuren 2 und 3). Die Mitochondrien waren folglich quantitativ in Mitoplasten überführt worden.

Die Fraktionierung der *mas1ts* Mitochondrien zeigte somit, dass das Vorstufenprotein vollständig in der Matrix der *mas1ts* Mitochondrien lokalisiert ist und stärkt das Ergebnis, dass die MPP die Prozessierung der GFP Konstrukte zum ersten Intermediat I<sub>1</sub> katalysiert.



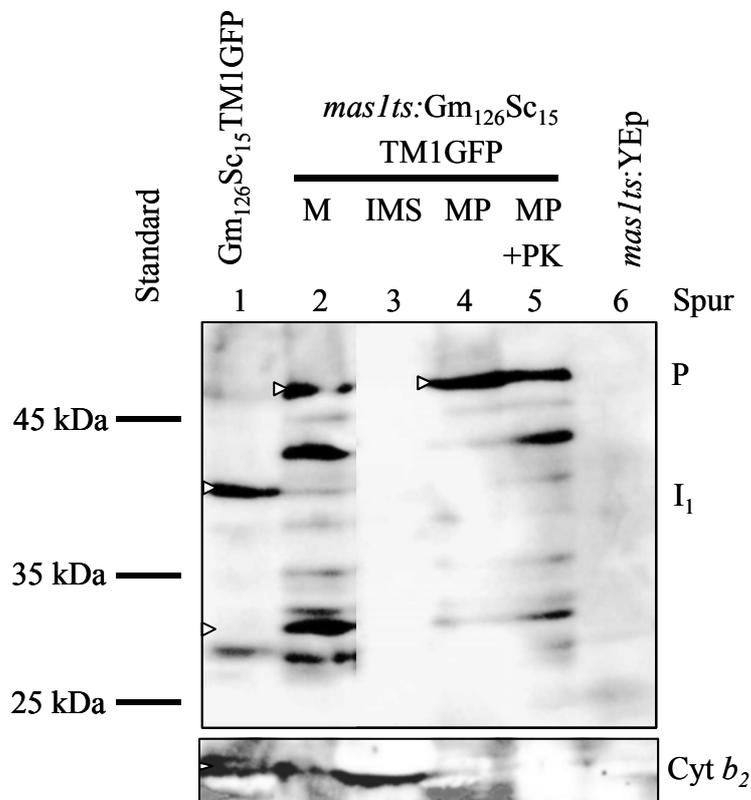
**Abb. 3.2.7: Untersuchungen zur Beteiligung von MPP, Imp1 und Oxa1 an der Prozessierung und der Sortierung der GFP Konstrukte**

Wildtyp (Wt), *mas1ts*, *Δimpl* und *oxa1ts* Zellen wurden mit den Konstrukten Gm<sub>136</sub>GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, Gm<sub>136</sub>TM1GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP und dem YEp352 Vektor (YEp) transformiert und das GFP Protein in den aus den Transformanten isolierten Mitochondrien mit einem monoklonalen Anti GFP Antikörper in einem Western Blot Experiment nachgewiesen. Als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers wurden das in *E. coli* überexprimierte GFP Protein (GFP) verwendet.

P: Vorstufenprotein, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form, m: reifes Protein, m<sub>k</sub>: degradiertes Protein

A: Western Blot Detektion der Konstrukte Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP

B: Western Blot Detektion der Konstrukte Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP



**Abb. 3.2.8: Lokalisation des  $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$  Vorstufenproteins in den *mas1ts* Mitochondrien**

Mitochondrien (M), Mitoplasten (MP) und lösliches Protein des Intermembranraumes (IMS) wurden aus den mit dem Konstrukt  $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$  transformierten *mas1ts* Zellen isoliert. Ein Teil der Mitoplasten wurde mit Proteinase K verdaut um die Proteine zu degradieren, die mit der inneren Membran assoziiert und in den Intermembranraum exponiert sind. Mit einem monoklonalen Antikörper wurden die Proteine in einem Western Blot Experiment sichtbar gemacht. Zur Kontrolle wurden Mitochondrien verwendet, die aus den mit dem Konstrukt  $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$  transformierten Wildtypzellen ( $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$ ) und den mit dem Hefektor YEp 352 transformierten *mas1ts* Zellen (*mas1ts:YEp*) isoliert worden waren.

Um den Grad der Mitoplasten Generierung zu überprüfen, wurde in einem zweiten Western Blot Experiment in den selben Fraktionen das lösliche Intermembranraumprotein Cytochrom *b*<sub>2</sub> (Cyt *b*<sub>2</sub>) mit einem Antikörper nachgewiesen.

P: Vorstufenprotein, I<sub>1</sub>: erste intermediäre Form

### 3.2.5 Untersuchungen zur Beteiligung der Innermembran Peptidase IMP an der Prozessierung der GFP Konstrukte

In einer Hefemutante mit fehlender Untereinheit 1 der Innermembran Peptidase, *Δimp1*, sollte untersucht werden, ob Imp1 die Abspaltung des letzten Teils der Leitsequenz des GmCox2 Proteins katalysiert.

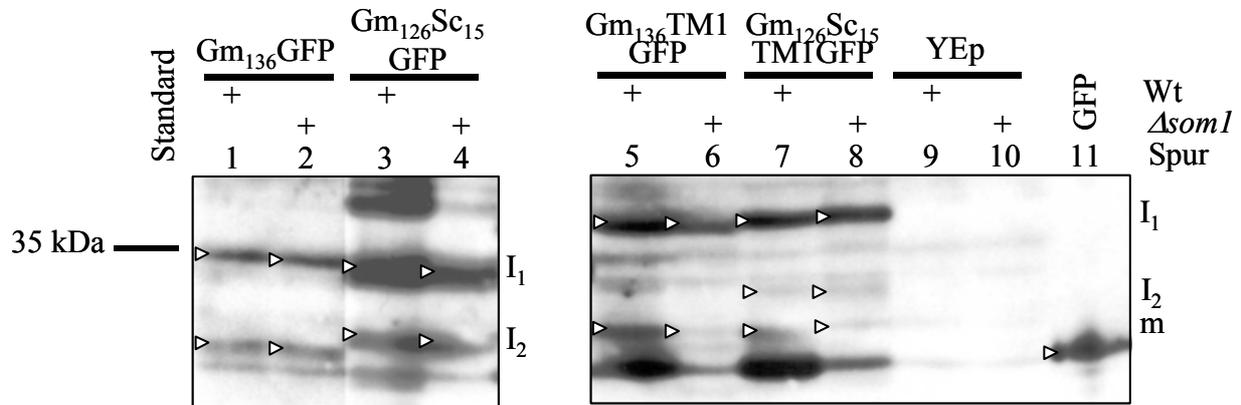
In Mitochondrien der Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten *Δimp1* Zellen waren die intermediären Formen I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> nachweisbar (Abb. 3.2.7 A, Spuren 3 und 7). Im Unterschied zum Wildtyp war allerdings mehr I<sub>2</sub> als I<sub>1</sub> detektierbar.

In den Mitochondrien der Gm<sub>136</sub>TM1GFP transformierten *Δimp1* Zellen waren lediglich I<sub>1</sub> und die Form m<sub>k</sub> detektierbar (Abb. 3.2.7 B, Spur 3), in Mitochondrien der Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten Zellen war nur m<sub>k</sub> nachweisbar (Abb. 3.2.7 B, Spur 7). Diese Ergebnisse sprechen für eine Beteiligung von Imp1 an der Reifung der Proteine Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP, da das reife Protein nicht nachweisbar war.

Für die Reifung des Hefe Cox2 Proteins ist außerdem die Untereinheit Som1 der Innermembran Peptidase notwendig. In einer Som1 Deletionsmutante, *Δsom1*, sollte deshalb untersucht werden, ob Som1 auch einen Einfluss auf die Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz ausübt.

Wie in den Transformanten des Wildtyps akkumulierten in Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten *Δsom1* Zellen die Intermediate I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> und in Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten *Δsom1* Zellen das Intermediat I<sub>1</sub>, das reife Protein m und das verkürzte Protein m<sub>k</sub> (Abb. 3.2.9). In den Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP Transformanten war zusätzlich das Intermediat I<sub>2</sub> nachweisbar (Abb. 3.2.9, Spuren 7 und 8). Dabei waren in den Wildtyp Transformanten die Banden für I<sub>2</sub> und das reife Protein ungefähr gleich stark, in den *Δsom1* Transformanten war das reife Protein jedoch reduziert. Damit konnte gezeigt werden, dass Som1 für die Imp1 vermittelte Reifung des Konstruktes Gm<sub>136</sub>TM1GFP nicht notwendig ist, jedoch an der Reifung von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP beteiligt sein könnte.

Diese Untersuchungen zur Identifizierung der an der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz beteiligten Proteasen lassen offen, von welcher Protease die Abspaltung des zweiten Teils der Leitsequenz katalysiert wird. Des Weiteren kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob das Intermediat I<sub>1</sub> oder aber I<sub>2</sub> durch die innere Membran transportiert wird.



**Abb. 3.2.9: Untersuchungen zur Beteiligung des Proteins Som1 an der Prozessierung der GFP Konstrukte**  
 Wildtyp (Wt) und  $\Delta som1$  Zellen wurden mit den Konstrukten Gm<sub>136</sub>GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, Gm<sub>136</sub>TM1GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP und dem Vektor YEp352 (YEp) transformiert und das GFP Protein in den aus den Transformanten isolierten Mitochondrien mit einem monoklonalen Anti GFP Antikörper in einem Western Blot Experiment nachgewiesen. Als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers wurde das in *E. coli* überexprimierte GFP Protein (GFP) verwendet.

I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form, m: reifes Protein

### 3.2.6 Untersuchungen zur Beteiligung von Oxa1 am Transport der GFP Konstrukte durch die innere Membran

Der N-terminale Export des Hefe Cox2 Proteins wird durch das Protein Oxa1 vermittelt. In einer temperatursensitiven *oxa1* Mutante, *oxal1ts*, sollte nach Transformation mit den GFP Konstrukten untersucht werden, ob Oxa1 auch für den Export des GmCox2 Proteins durch die innere Membran notwendig ist und ob die Präsequenz des Hefe Cox2 Proteins und der letzte Teil der Sojabohnen Cox2 Leitsequenz die gleiche Funktion für den Export der Fusionsproteine durch die innere Membran besitzen.

In den Mitochondrien der Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten *oxal1ts* Zellen konnten wie im Wildtyp die I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> Formen detektiert werden (Abb. 3.2.7 A, Spuren 4 und 8). In den Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten *oxal1ts* Zellen war im Vergleich zum Wildtyp I<sub>1</sub> stark vermehrt und das reife Protein m und das degradierte Protein m<sub>k</sub> konnten kaum nachgewiesen werden (Abb. 3.2.7 B, Spuren 4 und 8).

Wie die Fraktionierung der Mitochondrien gezeigt hatte, sind das reife Protein und die Form m<sub>k</sub> mit der inneren Membran assoziiert und in den Intermembranraum exponiert (s. Abschnitt 3.2.5). Dass diese Formen in den *oxal1ts* Mitochondrien nicht nachweisbar sind, spricht für eine Beteiligung von Oxa1 am Export der Proteine Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP durch die innere mitochondriale Membran. Die Proteine ohne Transmembrandomäne sind hingegen von der *oxa1* Mutation nicht beeinflusst.

### 3.2.7 Untersuchungen zur Beteiligung der mAAA Proteaseuntereinheiten Yta10 und Yta12 und des Proteins Pcp1 an der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz

Untersuchungen zur Prozessierung des Cytochrom *c* Peroxidase Proteins (Ccp1) konnten zeigen, dass der mAAA Protease Komplex Yta10/Yta12 und das Protein Pcp1 die Abspaltung der Ccp1 Leitsequenz katalysieren: in Hefe Stämmen mit fehlender Yta10 oder Yta12 Untereinheit wird das Ccp1 Vorstufenprotein angehäuft, in einem Hefe Stamm mit fehlendem Pcp1 eine intermediäre Form von Ccp1.

Es sollte untersucht werden, ob das kernkodierte Cox2 Protein der Sojabohne ein Substrat darstellen könnte.

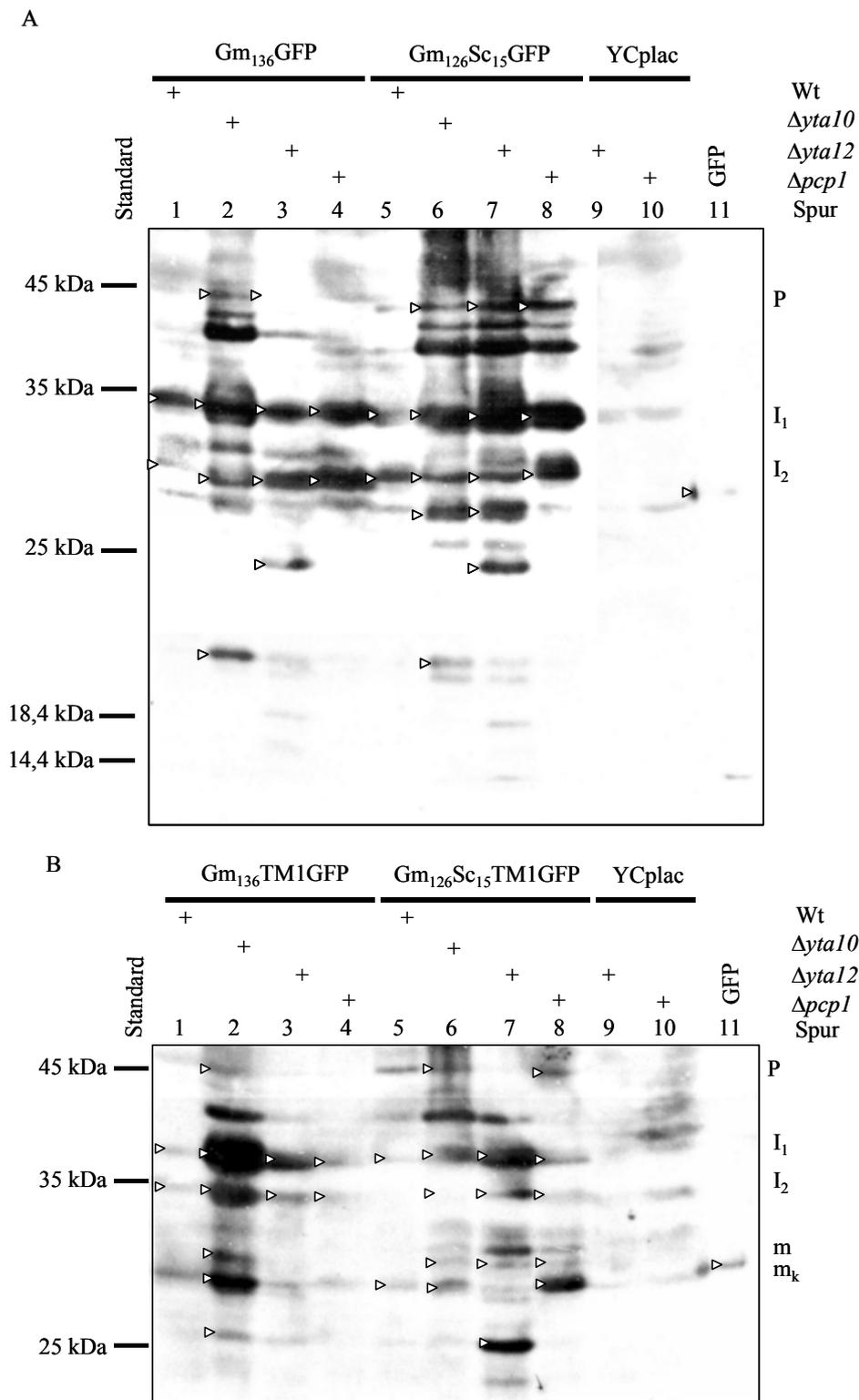
Mitochondrien, die aus den mit den Konstrukten Gm<sub>136</sub>GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten  $\Delta yta10$ ,  $\Delta yta12$  und  $\Delta pcp1$  und Wildtyp Zellen isoliert worden waren, wurden in einem Western Blot Experiment mit dem Antikörper gegen das GFP Protein analysiert (Abb. 3.2.10). Die Spezifität des Anti GFP Antikörpers wurde mit Mitochondrien, die aus den mit dem Vektor YCplac 111 transformierten  $\Delta yta12$  und  $\Delta pcp1$  Zellen und dem in *E. coli* überexprimierten GFP Protein überprüft.

In den Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten  $\Delta yta10$  und  $\Delta yta12$  Zellen waren das Vorstufenprotein P und wie in den Wildtyp Mitochondrien auch die Intermediate I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> detektierbar (Abb. 3.2.10A, Spuren 2 und 3, 6 und 7). In den  $\Delta yta10$  und  $\Delta yta12$  Transformanten mit Gm<sub>136</sub>TM1GFP oder Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP waren zusätzlich das reife Protein m und die Form m<sub>k</sub> nachweisbar (Abb. 3.2.10B, Spuren 2 und 3, 6 und 7). Eine Beteiligung von Yta10 und Yta12 an der Prozessierung der GFP Konstrukte ist damit eher unwahrscheinlich.

Dennoch konnten diese Untersuchungen zeigen, dass Yta10 und Yta12 kleinere GFP Fragmente in den Mitochondrien abbauen: Während in den Wildtyp Transformanten kein Fragment mit einer geringeren molekularen Masse als 28 kDa nachweisbar war, konnte in den  $\Delta yta10$  Transformanten der Konstrukte Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP ein Protein mit einer molekularen Masse von 20 kDa und in den  $\Delta yta12$  Transformanten ein Protein mit einer molekularen Masse von 24 kDa detektiert werden. Das 20 kDa GFP Protein wird demnach von der Yta10- und das 24 kDa GFP Fragment von der Yta12-Untereinheit der mAAA Protease spezifisch abgebaut.

In den Mitochondrien der Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten *Δpcp1* Zellen waren wie in den Wildtyp Transformanten die Intermediate I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> nachweisbar (Abb. 3.2.10A, Spuren 4 und 8). In den Mitochondrien, die aus den mit den Konstrukten Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten *Δpcp1* Zellen isoliert worden waren, waren ebenfalls wie in den Wildtyp Transformanten I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>, das reife Protein m und m<sub>k</sub> nachweisbar (Abb. 3.2.10B, Spuren 4 und 8).

Pcp1 zeigte demnach ebenfalls keinen Einfluss auf die Prozessierung der GFP Konstrukte.



**Abb. 3.2.9: Untersuchungen zum Einfluß von Yta10, Yta12 und Pcp1 auf die Prozessierung der GFP Konstrukte**

Mitochondrien, die aus den mit den Konstrukten Gm<sub>136</sub>GFP, Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP, Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten *Δyta10*, *Δyta12* und *Δpcp1* Zellen isoliert worden waren, wurden in einem Western Blot Experiment mit dem Antikörper gegen das GFP Protein analysiert. Zur Identifizierung der Prozessierungsformen wurden Mitochondrien aus den entsprechenden Wildtyp (Wt) Transformanten verwendet, als Kontrolle für die Spezifität des Antikörpers dienten die Mitochondrien, die aus den mit dem Vektor YCplac transformierten *Δyta12* und *Δpcp1* Zellen isoliert worden waren.

P: Vorstufenprotein, I<sub>1</sub>, I<sub>2</sub>: erste und zweite intermediäre Form, m: reifes Protein, m<sub>k</sub>: degradierte Form

### 3.3 Charakterisierung der Prozessierungsstellen in der Leitsequenz von GmCox2

#### 3.3.1 Auftrennung der Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP Mitochondrien in einer zweidimensionalen Gelelektrophorese

Die GmCox2 Leitsequenz wurde bei Import in Hefe Mitochondrien in drei Schritten proteolytisch prozessiert, dabei wurden die Proteine Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP durch die Mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) zum Intermediat I<sub>1</sub> und durch die Innermembran Peptidase (IMP) zum reifen Protein prozessiert. Die Protease, die die Prozessierung zum Intermediat I<sub>2</sub> katalysiert, konnte nicht identifiziert werden.

In der GmCox2 Leitsequenz sollten nun die Schnittstellen zur Prozessierung der I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> Formen lokalisiert sind. Mitochondriale Proteine der Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten Wildtyp Zellen sollten dazu in einer zweidimensionalen Polyacrylamid Gelelektrophorese (2D PAGE) aufgetrennt und die I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> Intermediate aus dem Gel isoliert werden. Durch eine Sequenzierung des N-Terminus dieser Fragmente sollten nach Möglichkeit die Schnittstellen für die Intermediate in der GmCox2 Leitsequenz ermittelt werden.

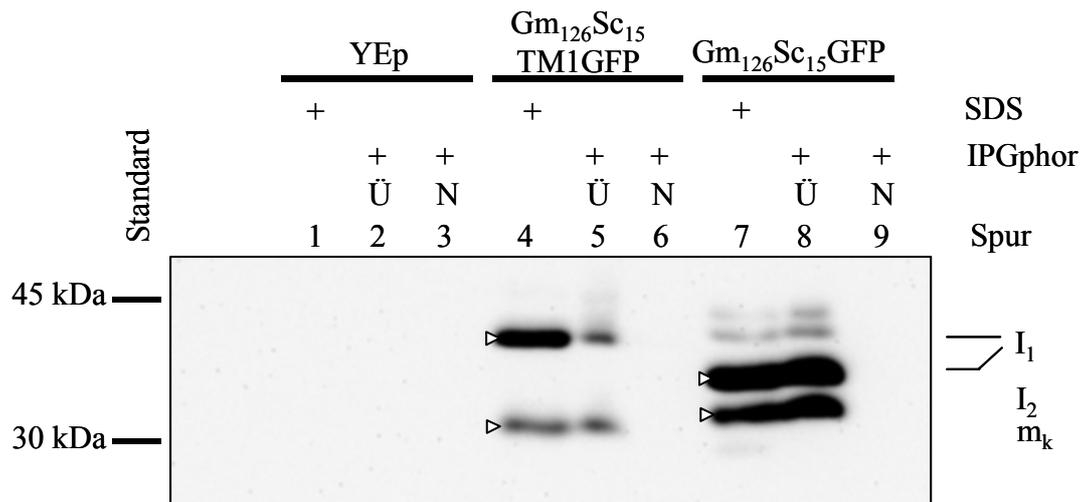
Zunächst sollte überprüft werden, ob mit dem in der IEF („Isoelektrische Fokussierung“) verwendeten IPGphor Probenpuffer die Intermediate der Konstrukte Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP quantitativ aus den Mitochondrien solubilisiert werden. Als Kontrolle wurden Mitochondrien aus untransformierten Wildtypzellen eingesetzt. Die Mitochondrien wurden in dem IPGphor Puffer suspendiert und die löslichen Proteine durch Zentrifugieren abgetrennt (Überstand Ü). Der verbleibende Niederschlag (N) wurde in SDS Probenpuffer gelöst und zusammen mit dem Überstand in einer SDS PAGE aufgetrennt.

Zum quantitativen Vergleich der Solubilisierung wurde der gleiche Teil der isolierten Mitochondrien in SDS Probenpuffer gelöst und ebenfalls in der SDS PAGE eingesetzt.

Die Proteine aus dem Gel wurden auf eine Nitrozellulose Membran übertragen und die GFP Proteine mit dem Anti GFP Antikörper spezifisch nachgewiesen (Abb. 3.3.1).

Das Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP war im Überstand des IPGphor Puffers als Intermediat I<sub>1</sub> und Intermediat I<sub>2</sub> detektierbar (Abb. 3.3.1, Spur 8). In dem nach der IPGphor Solubilisierung verbleibenden Niederschlag (N) waren keine GFP Proteine nachweisbar (Abb. 3.3.1, Spur 9). Mit dem IPGphor Puffer konnten die Intermediate I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP folglich quantitativ aus den Mitochondrien isoliert werden.

Das Konstrukt  $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$  war im Überstand des IPGphor Puffers (Abb. 3.3.1, Spur 5) als Intermediat  $I_1$  und als Form  $m_k$  nachweisbar. Die Signale waren im Überstand des IPGphor Puffers jedoch etwas schwächer als mit dem SDS Probenpuffer. Im Niederschlag des IPGphor Ansatzes waren die GFP Proteine dennoch nicht nachweisbar (Abb. 3.3.1, Spur 6).



**Abb. 3.3.1: Solubilisierung der GFP Proteine durch den IPGphor Probenpuffer**

Mitochondrien der mit  $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$ , und  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  oder den YEp352 Vektor (YEp) transformierten Hefe Wildtyp Zellen wurden in SDS Probenpuffer und in IPGphor Probenpuffer gelöst, in einer SDS PAGE aufgetrennt und die Proteine in einem Western Blot Experiment mit dem Anti GFP Antikörper spezifisch nachgewiesen. Die Ansätze zur Solubilisierung in dem IPGphor Probenpuffer wurden zentrifugiert und der Überstand direkt in der SDS PAGE eingestzt (Ü). Der verbliebene Niederschlag wurde in SDS Probenpuffer gelöst (N).

$I_1$ ,  $I_2$ : erste und zweite intermediäre Form,  $m_k$ : degradiertes Protein

Für die Auftrennung der  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  Intermediate in der 2D PAGE wurden die Mitochondrien aus  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  transformierten Zellen in dem IPGphor Puffer solubilisiert. Die mitochondrialen Proteine wurden zunächst ihrem isoelektrischen Punkt (pI) entsprechend in einem pH Gradienten fokussiert und anschließend gemäß ihrer molaren Masse aufgetrennt. Die Proteine mit gleicher molarer Masse und unterschiedlichem isoelektrischen Punkt konnten so voneinander separiert werden.

Die Auftrennung der Proteine in der 2D PAGE erfolgte parallel in zwei Gelen. Eines der Gele wurde mit einer kolloidalen Coomassie-Lösung gefärbt (Abb. 3.3.2 A), die Proteine aus dem

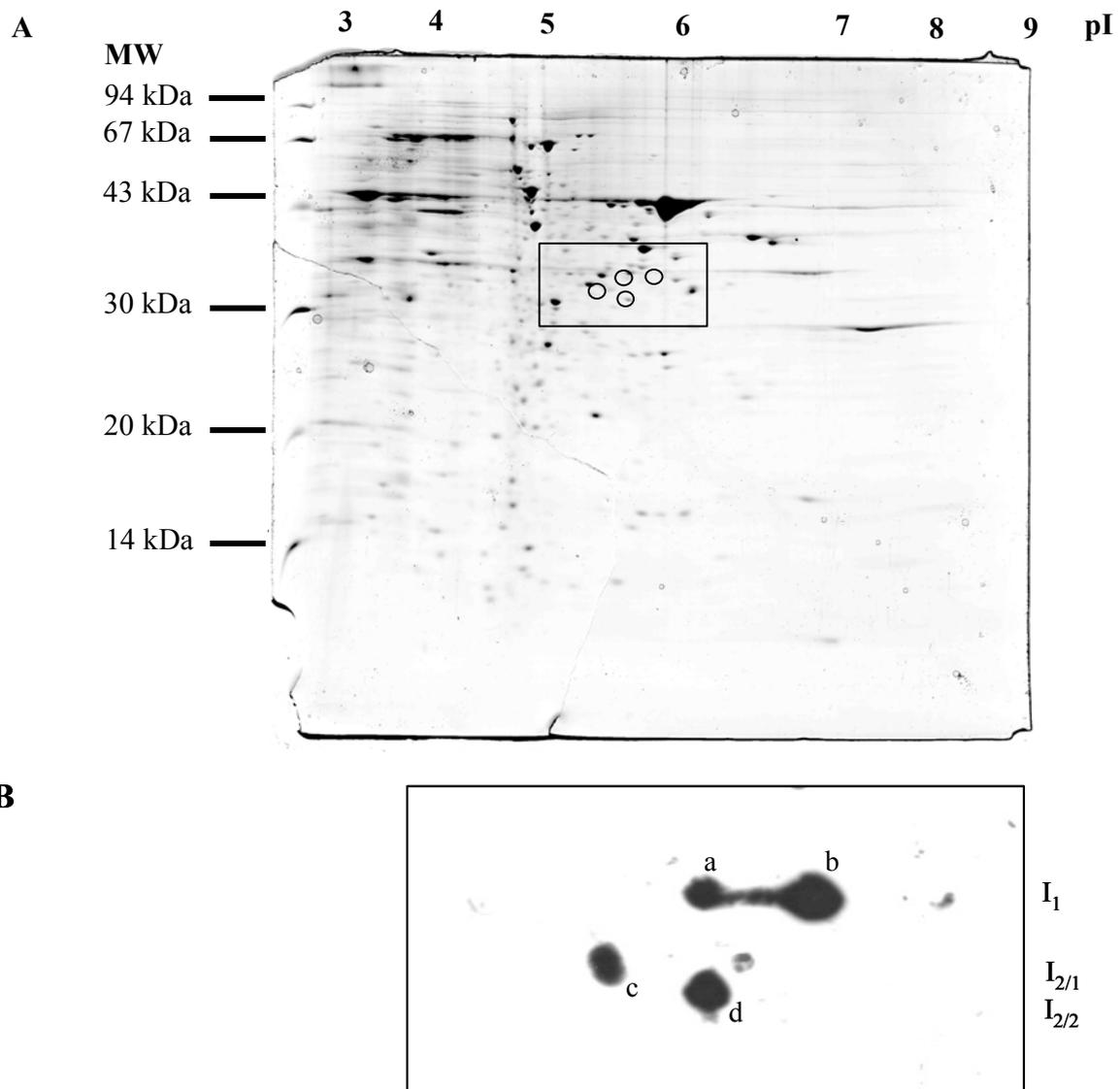
zweiten Gel wurden auf eine Nitrozellulose Membran übertragen und die GFP Intermediate mit dem Anti GFP Antikörper nachgewiesen (Abb. 3.3.2B).

Mit diesem Antikörper konnten insgesamt vier Signale detektiert werden. Zwei Signale mit einer molaren Masse von 35 kDa stellten die erste intermediäre Form ( $I_1$ ) des Konstruktes  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  dar (a und b). Das Vorkommen des  $I_1$  Intermediates mit unterschiedlichen isoelektrischen Punkten von pH 5,6 und pH 5,9 könnte auf eine posttranslationale Modifikation der Proteine zurückzuführen sein.

Das Intermediat  $I_2$  konnte in zwei Prozessierungsformen  $I_{2/1}$  (c) und  $I_{2/2}$  (d) mit einer molaren Masse von etwa 31,5 kDa und 31 kDa aufgelöst werden. Durch die weitere Prozessierung von  $I_{2/1}$  zu  $I_{2/2}$  kam es zu einer Verschiebung des isoelektrischen Punktes von pH 5,5 zu pH 5,6.

Die Prozessierung von  $I_{2/1}$  zu  $I_{2/2}$  kann auf eine ungenaue Prozessierung derselben Protease oder auf eine weitere Prozessierung durch eine weitere Protease zurückgeführt werden.

Eine Übertragung der Signale aus der Immunodetektion auf das gefärbte Gel zeigte, dass die Intermediate für eine N-terminale Sequenzierung nicht in ausreichender Menge vorlagen.



**Abb. 3.3.2: 2D PAGE der Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP Proteine**

Mitochondriale Proteine aus Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten Wildtyp Zellen wurden in zwei parallelen Ansätzen isoelektrisch in einem pH Gradienten fokussiert und anschließend in einer SDS PAGE ihrer molaren Masse gemäß aufgetrennt.

A: Coomassie Färbung des SDS Gels

B: Ausschnitt aus der Immunodetektion des geblotteten Gels mit dem Anti GFP Antikörper

a und b: erste intermediäre Form I<sub>1</sub>, c: zweite intermediäre Form I<sub>2/1</sub>, d: zweite intermediäre Form I<sub>2/2</sub>

### 3.3.2 Theoretische Analyse der I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> Intermediate von Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP

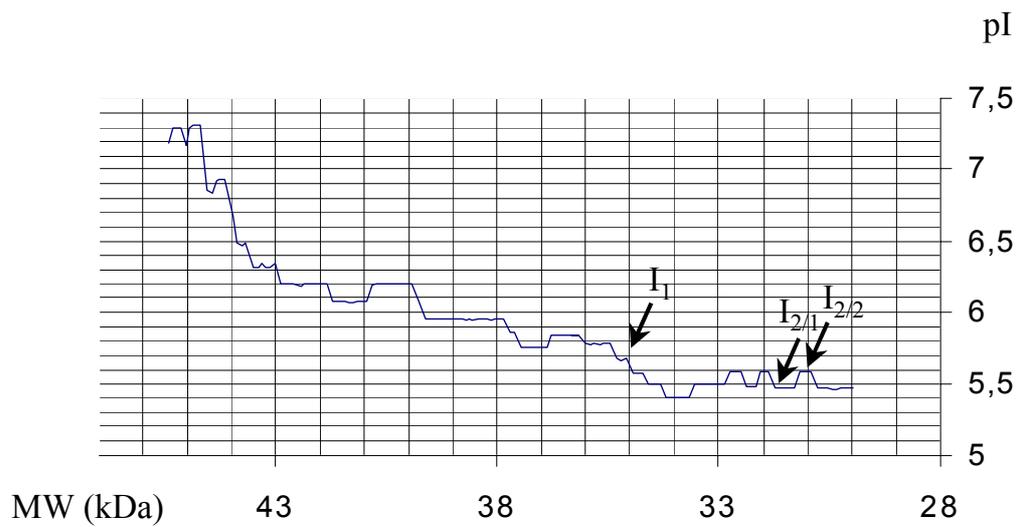
Wie die Untersuchungen zur Prozessierung der GmCox2 Leitsequenzen in Abschn. 3.2 und die 2D PAGE (Abb. 3.3.2) zeigten, besitzt das Intermediat I<sub>1</sub> des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP eine molare Masse von 35 kDa, die Prozessierung zu I<sub>1</sub> wird von der MPP katalysiert. In der Aminosäuresequenz des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP findet sich bei Aminosäurerest 93 die mögliche MPP Schnittstelle R N ↓ S, aus der ein Protein mit einer molaren Masse von 35 kDa resultiert. Der isoelektrische Punkt dieses Fragmentes, der in der 2D PAGE ermittelt wurde, kann die Schnittstelle nicht näher charakterisieren, da das Protein durch eine posttranslationale Modifikation in zwei Isoformen vorkommt.

Im Gegensatz dazu sollte die Verschiebung des isoelektrischen Punktes von I<sub>2/1</sub> zu I<sub>2/2</sub> helfen, das I<sub>2</sub> Intermediat näher zu charakterisieren und die Schnittstelle in der Sequenz zu identifizieren.

Von der Aminosäuresequenz des Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP Konstruktes wurden dazu theoretisch die N-terminalen Aminosäurereste deletiert für jedes und mit dem Programm „Compute pI/MW“ der ExPASy Proteomics tools-Homepage (<http://us.expasy.org/tools>) resultierende Fragment das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt bestimmt. Beide Werte wurden graphisch gegeneinander aufgetragen (Abb. 3.3.3).

Die Grafik zeigt im Bereich der molaren Massen der I<sub>2</sub> Fragmente von 31,5 kDa und 31 kDa eine Verschiebung des isoelektrischen Punktes der Fragmente von 5,47 auf 5,6. Dieses ist konform mit der in der 2D PAGE nachgewiesenen Verschiebung des isoelektrischen Punktes bei Prozessierung des Fragmentes I<sub>2/1</sub> zu I<sub>2/2</sub>.

Eine Übertragung der Werte in die Aminosäuresequenz des Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP Proteins zeigt, dass die Schnittstelle zu den I<sub>2</sub> Intermediaten zwischen den Aminosäureresten 125 und 128 lokalisiert sind. Die Proteinsequenz in dieser Umgebung, R W M L D L, beinhaltet eine mögliche MPP Schnittstelle, R W M ↓ L, und eine mögliche Imp1 Schnittstelle L ↓ D.



**Abb. 3.3.3: Berechnung von molarer Masse und isoelektrischem Punkt N-terminal deletierter  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  Fragmente**

Von der Leitsequenz des Konstruktes  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  wurden theoretisch die N-terminalen Aminosäurereste deletiert und mit dem Programm „Compute pI/MW“ der ExPASy Proteomics Homepage die molaren Massen (MW) und die isoelektrischen Punkte (pI) der Fragmente ermittelt. Die Wertepaare wurden gegeneinander aufgetragen.

$I_1$ : erste intermediäre Form,  $I_{2/1}$ ,  $I_{2/2}$ : zweite intermediäre Form

## 4. Diskussion

Der Transfer eines mitochondrialen Gens in den Zellkern kann bei der Untereinheit 2 der Cytochromoxidase (*COX2*) nachvollzogen werden. Während dieses Gen in den meisten Organismen mitochondrial kodiert ist, besitzen einige Vertreter der *Fabaceae*, wie die Sojabohne *Glycine max* L., eine weitere Kopie im Zellkern, die aktiv transkribiert wird (ADAMS et al. 1999, COVALLO UND GRAY 1992, NUGENT UND PALMER 1991). *COX2* Gene im Zellkern finden sich auch bei den *Apikomplexa Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* und bei den *Chlamydomonaceae Chlamydomonas reinhardtii* und *Polytomella spec.* (PEREZ-MARTINEZ et al. 2001, FUNES et al. 2002, GARDNER et al. 2002). Das *COX2* Gen von *Chlamydomonas* ist in zwei Teile, *COX2A* und *COX2B*, unterteilt (PÉREZ-MARTINEZ et al. 2001).

Das Cox2 Protein ist Teil der mitochondrialen Atmungskette und in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert. Das kernkodierte Cox2 Protein der Sojabohne wird nach seiner Synthese im Zytoplasma der Zelle post-translational in die Mitochondrien importiert. Es besitzt zwei transmembrane Domänen, die dem Protein eine hohe Hydrophobizität verleihen. Ein Vergleich des kernkodierten Cox2 Proteins der Sojabohne mit dem von der mitochondrialen DNA abgeleiteten Protein zeigt, dass die Hydrophobizität der ersten Transmembrandomäne des kernkodierten Proteins durch den Austausch von zwei Aminosäureresten reduziert ist (DALEY et al. 2002b). Ein synthetisches Protein, das aus der Leitsequenz des kernkodierten Cox2 Proteins und dem reifen mitochondrial kodierten Cox2 Protein besteht, kann *in vitro* nicht in isolierte Mitochondrien der Sojabohne importiert werden. Auch die Hydrophobizität des Proteins Cox2a von *Chlamydomonas*, das die beiden Transmembrandomänen enthält, ist im Vergleich zu bekannten mitochondrial kodierten Cox2 Proteinen vermindert.

Zum Import und zur innermitochondrialen Sortierung benötigt ein kernkodierte mitochondriales Protein eine Leitsequenz, die das Protein in die Mitochondrien dirigiert. Für den Import eines hydrophoben Proteins muss diese Leitsequenz besondere Charakteristika aufweisen: Der Import des Proteins Cox2a von *Chlamydomonas*, das die beiden Transmembrandomänen enthält, wird von einer 130 Aminosäurereste langen abspaltbaren Leitsequenz vermittelt. In der C-terminalen Region des Proteins, die vom Gen *COX2B* kodiert ist, fehlt hingegen eine solche abspaltbare Leitsequenz (PÉREZ-MARTINEZ et al. 2001).

Das kernkodierte Cox2 Protein der Sojabohne wird mit einer 136 Aminosäurereste umfassenden N-terminalen Leitsequenz synthetisiert, die während des Importes in drei

Schritten proteolytisch abgespalten wird (DALEY et al. 2002a). Eine solche Drei-Stufen Prozessierung konnte bisher für kein weiteres Protein nachgewiesen werden.

#### 4.1 Hefe als Modellsystem zur Untersuchung der Prozessierung eines kernkodierten pflanzlichen Proteins

Die Untersuchungen zur Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz sollten in der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt werden. Die Hefe eignet sich gut zur Identifizierung der an der Prozessierung und am Transport beteiligten Faktoren, da der mitochondriale Import bei der Hefe selbst bereits gut charakterisiert ist. Es konnten zahlreiche Gene identifiziert werden, deren Produkte direkt oder indirekt am Import und an der Prozessierung kernkodierter mitochondrialer Proteine beteiligt sind. Somit existieren viele Stämme, in denen die Gene der an dem Transport und der Prozessierung beteiligten Proteine mutiert oder deletiert sind. Zu den meisten dieser Proteine konnten homologe pflanzliche Proteine nachgewiesen werden (LISTER et al. 2003).

Ein Vergleich der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz in der Sojabohne und der Hefe musste zunächst zeigen, ob Hefe als Modellsystem für diese Untersuchungen geeignet ist.

Beim Import von GmCox2 in isolierte Mitochondrien aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* finden die ersten beiden Schritte der Prozessierung analog zur Prozessierung in den Sojabohnen Mitochondrien statt (s. 3.1.1). Dabei entsteht in den Hefe Mitochondrien jedoch nur sehr wenig reifes Protein. Hefe ist folglich zur Identifizierung der an der Prozessierung beteiligten Proteasen geeignet.

Der letzte Schritt der Prozessierung von GmCox2 fällt beim Import in isolierte Mitochondrien aus Kartoffel oder Reis vollständig aus (ADAMS et al. 1999, DALEY et al. 2002a), bei Import in Mitochondrien von *Fabaceae* mit mitochondrialem *COX2* Gen, wie der Erbse *Pisum sativum*, wird GmCox2 hingegen zum reifen Protein prozessiert. Daraus lässt sich schließen, dass in den Mitochondrien der Fabaceen mindestens ein weiterer Faktor vorhanden sein muss, der die Prozessierung von GmCox2 zum reifen Protein erleichtert.

Zur *in vivo* Überexpression des GmCox2 Proteins in den Hefezellen wurde das GmCOX2 Gen in einen Hefektor stromabwärts des Promotors der Alkoholdehydrogenase I der Hefe (pADH1) kloniert.

In einer Northern Blot Detektion mit einer Sonde gegen die GmCOX2 Leitsequenz konnte die GmCOX2 mRNA spezifisch nachgewiesen werden (s. 3.1.2), das GmCOX2 Gen wurde demnach in den Hefezellen exprimiert. Dennoch konnte überexprimiertes GmCox2 Protein den Atmungsdefekt Cox2 defizienter Hefe Zellen nicht komplementieren (s. 3.1.3) und das Protein war *in vivo* mit einem spezifischen Antikörper gegen das Sojabohnen Cox2 Protein oder gegen das Hefe Cox2 Protein nicht nachweisbar (s. 3.1.4).

Da zunächst vermutet wurde, dass der letzte Teil der Sojabohnen Cox2 Leitsequenz möglicherweise einen Einfluss auf den Transport oder die Prozessierung des Proteins in den Hefe Mitochondrien haben könnte, wurde dieser Teil der Leitsequenz gegen die analoge Hefe Präsequenz im Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 Konstrukt ausgetauscht. Diese Vermutung stützt sich darauf, dass die reifen Cox2 Proteine der Hefe und der Sojabohne zwar eine Aminosäureidentität von 50,6% aufweisen, die Hefe Präsequenz und der letzte Teil der Sojabohnen Leitsequenz, denen eine Funktion bei Transport oder Prozessierung in den Mitochondrien zugeschrieben wird, weichen jedoch strukturell stark voneinander ab (s. 3.1.5). Das Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>Cox2 Protein konnte den Atmungsdefekt Cox2 defizienter Hefezellen nicht komplementieren (s. 3.1.6). Ebenso war das Protein *in vivo* in den aus den Hefe Transformanten isolierten Mitochondrien mit dem Antikörper gegen das Sojabohnen und das Hefe Cox2 Protein nicht nachweisbar (s. 3.1.7). Daraus kann gefolgert werden, dass das Fehlen des GmCox2 Proteins in den Hefe Mitochondrien nicht darauf zurückzuführen ist, dass das Protein nicht korrekt importiert oder prozessiert wird. Vielmehr scheint das GmCox2 Protein nicht in den Cytochromoxidase Komplex der Hefe eingebaut zu werden oder kann die Funktion des Hefe Cox2 Protein in dem Komplex nicht übernehmen.

Die Identifizierung der Proteasen, die die Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz katalysieren, und der am GmCox2 Transport beteiligten Proteine sollte in verschiedenen Hefe Mutanten *in vivo* erfolgen. Ein solcher *in vivo* Ansatz war notwendig, weil bei einigen dieser Hefe Mutanten die mitochondriale Atmungskette nicht funktionell ist und deshalb die Energetisierung der inneren Membran, die insbesondere für einen *in vitro* Import des GmCox2 Proteins erforderlich ist, nicht ausreicht (STUART 2002, TOKATLIDIS UND SCHATZ 1999).

#### 4.2 Die GmCox2 Transmembrandomäne 1 ist notwendig für die Prozessierung zum reifen Protein

Die Verwendung verschiedener Leitsequenz-GFP Konstrukte ermöglichte es, die Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz *in vivo* in den Hefe Mitochondrien zu untersuchen. In den mit den Konstrukten Gm<sub>136</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP transformierten Zellen konnte mit einem monoklonalen Antikörper gegen das GFP Protein die Prozessierung zu den Intermediaten I<sub>1</sub> und I<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Die Konstrukte Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP, die zusätzlich die erste Transmembrandomäne des GmCox2 Proteins enthielten, wurden zu I<sub>1</sub> und dem reifen Protein prozessiert (s. 3.2.2). Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die GmCox2 Transmembrandomäne für die vollständige Reifung der Konstrukte notwendig ist. Es wird vermutet, dass die Transmembrandomäne notwendig ist für den Transport der Proteine in das mitochondriale Kompartiment, in dem die Prozessierung zum reifen Protein stattfindet. Auch für das Hefe Cox2 Protein konnte gezeigt werden, dass die erste Transmembrandomäne für den Oxa1 vermittelten Transport des Proteins durch die innere mitochondriale Membran notwendig ist (HE UND FOX 1997). Die Notwendigkeit der ersten Transmembrandomäne für die Cox2 Reifung ist somit ein Hinweis dafür, dass der Transport des Sojabohnen Cox2 Proteins dem des Hefe Cox2 Proteins ähnelt.

#### 4.3 Identifizierung der an der Drei-Stufen Prozessierung beteiligten Proteasen

Untersuchungen zur Prozessierung der Leitsequenz-GFP Konstrukte in einer temperatursensitiven Mutante mit defekter mitochondrialer Prozessierungspeptidase (MPP) konnten zeigen, dass die MPP die Prozessierung zum Intermediat I<sub>1</sub> katalysiert (s. 3.2.4). Ein Ausfall der MPP Aktivität in den Mitochondrien führte zu einer Anreicherung der Vorstufenformen der GFP Konstrukte.

Die MPP ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und häufig an der Prozessierung N-terminaler Leitsequenzen beteiligt. Sie ist in der Hefe und in pflanzlichen Mitochondrien nachweisbar, ist insgesamt hoch konserviert (~30–52% Aminosäureidentität) und besitzt in allen bisher untersuchten Organismen die gleiche Substratspezifität (GAKH et al. 2002). So konnte beispielsweise gezeigt werden, dass die pflanzliche Mangan Superoxid Dismutase in Hefe Mitochondrien importiert und an gleicher Stelle wie in den pflanzlichen Mitochondrien prozessiert wird (BOWLER et al. 1989).

Typische MPP Schnittstellen weisen die Konsensussequenz R X (X) ↓ (S/A) auf (GAVEL UND VON HEIJNE 1990, NIIDOME et al. 1994, SCHNEIDER et al. 1998). Diese Sequenz ist in der Leitsequenz des GmCox2 Proteins an Position +93 zu finden (R N ↓ S), eine Spaltung der Konstrukte an dieser Stelle führt zu Proteinen mit molaren Massen, die experimentell für die I<sub>1</sub> Intermediate ermittelt werden konnten.

Die Fraktionierung von Mitochondrien aus den mit Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten Wildtyp Zellen konnten zeigen, dass das I<sub>1</sub> Intermediat durch einen Proteinase K Verdau der Mitoplasten abbaubar ist (s. 3.2.3). Dieses spricht dafür, dass die MPP die Leitsequenz der GFP Konstrukte in der Matrix prozessiert, die Proteine zu diesem Zeitpunkt jedoch noch nicht vollständig in der Matrix lokalisiert sind und deshalb für die Proteinase zugänglich sind.

Die Fraktionierungen von Mitochondrien aus den mit Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten *mas1ts* Zellen stützen eine Beteiligung der MPP an der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz (s. 3.2.4). In diesen Mitochondrien ist die Vorstufenform vollständig in der Matrix lokalisiert und die Prozessierung des Proteins zu den Intermediaten sowie der Reexport durch die innere Membran unterbleibt. Zwar sind in den *mas1ts* Mitochondrien die Intermediate und die reife Form der GFP Konstrukte ebenfalls nachweisbar, dieses ist jedoch darauf zurückzuführen, dass die transformierten Zellen zunächst bei der permissiven Temperatur von 28°C angezogen werden, wo die Prozessierung wie im Wildtyp abläuft, bevor die MPP durch Inkubation bei 37°C inaktiviert wird. Eine sofortige Inkubation der Zellen bei 37°C oder die vollständige Deletion des *MAS1* Gens wäre letal für die Zellen.

Die Peptidase, die den zweiten Prozessierungsschritt katalysiert, konnte nicht identifiziert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass entweder die mitochondriale Prozessierungs-peptidase MPP, die Innermembranpeptidase IMP oder eine weitere, noch nicht identifizierte, Peptidase den zweiten Teil der GmCox2 Leitsequenz abspaltet.

Die IMP der Hefe besteht aus den Untereinheiten Imp1, Imp2 und Som1 (JAN et al. 2000). In pflanzlichen Mitochondrien wurde die IMP bisher experimentell noch nicht nachgewiesen, in dem Proteom von *Arabidopsis* können jedoch Proteine mit Homologie zu Imp1 und Imp2 gefunden werden (LISTER et al. 2003). Die Imp1 Untereinheit der Hefe prozessiert unter anderem das Hefe Cox2 Protein, die Spaltung des Peptids erfolgt im Sequenzmotiv N ↓ D (PRATJE et al. 1983), an Position -1 der Imp1 Schnittstelle sind jedoch außerdem die Aminosäurereste Serin, Cystein, Methionin und Leucin zulässig (CHEN et al. 1999).

Ein  $I_2$  Intermediat konnte *in vivo* in den Mitochondrien der  $Gm_{136}GFP$  und  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$ , nicht jedoch in den Mitochondrien der  $Gm_{136}TM1GFP$  und  $Gm_{126}Sc_{15}TM1GFP$  Transformanten nachgewiesen werden (s. 3.2.2). Die Fraktionierung der Mitochondrien, die aus den mit  $Gm_{136}GFP$  und  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  transformierten Zellen isoliert worden waren, zeigte, dass dieses  $I_2$  Intermediat in der Matrix lokalisiert ist, durch einen Proteinase K Verdau der Mitoplasten wird es jedoch geringfügig verkleinert (s. 3.2.3). Dieses spricht dafür, dass der N-Terminus zwar in den Intermembranraum ragt, das Protein jedoch nicht durch die Membran transportiert werden kann, wenn die Transmembrandomäne nicht vorhanden ist. Dass das  $I_2$  Intermediat der Konstrukte mit Transmembrandomäne *in vivo* nicht nachweisbar ist, könnte damit erklärt werden, dass bereits das  $I_1$  Intermediat durch die innere Membran transportiert wird. Wenn es sich bei dem Transport des  $I_1$  Intermediates durch die Membran um den Geschwindigkeits-bestimmenden Schritt handelt, würde das im Intermembranraum gebildete  $I_2$  Intermediat sofort weiter zum stabileren reifen Protein prozessiert werden.

In einer 2D PAGE konnte das  $I_2$  Intermediat des Konstruktes  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  näher charakterisiert werden (s. 3.3.1). Dabei zeigte sich, dass in diesem Konstrukt zwei nahe beieinander gelegene Prozessierungen zu den Intermediaten  $I_{2/1}$  und  $I_{2/2}$  führten, die eine charakteristische Verschiebung des isoelektrischen Punktes aufwiesen. Anhand dieser Verschiebung und der molaren Massen der  $I_{2/1}$  und  $I_{2/2}$  Fragmente konnte die Prozessierung auf die Aminosäurereste 126 und 128 der  $GmCox2$  Leitsequenz eingegrenzt werden. Die Sequenzabfolge R W M L D L in der  $Gm_{126}Sc_{15}GFP$  Leitsequenz beinhaltet eine mögliche MPP Schnittstelle, R W M ↓ L, und eine mögliche Imp1 Schnittstelle, L ↓ D (Abb. 4.1). Für die Sequenz R W M D Q in der  $Gm_{136}GFP$  Leitsequenz wäre die MPP Schnittstelle R W M ↓ D eher unwahrscheinlich, die Imp1 Schnittstelle M ↓ D jedoch möglich. Dieses ist ein Hinweis darauf, dass die Prozessierung zu  $I_2$  bei den Konstrukten ohne Transmembrandomäne alternativ in der Matrix erfolgt, da das  $I_1$  Intermediat nicht durch die innere Membran transportiert werden kann. Die Prozessierung der Konstrukte mit Transmembrandomäne ist nach Transport von  $I_1$  durch die innere Membran durch die IMP wahrscheinlicher.

Untersuchungen zur Prozessierung der Leitsequenz-GFP Konstrukte in einer *impl* Mutante sollten klären, ob die IMP am letzten Schritt der Prozessierung der  $GmCox2$  Leitsequenz beteiligt ist (s. 3.2.5).

Die IMP zeigt keinen Einfluss auf die Prozessierung der Konstrukte ohne Transmembrandomäne, in den Mitochondrien der mit  $Gm_{136}TM1GFP$  und

Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten *Δimp1* Zellen war im Gegensatz zum Wildtyp das reife Protein jedoch nicht nachweisbar. Dieses deutet darauf hin, dass Imp1 die Prozessierung beider Konstrukte zum reifen Protein katalysieren könnte.

Das Konstrukt Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP beinhaltet die Hefe Präsequenz, die durch die Imp1 Untereinheit abgespalten wird. Die Prozessierung erfolgt in dieser Sequenz zwischen den Aminosäureresten N ↓ D. Auch in dem letzten Teil der Sojabohnen Cox2 Leitsequenz ist eine mögliche Imp1 Schnittstelle C ↓ D enthalten (Abb. 4.1).

Die Fraktionierung der aus den Wildtyp Transformanten isolierten Mitochondrien konnte zeigen, dass das reife Protein größtenteils im Intermembranraum, dem Wirkort der IMP, lokalisiert ist (s. 3.2.3). Dieses ist ein weiterer Hinweis darauf, dass die IMP den letzten Prozessierungsschritt katalysiert.

Die Untereinheit Som1 der IMP ist zur Prozessierung der Imp1 Substrate Cox2 und Mcr1, nicht jedoch zur Prozessierung von Cyt b<sub>2</sub> notwendig (JAN et al. 2000). In einer Mutante mit fehlender Som1 Untereinheit sollte untersucht werden, ob Som1 eine Rolle bei der Prozessierung der GmCox2 Leitsequenz besitzt (s. 3.2.5). Ein Einfluss von Som1 auf die Prozessierung des Gm<sub>136</sub>TM1GFP Proteins konnte nicht festgestellt werden, jedoch scheint Som1 die Reifung des Konstruktes Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP zu beeinflussen, denn in den *Δsom1* Mitochondrien ist das I<sub>2</sub> Intermediat im Vergleich zum reifen Protein leicht angereichert. Dieses könnte ein Hinweis dafür sein, dass die Som1 Spezifität direkt von der Präsequenz des zu prozessierenden Proteins abhängt und Som1 eventuell am Transport des Substrates zur IMP beteiligt ist. Dieses stimmt mit der Feststellung überein, dass das *SOM1* Gen in Pflanzen nicht nachweisbar ist. Die *Fabaceae*n scheinen jedoch ebenfalls einen Faktor zu besitzen, der die Prozessierung zur reifen Form oder den Transport des GmCox2 Proteins zur IMP erleichtert. Dieser ist jedoch im Hinblick auf seine Sequenz von SOM1 verschieden.

Die Cytochrom *c* Peroxidase (Ccp1) ist ein kernkodierte mitochondriales Protein, das mit einer zweiteiligen N-terminalen Leitsequenz synthetisiert wird. Der erste Teil der Ccp1 Leitsequenz wird von der mAAA Protease, bestehend aus den Untereinheiten Yta10 und Yta12, abgespalten, die Prozessierung erfolgt in einem hydrophoben Bereich der Ccp1 Leitsequenz.

Die mAAA Protease ist in Mitochondrien der Pflanzen und der Hefe für den Abbau nicht assemblierter Atmungskettenkomplexe und die Akkumulation der mitochondrial kodierten Atp9 Untereinheit notwendig (KOŁODZIEJCZAK et al. 2002). Die Signalpeptidase-Aktivität konnte für die mAAA Protease bisher nur in der Hefe nachgewiesen werden, als Substrat

wurde Ccp1 identifiziert (ESSER et al. 2002). Für die Prozessierung der Ccp1 Leitsequenz sind beide Untereinheiten der mAAA Protease notwendig. Pim1, ein Protein, das bei Überexpression die Funktion der mAAA Protease komplementieren kann (REP et al. 1996), kann die Prozessierung der Ccp1 Leitsequenz nicht übernehmen (ESSER et al. 2002). Dieses deutet darauf hin, dass die mAAA Protease eine hohe Spezifität in ihrer Signalpeptidase-Aktivität aufzuweisen scheint.

Der zweite Teil der Ccp1 Leitsequenz wird von dem Protein Pcp1 prozessiert. Auch diese Prozessierung erfolgt in einem hydrophoben Bereich der Ccp1 Leitsequenz. Pcp1 zeigt eine Homologie zu Proteinen der Rhomboid Familie möglicher Intermembranpeptidasen, als Substrat für die Signalpeptidase-Aktivität des Pcp1 konnte bisher ebenfalls nur das Ccp1 identifiziert werden (ESSER et al. 2002).

Um zu untersuchen, ob das Sojabohnen Cox2 Protein ein mögliches Substrat für die mAAA Protease und Pcp1 sein könnte, wurde die Prozessierung der Leitsequenz-GFP Konstrukte in Deletionsmutanten der mAAA Protease Untereinheiten Yta10 und Yta12, sowie des Proteins Pcp1 analysiert (s. 3.2.7). Eine Beteiligung dieser Proteasen an der Drei-Stufen Prozessierung des GmCox2 Proteins kann ausgeschlossen werden.

Dieses Ergebnis stimmt mit der Feststellung überein, dass die Schnittstellen in der GmCox2 Leitsequenz nicht in hydrophoben Bereichen lokalisiert sind. Der Schnitt innerhalb solcher Bereiche scheint für eine Prozessierung von mAAA und Pcp1 charakteristisch zu sein.

Dennoch zeigen die Untersuchungen zur Prozessierung der GFP Konstrukte in den Mutanten mit deletiertem *yta10* und *yta12*, dass kleinere GFP Fragmente angereichert werden, die folglich im Wildtyp von den Yta10 und Yta12 Untereinheiten der mAAA Protease spezifisch abgebaut werden. Dass die intermediären und reifen GFP Konstrukte in den Wildtyp Mitochondrien dennoch nachweisbar sind, könnte ein Hinweis darauf sein, dass diese Proteine zumindest teilweise assembliert vorliegen und für die mAAA Protease nicht zugänglich sind.

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| pGm | MGLLSCFRSTVLRKCSKGGSSGMSRFLYTNNFQRNLISSGGNESYYGYFNRRSYTSLYIGT  | 60  |
| pSc | MGLLSCFRSTVLRKCSKGGSSGMSRFLYTNNFQRNLISSGGNESYYGYFNRRSYTSLYIGT  | 60  |
| pGm | GTVGGITSARIRVPNVGCEGFMCSSHLSITQRNSRLIHSTSKIVPNSEIQNITTEMVKTP   | 120 |
| pSc | GTVGGITSARIRVPNVGCEGFMCSSHLSITQRNSRLIHSTSKIVPNSEIQNITTEMVKTP   | 120 |
| pGm | EVSRRM DQVI P TIAP CDAAEFWQLGFQDAATPIMQGIIDLHHDVFFFVIQIGVFVS   | 176 |
| pSc | EVSRRM LDDLRLQLTTFIMNDVPTFWQLGFQDAATPIMQGIIDLHHDVFFFVIQIGVFVS  | 180 |
| pGm | WVLI RALSTLEDPRVPVEKMSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK | 236 |
| pSc | WVLI RALSTLEDPRVPVEKMSKGEELFTGVVPI LVELDGDVNGHKFSVSGEGEGDATYGK | 240 |
| pGm | LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTFYSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFK   | 296 |
| pSc | LTLKFICTTGKLPVPWPTLVTFYSYGVQCFSRYPDHMKRHDFFKSAMPEGYVQERTIFFK   | 300 |
| pGm | DDGNYKTRAEVKEFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGI    | 356 |
| pSc | DDGNYKTRAEVKEFEGDTLVNRIELKIDFKEDGNILGHKLEYNYNHNVYIMADKQKNGI    | 360 |
| pGm | KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLL   | 416 |
| pSc | KVNFKIRHNIEDGSVQLADHYQQNTPIGDGPVLLPDNHYLSTQSALS KDPNEKRDMVLL   | 420 |
| pGm | EFVTAAGITHGMDELYK  | 433 |
| pSc | EFVTAAGITHGMDELYK  | 437 |

**Abb. 4.1: Vergleich der Gm<sub>136</sub>TM1GFP (pGm) und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP (pSc) Sequenz**

hellblau: erster Teil der GmCox2 Leitsequenz, dunkelblau: zweiter Teil der GmCox2 Leitsequenz, orange: dritter Teil der GmCox2 Leitsequenz, gelb: Präsequenz des Hefe Cox2, rot: Sequenz aus dem reifen GmCox2, braun: erste Transmembrandomäne von GmCox2, schwarz: Bereich aus der „Multiple Cloning Site“ des Vektors, grün: „Green fluorescence protein“ GFP

Pfeile kennzeichnen mögliche Schnittstellen in der Sequenz, Kreuze zeigen Übereinstimmungen in den Sequenzen

MPP: mitochondriale Prozessierungspeptidase, IMP: Innermembran Peptidase

#### 4.4 Innermitochondrialer Transport der Leitsequenz-GFP Konstrukte

Kernkodierte mitochondriale Proteine mit N-terminalen Leitsequenzen, deren Bestimmungsort die innere Membran ist, können unterschiedliche Importwege besitzen. Die D-Lactat Dehydrogenase (D-LDH) der Hefe arretiert gemäß dem „Stop-Transfer“-Mechanismus, der zunächst für lösliche Proteine des Intermembranraumes nachgewiesen wurde (NGUYEN et al. 1988, GLICK et al. 1992), in der inneren Membran und wird lateral in die innere Membran integriert (ROJO et al. 1998, STUART 2002). D-LDH besitzt nach ihrer Integration in die Membran eine N<sub>in</sub>-C<sub>out</sub> Topologie.

Andere Proteine der inneren Membran werden zunächst vollständig in die mitochondriale Matrix importiert („Conservativ sorting“-Modell, HARTL et al. 1987, HARTL U. NEUPERT

1990) und anschließend in einem separaten Schritt durch die innere Membran transportiert (HERRMANN et al. 1997, STUART 2002, TOKATLIDIS UND SCHATZ 1999). Diese Proteine besitzen nach ihrer Integration in die Membran eine  $N_{out}$ - $C_{out}$  Topologie.

Der Export aus der Matrix durch die innere mitochondriale Membran, den die Proteine mit  $N_{out}$ - $C_{out}$  Topologie erfahren, entspricht dem Export mitochondrial kodierter Proteine, wie Cox2 und die Untereinheit 9 der  $F_1F_0$ -ATP Synthase (Su9) (BAUER et al. 1994, HE UND FOX 1997, HERRMANN et al 1995, MEYER et al. 1997a, ROJO et al. 1999). Der N-terminale Export wird durch den OXA1 Proteinkomplex vermittelt und ist zudem abhängig von der Energetisierung der Membran (HERRMANN et al. 1997).

Das Cox2 Protein besitzt eine  $N_{out}$ - $C_{out}$  Topologie in der Membran. Demnach kann angenommen werden, dass der Reexport des N-Terminus durch Oxa1 vermittelt wird.

Um diese These zu überprüfen, wurde die Prozessierung der Leitsequenz-GFP Konstrukte in Hefezellen mit temperatursensitiver *oxal* Mutation analysiert (s. 3.2.6). Da gezeigt werden konnte, dass der letzte Schritt der Prozessierung der Konstrukte Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP von der IMP katalysiert wird (s. 3.2.5) und dieser Prozessierung demnach der Export der Proteine in den Intermembranraum vorausgehen muss, fällt die Prozessierung zum reifen Protein in den *oxal*ts Mutanten aus, wenn der Export Oxa1-vermittelt ist.

Oxa1 hat keinen Einfluß auf den Export der Konstrukte ohne Transmembrandomäne. In den Mitochondrien der Gm<sub>136</sub>TM1GFP und Gm<sub>126</sub>Sc<sub>15</sub>TM1GFP transformierten *oxal*ts Zellen war das reife Protein im Gegensatz zu den Wildtyp Transformanten jedoch nicht nachweisbar. Auch die Form  $m_k$ , die eine verkleinerte Form des reifen GFP Proteins darstellt und wie das reife Protein im Intermembranraum entsteht (s. 3.2.3), war in den *oxal*ts Transformanten nicht nachweisbar. Dieses ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass Oxa1 am Export des GmCox2 Proteins durch die innere Membran beteiligt ist.

Außerdem konnte beobachtet werden, dass in den *oxal*ts Transformanten das  $I_1$  Intermediat stark angereichert ist. Dieses ist ein Hinweis darauf, dass schon das  $I_1$  Intermediat und nicht erst das  $I_2$  Intermediat durch die innere Membran exportiert wird und die Prozessierung zum  $I_2$  Intermediat im Intermembranraum durch die IMP erfolgt.

Im weiteren Verlauf könnte untersucht werden, ob das Oxa1 Protein der Pflanze den Transport des GmCox2 Proteins durch die IM zusätzlich erleichtert. Dazu müssten zunächst Hefe *oxal* Deletionsmutanten mit dem pflanzlichen OXA1 Gen transformiert und die Transformanten durch Komplementation selektioniert werden. Anschliessend könnte der Transport des GmCox2 Proteins in diesen Stämmen charakterisiert werden.

#### 4.5 Modell zum Import und zur Prozessierung von GmCox2

Die Untersuchungen zur Prozessierung der Leitsequenz-GFP Konstrukte in den verschiedenen Hefe Mutanten lassen sich in einem Modell zusammenfassen, das den Importweg und die Prozessierung des GmCox2 Proteins widerspiegelt (Abb. 4.2).

Wie für andere Proteine mit abspaltbarer N-terminaler Leitsequenz gezeigt wurde, wird das GmCox2 Protein wahrscheinlich durch den TIM23 Komplex in die Matrix importiert (PFANNER UND GEISLER 2001). Der erste Teil der Leitsequenz wird in der Matrix von der MPP abgespalten, während der C-Terminus des Proteins noch nicht durch die äußere Membran transportiert wurde. Dieses konnte mit *in vitro* Import Experimenten des GmCox2 Proteins in Mitochondrien aus der Hefe und der Sojabohne gezeigt werden, bei denen das I<sub>1</sub> Intermediat durch einen Proteinase K Verdau der Mitochondrien abbaubar ist (DALEY et al. 2002a, s. 3.1.8). Im weiteren Verlauf des GmCox2 Importes ist unklar, ob das Protein gemäß dem „Conservativ sorting“ Mechanismus zunächst vollständig in die mitochondriale Matrix importiert wird oder mit der zweiten Transmembrandomäne gemäß dem „Stop-Transfer“ Mechanismus in der inneren Membran arretiert.

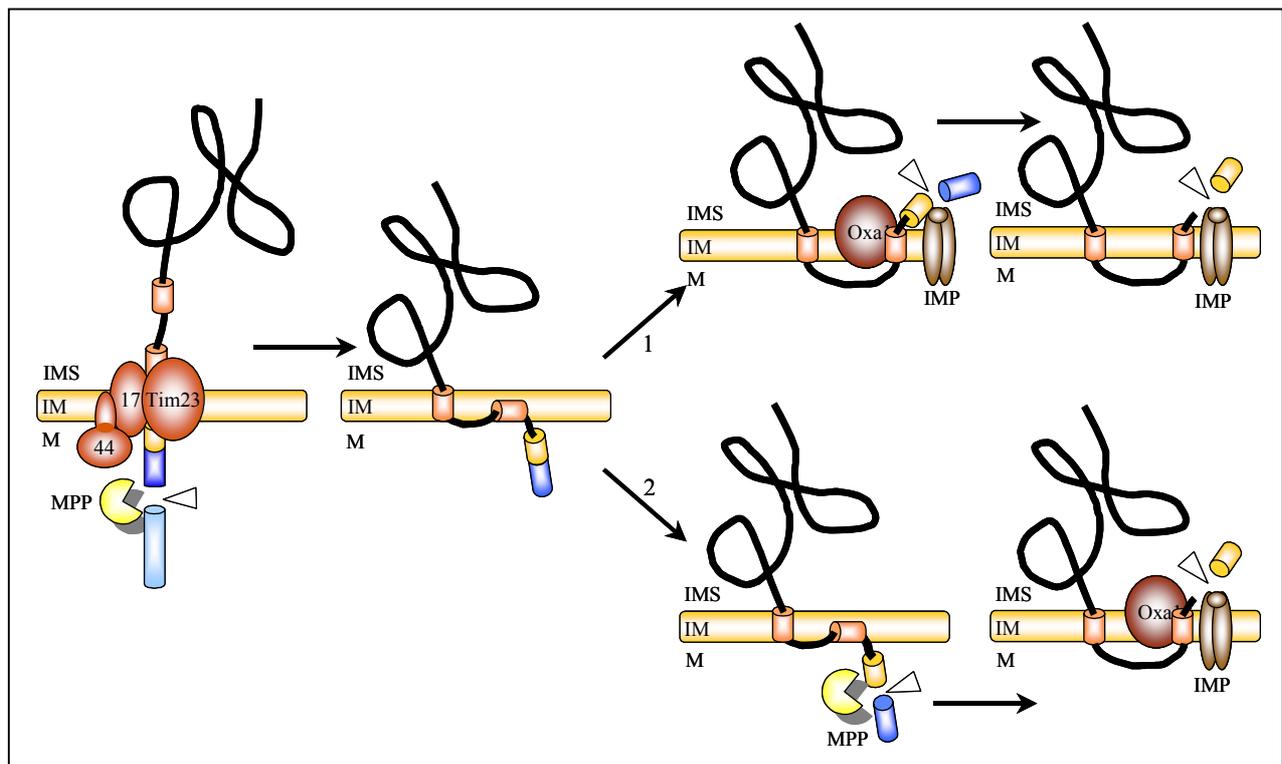
Bei Cox2 handelt es sich zwar um ein Protein mit N<sub>out</sub>-C<sub>out</sub> Topologie und bisher konnte noch für kein Protein mit dieser Topologie ein Import gemäß dem „Stop-Transfer“ Mechanismus nachgewiesen werden (STUART 2002, TOKATLIDIS UND SCHATZ 1999), was für das „Conservativ sorting“ Modell sprechen würde. Auch das Oxa1 Protein der Hefe, das fünf Transmembrandomänen besitzt, wird zunächst vollständig in die Matrix importiert und anschließend in die Membran integriert (STUART 2002).

Die Cox2 Transmembrandomänen weisen jedoch eine außergewöhnlich hohe Hydrophobizität auf und das Protein kann *in vitro* nur mit geringer Effizienz durch die mitochondrialen Membranen transportiert werden (DALEY et al. 2002b, s. auch 3.1.8.), was für das „Stop-Transfer“ Modell sprechen würde. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass nach Deletion der ersten Transmembrandomäne das Cox2 Protein beim Import in isolierte Mitochondrien der Sojabohne mit der zweiten Transmembrandomäne in der inneren Membran arretiert und durch einen Proteinase K Verdau der Mitoplasten abbaubar ist (DALEY et al. 2002b). Ein Import von GmCox2 gemäß dem „Stop-Transfer“ Mechanismus ist demnach wahrscheinlicher. Um das Import Modell näher zu charakterisieren, könnte der Einfluss von Proteinen, die bei Hefe am Export des C-Terminus von IM Proteinen beteiligt sind, analysiert werden. Zu diesen Proteinen gehören Mss2 (BROADLEY et al. 2001) und Pnt1 (HE UND FOX

1999), sowie die Assemblierungsfaktoren Cox18 und Cox20 (HELL et al. 2000, LOPEZ SOUZA et al. 2000).

Die Protease, die die Abspaltung des zweiten Teils der Leitsequenz katalysiert, sowie das Kompartiment, in dem die Prozessierung zum I<sub>2</sub> Intermediat stattfindet, konnten nicht identifiziert werden. Es besteht die Möglichkeit, dass es sich bei dieser Protease um die IMP (Abb. 4.2 – 1) oder um die MPP handelt (Abb. 4.2 – 2) handelt.

Der Export des I<sub>1</sub> oder I<sub>2</sub> Intermediates durch die innere Membran wird von Oxa1 vermittelt. Wird I<sub>1</sub> durch die innere Membran exportiert, so findet die Prozessierung zu I<sub>2</sub> und zum reifen Protein durch die IMP im Intermembranraum statt. Bei Export von I<sub>2</sub> durch die innere Membran erfolgt nur die Prozessierung zum reifen Protein im Intermembranraum durch IMP.



**Abb. 4.2: Modell zum Import und zur Prozessierung von GmCox2 in Mitochondrien**

MPP: mitochondriale Prozessierungspeptidase, IMP: Innermembranpeptidase

blau: Leitsequenz 1 und 2 von GmCox2, gelb: Leitsequenz 3 von GmCox2, rotbraun: Transmembrandomänen von GmCox2, schwarz: GmCox2 Protein

M: Matrix, IM: innere Membran, IMS: Intermembranraum

Diese Arbeit hat gezeigt, dass Hefe ein geeigneter Modellorganismus ist, um die Prozessierung der Leitsequenz des kernkodierte Cox2 Proteins der Sojabohne zu analysieren. Es gelang in diesen Untersuchungen, einige Proteasen zu identifizieren, die an der Drei-Stufen Prozessierung beteiligt sind und den Importweg von GmCox2 weitgehend zu charakterisieren.

## 5. Zusammenfassung

Im Verlauf der Evolution eukaryotischer Zellen wurde das mitochondriale Genom zunehmend reduziert und mitochondriale Gene wurden in das Kerngenom transferiert. Ein solcher Transfer kann bei der Untereinheit 2 der Cytochrom *c* Oxidase (*COX2*) nachvollzogen werden. *COX2* ist bei den meisten Organismen ein mitochondriales Gen, die *Chlamydomonacea*, die *Apicomplexa* und einige *Fabaceae* wie die Sojabohne *Glycine max* L. besitzen jedoch Kopien des *COX2* Gens im Zellkern.

Das *COX2* Kerngen (*GmCOX2*) wird bei der Sojabohne aktiv transkribiert und das Protein nach seiner Synthese im Zytoplasma der Zelle post-translational in die Mitochondrien importiert. Für den Import besitzt das *GmCox2* Protein eine 136 Aminosäurereste lange N-terminale Leitsequenz, die während des Importes in drei Schritten proteolytisch abgespalten wird. Eine solche Drei-Stufen-Prozessierung konnte bisher für kein weiteres Protein nachgewiesen werden. Der Importweg des *GmCox2* Proteins und die Proteasen, die die Abspaltung der Leitsequenz katalysieren, sollten in dieser Arbeit identifiziert werden.

Die meisten Proteine, die am mitochondrialen Proteintransport und der proteolytischen Prozessierung beteiligt sind, besitzen in Pflanzen und Pilzen homologe Sequenzen. Daher wurde geprüft, ob der gut charakterisierte Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* eingesetzt werden kann, um den Importweg von *GmCox2* näher zu charakterisieren.

Wie in der Sojabohne wird auch in Hefe die Leitsequenz des *GmCox2* Proteins in drei Schritten abgespalten und es entstehen in beiden Organismen identische Prozessierungsintermediate.

Mit Hilfe von verschiedenen Leitsequenz-GFP Konstrukten konnte der erste Prozessierungsschritt in der mitochondrialen Matrix und der zum reifen Protein im Intermembranraum lokalisiert werden. Die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) bzw. die Innermembran Peptidase (IMP) wurden als die Enzyme identifiziert, die diese Prozessierungen katalysieren. In der *GmCox2* Leitsequenz konnten mögliche Schnittstellen für beide Peptidasen nachgewiesen werden.

Ohne das Transportprotein *Oxa1p* wurde kein reifes Protein gebildet. Dies verdeutlicht, dass *Oxa1p* für die Insertion des *GmCox2* Proteins in die innere Membran notwendig ist.

Auch die erste Transmembrandomäne des *GmCox2* Proteins erwies sich als essentiell für die Prozessierung zum reifen Protein.

Insgesamt konnte durch Verwendung der Hefe als Untersuchungsorganismus ein detaillierter Ablauf für den Import des kernkodierte Cox2 Proteins der Sojabohne nachgezeichnet werden und eine Reihe von Faktoren identifiziert werden, die diesen Ablauf beeinflussen.

## 6. Literatur

- ADAMS KL, SONG K, ROESSLER PG, NUGENT JM, DOYLE JL, DOYLE JJ, PALMER JD (1999). Intracellular gene transfer in action: Dual transcription and multiple silencings of nuclear and mitochondrial *cox2* genes in legumes  
*PNAS* 96, 13863-13868
- ARLT H, TAUER R, FELDMANN H, NEUPERT W, LANGER T (1996). The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria  
*Cell* 85, 875-885
- BABCOCK GT, WIKSTRÖM M (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration  
*Nature* 356, 301-309
- BAUER M, ESSER K, MICHAELIS G, PRATJE E (1994). *PET1402*, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast  
*Mol. Gen. Genet.* 245, 272-278
- BAUER MF, SIRRENBERG C, NEUPERT W, BRUNNER M (1996). Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria  
*Cell* 87, 33-41
- BEHRENS M, MICHAELIS G, PRATJE E (1991). Mitochondrial inner membrane protease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* shows sequence similarity to the *Escherichia coli* leader peptidase  
*Mol. Gen. Genet.* 228, 167-176
- BÖHNI PC, DAUM G, SCHATZ G (1983). Import of proteins into mitochondria  
*J. Biol. Chem.* 258, 4937-4943
- BÖMER U, RASSOW J, ZUFALL N, PFANNER N, MEIJER M, MAARSE AC (1996). The preprotein translocase of the inner mitochondrial membrane: evolutionary conservation of targeting and assembly of Tim17  
*J. Mol. Biol.* 262, 389-395
- BONITZ GS, CORUZZI G, THALENFELD BE, TZAGOLOFF A, MACINO G (1980). Assembly of the mitochondrial membrane system: structure and nucleotide sequence of the gene coding for subunit 1 of yeast cytochrome oxidase  
*J. Biol. Chem.* 255, 11927-11941
- BONNEFOY N, BSAT N, FOX TD (2001). Mitochondrial translation of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA is controlled by the nucleotide sequence specifying the pre-Cox2p leader peptide  
*Mol. Cell. Biol.* 21, 2359-2372
- BOWLER C, ALLIOTTE T, VAN DEN BULCKE M, BAUW G, VANDEKERCKHOVE J, VAN MONTAGU M, INZE D (1989). A plant manganese superoxide dismutase is efficiently imported and correctly processed by yeast mitochondria  
*PNAS* 86, 3237-3241

- BRAUN HP, EMMERMANN M, KRUF T V, SCHMITZ UK (1992). Cytochrome c1 from potato: a protein with a presequence for targeting to the mitochondrial intermembrane space  
*Mol Gen Genet* 231, 217-225
- BRAUN HP, SCHMITZ UK (1999). The protein import apparatus of plant mitochondria  
*Planta* 209, 267-274
- BRAUN HP, SCHMITZ UK (1995). The bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria  
*J. Bioenerg. Biomembr.* 27, 423-436
- BROADLEY SA, DEMLOW CM, FOX TD (2001). Peripheral mitochondrial inner membrane protein Mss2p, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*  
*Mol. Cell. Biol.* 21, 7663-7672
- BRUNNER M, KLAUS C, NEUPERT W (1994). The mitochondrial processing peptidase in: von Heijne (ed.) *Signal Peptidases* R.G. Landes Company, 73-86
- CAPALDI RA (1990). Structure and function of cytochrome c oxidase  
*Ann. Rev. Biochem.* 59, 569-596
- CHEN X, VAN VALKENBURGH C, FANG H, GREEN N (1999). Signal peptides having standard and nonstandard cleavage sites can be processed by Imp1p of the mitochondrial inner membrane protease.  
*J. Biol. Chem.* 274, 37750-37754
- CHENG MY, HARTL F-U, MARTIN J, POLLOCK RA, KALOUSEK F, NEUPERT W, HALLBERG EM, HALLBERG RL, HORWICH AL (1989). Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria  
*Nature* 337, 620-625
- CONFALONIERI F, DUGUET M (1995). A 200-amino acid ATPase module in search of a basic function  
*BioEssays* 17, 639-650
- CORUZZI G, TZAGOLOFF A (1979). Assembly of the mitochondrial membrane system: DNA sequence of subunit 2 of yeast cytochrome oxidase  
*J. Biol. Chem.* 254, 9324-9330
- COVELLO PS, GRAY MW (1992). Silent mitochondrial and active nuclear genes for subunit 2 of cytochrome c oxidase (*cox2*) in soybean: evidence for RNA-mediated gene transfer  
*EMBO J.* 11, 3815-3820
- DALBEY RE, VON HEIJNE G (1992). Signal peptidases in prokaryotes and eukaryotes – a new protease family  
*Trends Biochem. Sci.* 17, 474-478

- DALEY DO, ADAMS KL, CLIFTON R, QUALMANN S, MILLAR AH, PALMER JD, PRATJE E, WHELAN J (2002a). Gene transfer from mitochondrion to the nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2  
*The Plant J.* 30, 11-21
- DALEY DO, CLIFTON R, WHELAN J (2002b). Intracellular gene transfer: reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99, 10510-10515
- DAUM G, GASSER S, SCHATZ G (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria  
*J. Biol. Chem.* 257, 13075-13080
- DAY DA, NEUBERGER M, DOUCE R (1985). Biochemical characterization of chlorophyll-free mitochondria from pea leaves  
*Aust. J. Plant. Physiol.* 12, 219-228
- DUJON B (1996). The yeast genome project: What did we learn?  
*Trends Genet.* 12, 263-270
- EMMERMANN M, CLERICUS M, BRAUN HP, MOZO T, HEINS L, KRUFIT V, SCHMITZ UK (1994). Molecular features, processing and import of the Rieske iron-sulfur protein from potato mitochondria  
*Plant Mol. Biol.* 25, 271-281
- ERIKSSON A, GLASER E (1992). Mitochondrial processing proteinase: a general processing proteinase of spinach leaf mitochondria is a membrane-bound enzyme  
*Biochim. Biophys. Acta* 1186, 221-231
- ESSER K, LISOWSKY T, MICHAELIS G, PRATJE E (2001). Extranuclear inheritance: genetics and biogenesis of mitochondria  
*Progress in Botany* 62, 71-97
- ESSER K, PRATJE E, MICHAELIS G (1996). SOM1, a small new gene required for mitochondrial inner membrane peptidase function in *Saccharomyces cerevisiae*  
*Mol. Gen. Genet.* 252, 427-445
- ESSER K, TURSUN, B, INGENHOVEN M, MICHAELIS M, PRATJE E (2002). A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1  
*J. Mol. Biol.* 323, 835-843
- FÖLSCH H, GUIARD B, NEUPERT W, STUART RA (1996). Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria  
*EMBO J.* 15, 479-487
- FOX TD (1979). Five TGA "stop" codons occur within the translated sequence of the yeast mitochondrial gene for cytochrome c oxidase subunit II  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 6534-6538

- FUNES S, DAVIDSON E, REYES-PRIETO E, MAGALLON A, HERION S, KING MP, GONZALEZ-HALPHEN D (2002). A green algal apicoplast ancestor  
*Science* 298, 2155
- GAKH O, CAVADINI P, ISAYA G (2002). Mitochondrial processing peptidases  
*Biochim. Biophys. Acta* 1592, 63-77
- GARDNER MJ *et al.* (2002). Genome sequence of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*  
*Nature* 419, 498-511
- GAVEL Y, VON HEIJNE G (1990). Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides  
*Protein Engineering* 4, 33-37
- GEIER BM, SCHÄGGER H, ORTWEIN C, LINK TA, HAGEN RW, BRANDT U, VON JAGOW G (1995). Kinetic properties and ligand binding of eleven-subunit cytochrome-*c* oxidase from *Saccharomyces cerevisiae* isolated with a novel large-scale purification method  
*Eur. J. Biochem.* 227, 296-302
- GIETZ D, ST JEAN A, WOODS RA, SCHIESTL RH (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells  
*Nucleic Acids Res.* 20, 1425
- GLASER E, SJÖLING S, TANUDJI M, WHELAN J (1998). Mitochondrial protein import in plants  
*Plant Mol. Biol.* 38, 311-338
- GLICK BS, BRANDT A, CUNNINGHAM K, MÜLLER S, HALLBERG RL, SCHATZ G (1992). Cytochromes *c*<sub>1</sub> and *b*<sub>2</sub> are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism  
*Cell* 69, 809-822
- GRAY MW, BURGER G, LANG BF (1999). Mitochondrial evolution  
*Science* 283, 1476-1481
- GRIVELL LA (1995). Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression  
*Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 121-164
- GUÉLIN E, REP M, GRIVELL LA (1994). Sequence of the *AFG3* gene encoding a new member of the FtsH/Yme1/Tma subfamily of the AAA-protein family  
*Yeast* 10, 1389-1394
- GUÉLIN E, REP M, GRIVELL LA (1996). Afg3, a mitochondrial ATP-dependent metalloprotease, is involved in degradation of mitochondrially-encoded Cox1, Cox3, Cob, Su6, Su8 and Su9 subunits of the inner membrane complexes III, IV and V  
*FEBS Lett.* 381, 42-46
- GUIARD B, BUHLER JM (1984). Yeast cytochrome b2 gene: Isolation with antibody probes  
*Biochimie* 66, 151-158

- HAHNE K, HAUCKE V, RAMAGE L, SCHATZ G (1994). Incomplete arrest in the outer membrane sorts NADH-cytochrome b5 reductase to two different submitochondrial compartments  
*Cell*, 79, 829-839
- HAMEL P, SAKAMOTO W, WINTZ H, DUJARDIN G (1997). Functional complementation of an *oxa1* yeast mutant identifies an *Arabidopsis thaliana* cDNA involved in the assembly of respiratory complexes  
*Plant J.* 12, 1319-1327
- HARTL FU, NEUPERT W (1990). Protein sorting to mitochondria: Evolutionary conservations of folding and assembly  
*Science* 247, 930-938
- HARTL FU, OSTERMANN J, GUIARD B, NEUPERT W (1987). Successive translocation into and out of the mitochondrial matrix: targeting proteins to the intermembrane space by a bipartite signal peptide  
*Cell* 51, 1027-1103
- HE S, FOX TD (1997). Membrane Translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence of the conserved protein Oxa1p  
*Mol. Biol. Cell* 8, 1449-1460
- HE S, FOX TD (1999). Mutations affecting a yeast mitochondrial inner membrane protein, Pnt1p, block export of a mitochondrially synthesized fusion protein from the matrix  
*Mol. Cell. Biol.* 19, 6598-6607
- HEINS L, SCHMITZ UK (1996). A receptor for protein import into potato mitochondria  
*Plant J.* 9, 829-839
- HELL K, HERRMANN J, PRATJE E, NEUPERT W, STUART RA (1997). Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the innermembrane space  
*FEBS Lett.* 418, 367-370
- HELL K, HERRMANN JM, PRATJE E, NEUPERT W, STUART RA (1998). Oxa 1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix into the intermembrane space  
*FEBS Lett.* 418, 367-370
- HELL K, TZAGOLOFF A, NEUPERT W, STUART RA (2000). Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2  
*J. Biol. Chem.* 275, 4571-4578
- HELL K, NEUPERT W, STUART RA (2001). Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA  
*EMBO J.* 20, 1281-1288

- HERRMANN JM, KOLL H, COOK RA, NEUPERT W, STUART RA (1995). Topogenesis of Cytochrome oxidase subunit II  
*J. Biol. Chem.* 270, 27079-27086
- HERRMANN JM, NEUPERT W, STUART RA (1997). Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p  
*EMBO J.* 16, 2217-2226
- HERRMANN JM, STUART RA, CRAIG EA, NEUPERT W (1994). Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA  
*J. Cell Biol.* 127, 893-902
- HILL, J. E., MYERS, A. M., KOERNER, T. J., TZAGOLOFF, A (1986). Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites  
*Yeast* 2, 163-167
- HÖHFELD J, HARTL F-U (1994). Role of the chaperonin cofactor hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria  
*J. Cell Biol.* 126, 305-315
- HURT EC, ALLISON DS, MÜLLER U, SCHATZ G (1987). Amino-terminal deletions in the presequence of an imported mitochondrial protein block the targeting function and proteolytic cleavage of the presequence at the carboxy terminus  
*J. Biol. Chem.* 262, 1420-1424
- INOUE H, NOJIMA H, OKAYAMA H (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids  
*Gene* 96, 23-28
- ISAYA G, KALOUSEK F, FENTON WA, ROSENBERG LE (1991). Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide  
*J. Cell Biol.* 113, 65-76
- ISAYA G, KALOUSEK F (1994a). Mitochondrial intermediate peptidase  
In: *von Heijne (ed.) Signal Peptidases* R.G. Landes Company, 87-103
- ISAYA G, MIKLOS D, ROLLINS R (1994b). *MIPI*, a new yeast homologous to the rat mitochondrial intermediate peptidase gene, is required for oxidative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*  
*Mol. Cell. Biol.* 14, 5603-5616
- IWATA S, OSTERMEIER C, LUDWIG B, MICHEL H (1995). Structure at 2,8 Å resolution of cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans*  
*Nature* 376, 660-669
- JAN P-S, ESSER K, PRATJE E, MICHAELIS G (2000). Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2  
*Mol. Gen. Genet.* 263, 483-491

- JÄNSCH L, KRUFFT V, SCHMITZ UK, BRAUN H-P (1998). Unique composition of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane from plants  
*J. Biol. Chem.* 273, 17251-17257
- KERSCHER O, HOLDER J, SRINIVASAN M, LEUNG MS, JENSEN RE (1997). The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane  
*J. Cell. Biol.* 139, 1663-1675
- KERSCHER O, SEPURI NB, JENSEN RE (2000). Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane  
*Mol. Biol. Cell* 11, 103-116
- KÖHRER K, DOMDEY H (1991). Preparation of high molecular weight RNA  
*Methods in Enzymology* 194, 398-401
- KOLODZIEJCZAK M, KOLACZKOWSKA A, SZECZESNY B, URANTOWKA A, KNORPP C, KIELECZAWA J, JANSKA H (2002). A higher plant homologue of the yeast m-AAA protease. Molecular cloning, localization, and putative function  
*J. Biol. Chem.* 277, 43792-43798
- KÜGLER M, BRUMME S, JÄNSCH L, WERHAHN W, SCHMITZ UK, BRAUN H-P (1998). Characterization of plant mitochondria by Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE)  
*In: Plant Mitochondria: From Gene to Function* Backhuys Publishers, Leiden, 273-276
- KUNAU WH, BEYER A, FRANKEN T, GOTTE K, MARZIOCH M, SAIDOWSKY J, SKALETZ-ROROWSKI A, WIEBEL FF (1993). Two complementary approaches to study peroxisome biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*: forward and reversed genetics  
*Biochimie* 75, 209-224
- LAEMMLI UK (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4  
*Nature* 227, 680-685
- LANG BF, GRAY MW, BURGER G (1999). Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes  
*Annu. Rev. Genet.* 33, 351-397
- LAW RHP, MANON S, DEVENISH RJ, NAGLEY P (1995). ATP synthase from *Saccharomyces cerevisiae*  
*Meth. Enzymol.* 260, 133-163
- LEONHARD K, HERRMANN JM, START RA, MANNHAUPT G, NEUWERT W, LANGER T (1996). AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria  
*EMBO J.* 15, 4218-4229

- LISTER R, MURCHA MW, WHELAN J (2003). The mitochondrial protein import machinery of plants (MPIMP) database  
*Nuc. Acids Research* 31, 325-327
- LOPEZ SOUZA R, GREEN-WILLMS NS, FOX TD, TZAGOLOFF A, NOBREGA FG (2000). Cloning and characterization of *COX18*, a *Saccharomyces cerevisiae* *PET* gene required for the assembly of cytochrome oxidase  
*J. Biol. Chem.* 275, 14898-14902
- MACCECCHINI M-L, RUDIN Y, BLOBEL G, SCHATZ G (1979). Import of proteins into mitochondria: precursor forms of extramitochondrially made F<sub>1</sub>-ATPase subunits in yeast  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 343-347
- MACINO G, TZAGOLOFF A (1979). Assembly of the mitochondrial membrane system. The DNA sequence of a mitochondrial ATPase gene in *Saccharomyces cerevisiae*  
*J. Biol. Chem.* 254, 4617-4623
- MACINO G, TZAGOLOFF A (1980). Assembly of the mitochondrial membrane system: sequence analysis of a yeast mitochondrial ATPase gene containing the oli-2 and oli-4 loci  
*Cell* 20, 507-517
- MARGULIS L (1970). Origin of eukaryotic cells  
*New Haven, CT: Yale Univ. Press.*, 349 ff.
- MARTIN J, MAHLKE K, PFANNER N (1991). Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import:  $\Delta\Psi$  drives the movement of presequences  
*J. Biol. Chem.* 266, 18051-18057
- MARTIN W, HERRMANN G (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why?  
*Plant Physiol.* 118, 9-17
- MARTIN W, MÜLLER M (1998). The Hydrogen hypothesis for the first eukaryote  
*Nature* 392, 37-41
- MATOUSCHEK A, ROSPERT S, SCHMID K, GLICK BS, SCHATZ G (1995). Cyclophyllin catalyzes protein folding in yeast mitochondria  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 6319-6323
- MCADA PC, DOUGLAS MG (1982). A neutral metallo endoprotease involved in the processing of an F<sub>1</sub>-ATPase subunit precursor in mitochondria  
*J. Biol. Chem.* 257, 3177-3182
- MEWES HW, ALBERMANN K, BÄHR M, FRIHMAN D, GLEISSNER A, HANI J, HEUMANN K, KLEINE K, MAIERL A, OLIVER SG, PFEIFFER F, ZOLLNER A (1997). Overview of the yeast genome  
*Nature* 387, 7-65

- MEYER W (1998). Mitochondriale Biogenese von *Saccharomyces cerevisiae*: Charakterisierung des *PET1402*-Genproduktes  
Dissertation am Institut für Allgemeine Botanik, Universität Hamburg, Hamburg
- MEYER W, BAUER M, PRATJE E (1997a). A mutation in cytochrome c subunit 2 restores respiration of mutant *pet ts1402*  
*Curr. Genet.* 31, 401-407
- MEYER W, BÖMER U, PRATJE E (1997b). Mitochondrial inner membrane bound *Pet1402* is rapidly imported into mitochondria and effects the integrity of the cytochrome oxidase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complexes.  
*Biol. Chem.* 378: 1373-1379
- MICHON T, GALANTE M, VELOURS J (1988). NH<sub>2</sub>-terminal sequence of the isolated yeast ATP synthase subunit 6 reveals post-translational cleavage  
*Eur. J. Biochem.* 172, 621-625
- MÜLLER M, MARTIN W (1999). The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts of on the origin of mitochondria and hydrogenosomes  
*Biessays* 21, 377-381
- NAKAI T, YASUHARA T, FUJIKI Y, OHASHI A (1995). Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome c oxidase in yeast mitochondria  
*Mol. Cell. Biol.* 15, 4441-4452
- NEUPERT W (1997). Protein import into mitochondria  
*Annu. Rev. Biochem.* 66, 863-917
- NGUYEN M, BELL AW, SHORE GC (1988). Protein Sorting between mitochondrial membranes specified by position of the stop-transfer domain  
*J Cell Biol.* 106, 1499-1505
- NIIDOME T, KITADA S, SHIMOKATA K, OGISHIMA T, ITO A (1994). Arginine Residues in the extension peptides are required for cleavage of a precursor by mitochondrial processing peptidase. Demonstration using synthetic peptide as a substrate  
*J Biol. Chem.* 269, 24719-22
- NOBREGA FG, NOBREGA MP, TZAGOLOFF (1992). *BCS1*, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*  
*EMBO J.* 11, 3821-3829
- NUGENT JM, PALMER JD (1991). RNA-mediated transfer of the *coxII* gene from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution  
*Cell* 66, 473-481
- NUNNARI J, FOX TD, WALTER P (1993). A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities  
*Science* 262, 1997-2004

- PAJIC A, TAUER R, FELDMANN H, NEUPERT W, LANGER T (1994). Yta10p is required for the ATP-dependent degradation of polypeptides in the inner membrane of mitochondria  
*FEBS Lett.* 353, 201-206
- PAUL M-F, TZAGOLOFF A (1995). Mutations in *RCA1* and *AFG3* inhibit F<sub>1</sub>-ATPase assembly in *Saccharomyces cerevisiae*  
*FEBS Lett.* 373, 66-70
- PEARCE DA, SHERMAN F (1995). Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome *c* and suppression of the degradation by mutation of *yme1*  
*J. Biol. Chem.* 270, 20879-20882
- PÉREZ-MARTÍNES X, ANTARAMIAN A, VÁZQUEZ-ACEVEDO M, FUNES S, TOLKUNOVAS E, D'ALAYER J, CLAROS MG, DAVIDSON E, KING MP, GONZÁLEZ-HALPHEN D (2001). Subunit II of cytochrome *c* oxidase in Chlamydomonad algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes  
*J. Biol. Chem.* 276, 11302-11309
- PERRYMAN RA, MOONEY B, HARMEY MA (1995). Identification of a 42-kDa plant mitochondrial outer membrane protein, TOM42, involved in the import of precursor proteins into plant mitochondria  
*Arch. Biochem. Biophys.* 316, 659-664
- PFANNER N, GEISSLER A (2001). Versality of the mitochondrial protein import machinery  
*Nature Rev.* 2, 339-349
- PFANNER N, HOEBEN, M, TROBSCHUG M, NEUPERT W (1987). The carboxyterminal two third of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria  
*J Biol. Chem.* 62, 14851-14854
- PFANNER N, NEUPERT W (1987). Distinct Steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria  
*J. Biol. Chem.* 262, 7528-7536
- POLLOCK RA, HARTL FU, CHENG MY, OSTERMANN J, HORWICH AL, NEUPERT W (1988). The processing peptidase of yeast mitochondria: The two co-operating components MPP and PEP are structurally related  
*EMBO J.* 7, 3493-3500
- POYTON RO, DUHL DMJ, CLARKSON GHD (1992). Protein export from the mitochondrial matrix  
*Trends Cell Biol.* 2, 369-375
- POYTON RO, MCEWEN JE (1996). Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes  
*Ann. Rev. Biochem.* 65, 563-607
- PRATJE E, ESSER K, MICHAELIS G (1994). The mitochondrial inner membrane peptidase in: *von Heijne (ed.) Signal Peptidases* R.G. Landes Company, 105-112

- PRATJE E, GUIARD B (1986). One nuclear gene controls the removal of transient presequences from two yeast proteins: one encoded by the nuclear the other by the mitochondrial genome  
*EMBO J.* 5, 1313-1317
- PRATJE E, MANNHAUPT G, MICHAELIS G, BEYREUTHER K (1983). A nuclear mutation prevents processing of a mitochondrially encoded membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*  
*EMBO J.* 2, 1049-1054
- PRATJE E, MICHAELIS G (1977). Allelism studies of mitochondrial mutants resistant to antimycin A or funiculosin in *Saccharomyces cerevisiae*  
*Mol. Gen. Genet.* 152, 167-184
- PRATJE E, SCHULZ R, SCHNIERER S, MICHAELIS G (1979). Sporulation of mitochondrial respiratory deficient *mit<sup>-</sup>* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*  
*Mol. Gen. Genet.* 176, 411-415
- RASSOW J, MOHRS K, KOIDL S, BARTHELMESS IB, PFANNER N, TROPSCHUG M (1995). Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones hsp70 and hsp60  
*Mol. Cell. Biol.* 15, 2654-2662
- REP M, VAN DIJL JM, SOUDA K, SCHATZ G, GRIVELL LA, SUZUKI CK (1996a). Promotion of mitochondrial membran complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon  
*Science* 274, 103-106
- REP M, NOOY J, GUÉLIN E, GRIVELL LA (1996b). Three genes for mitochondrial proteins suppress null-mutations in both Afg3 and Rca1 when over-expressed  
*Curr. Genet.* 30, 206-211
- REP M, GRIVELL LA (1996). *MBA1* encodes a mitochondrial membran-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain  
*FEBS Lett.* 388, 185-188
- ROBINSON KM, LEMIRE BD (1995). Flavinylation of succinate: Ubichinon Oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*  
*Meth. Enzymol.* 260, 34-51
- ROJO EM, GUIARD B, NEUPERT W, STUART RA (1998). Sorting of D-lactat dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria  
*J. Biol. Chem.* 273, 8040-8047
- ROJO EM, GUIARD B, NEUPERT W, STUART RA (1999). N-terminal tail export from the mitochondrial matrix  
*J. Biol. Chem.* 274, 19617-19622
- ROSPERT S, JUNNE T, GLICK BS, SCHATZ G (1993). Cloning and diasruption of the gene encoding yeast mitochondrial chaperonin 10, the homolog of *E. coli* groES  
*FEBS Lett.* 335, 350-360

- SAIKI RK, GELFAND DH, STOFFEL S, SCHARF SJ, HIGUCHI R, HORN GT, MULLIS KB, ERLICH HA (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase  
*Science* 239, 487-491
- SAMBROOK J, FRITSCH EM, MANIATIS T (1989). Molecular cloning: A laboratory manual 2. Edition, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York
- SANGER F, NICKLEN S, COULSEN AR (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-6567
- SCHÄGGER H (2002). Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria  
*Biochim Biophys Acta* 1555, 154-159
- SCHÄGGER H, VON JAGOW G (1991). Blue native gel electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form  
*Anal. Biochem.* 199, 223-231
- SCHÄGGER H, PFEIFFER K (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria  
*EBMO J.* 19, 1777-1783
- SCHATZ G (1986). Protein translocation: a common mechanism for different membrane systems?  
*Nature* 321, 108-109
- SCHATZ G (1997). Just follow the acid chain  
*Nature* 388, 121-122
- SCHMITZ UK, LONSDALE DM (1989). A yeast mitochondrial presequence functions as a signal for targeting to plant mitochondria in vivo  
*Plant Cell* 1, 783-791
- SCHNALL R, MANNHAUPT G, STUCKA R, TAUER R, EHNLE S, SCHWARZLOSE C, VETTER I, FELDMANN H (1994). Identification of a set of yeast genes coding for a novel family of putative ATPases with high similarity to constituents of the 26S protease complex  
*Yeast* 10, 1141-1155
- SCHNEIDER A, BEHRENS M, SCHERER P, PRATJE E, MICHAELIS G (1991). Inner membrane protease 1, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast  
*EMBO J.* 10, 247-254
- SCHNEIDER A, OPPLINGER W, JENÖ P (1994). Purified inner membrane protease I of yeast mitochondria is a heterodimer  
*J. Biol. Chem.* 269, 8635-8638

- SCHNEIDER G, SJÖLING S, WALLIN E, WREDE P, GLASER E, VON HEIJNE G (1998). Feature-extraction in mitochondrial targeting peptides  
*PROTEINS: Structure, Function, and Genetics* 30, 49-60
- SIRRENBURG C, BAUER MF, GUIARD B, NEUPERT W, BRUNNER M (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22  
*Nature* 384, 582-585
- SJÖLING S, GLASER E (1998). Mitochondrial targeting peptides in plants  
*Trends Plant Sci.* 3, 136-140
- STUART RA (2002). Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex  
*Biochim. Biophys. Acta* 1592, 79-87
- STUART RA, NEUPERT W (2000). Making membranes in bacteria  
*Nature*, 406, 575-577
- SUZUKI CK, SUDA K, WANG N, SCHATZ G (1994). Requirement for the yeast gene *LON* in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration  
*Science* 264, 273-276
- SZIGYARTO C, DESSI P, SMITH MK, KNORPP C, HARMEY MA, DAY DA, GLASER E, WHELAN J (1998). A matrix-located processing peptidase of plant mitochondria.  
*Plant Mol. Biol.* 36, 171-181
- TANUDJI M, SJÖLING S, GLASER E, WHELAN J (1999). Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria  
*J. Biol. Chem.* 274, 1286-1293
- TAUER R, MANNHAUPT G, SCHNALL R, PAJIC A, LANGER T, FELDMANN H (1994). Yta10p, a member of a novel ATPase family in yeast, is essential for mitochondrial function  
*FEBS Lett.* 353, 197-200
- TAYLOR FJR (1974). Implications and extensions of the Serial Endosymbiosos Theory of the origin of eukaryotes  
*Taxon* 23, 229-258
- THALENFELD BE, TZAGOLOFF A (1980). Assembly of the mitochondrial membrane system: sequence of the *oxi2* gene of yeast mitochondrial DNA  
*J. Biol. Chem.* 255, 6173-6180
- THORSNESS PE, WHITE KH, FOX TD (1993). Inactivation of YME1, a member of the *FtsH-SEC18-PAS1-CDC48* family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*  
*Mol. Cell. Biol.* 13, 5418-5426
- TOKATLIDIS K, SCHATZ G (1999). Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins  
*J. Biol. Chem.* 274, 35285-35288

- TORRELLA AT, OVERHOLTZER MH, CAMERON VL, BONNEFOY N, FOX TD (1997). Deletion of the leader peptide of the mitochondrially encoded precursor of *Saccharomyces cerevisiae* Cytochrome *c* oxidase subunit II  
*Genetics* 145, 903-910
- TOWBIN H, STAHLIN T, GORDON J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamid gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354
- TRUMPOWER BL (1990). Cytochrome *bc<sub>1</sub>* complexes from microorganisms  
*Microbiol. Reviews* 54, 101-129
- TSUKIHARA T, AOYAMA H, YAMASHITA E, TOMIZAKI T, YAMAGUCHI H, SHINZAWA-ITOH K, NAKASHIMA R, YAONO R, YOSHIKAWA S (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2,8 Å  
*Science* 272, 1136-1144
- TZAGOLOFF A (1995). Ubichinol-cytochrome-*c* oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*  
*Meth. Enzymol.* 260, 51-63
- TZAGOLOFF A, YUE J, JANG J, PAUL M-F (1994). A new member of a family of ATPases is essential for assembly of mitochondrial respiratory chain and ATP synthase complexes in *Saccharomyces cerevisiae*  
*J. Biol. Chem.* 269, 26144-26151
- VAN DIJL JM, DE JONG A, VEHEMAANPERÄ J, VENEMA G, BRON S (1992). Signal peptidase I of *Bacillus subtilis*: patterns of conserved amino acids in prokaryotic and eukaryotic type I signal peptidases  
*EMBO J.* 11, 2819-2828
- VAN DYCK L, PEARCE DA, SHERMAN F (1994). *PIMI* encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*  
*J. Biol. Chem.* 269, 238-242
- VOISINE C, CRAIG EA, ZUFALL N, VON AHSEN O, PFANNER N, VOOS W (1999). The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70  
*Cell* 97, 565-574
- VON HEIJNE G (1986). Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices  
*EMBO J.* 5, 1335-1342
- VON HEIJNE G (1992). Membrane protein structure prediction: Hydrophobicity analysis and the „Positiv inside rule“  
*J. Mol. Biol.* 225, 487-494
- WALLACE DC (1992). Diseases of mitochondrial DNA  
*Ann. Rev. Biochem.* 61, 1175-1212

- WESTERMANN B, GAUME B, HERRMANN JM, NEUPERT W, SCHWARZ E (1996). Role of the mitochondrial DnaJ homolog Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins  
*Mol. Cell. Biol.* 16, 7063-7071
- WHELAN J, TANUDJI MR, SMITH MK, DAY DA (1996). Evidence for a link between translocation and processing during import into soybean mitochondria  
*Biochim. Biophys. Acta* 1312, 48-54
- YAFFE MP (1991). Analysis of mitochondrial function and assembly  
*Meth. Enzymol.* 194, 627-643
- YAFFE MP, OHTA S, SCHATZ G (1985). A yeast mutant temperature- sensitive for mitochondrial assembly is deficient in a mitochondrial protease activity that cleaves imported precursor polypeptides  
*EMBO J.* 4, 2069-2074
- YANG MJ, GELI V, OPPLIGER W, SUDA K, JAMES P, SCHATZ G (1991). The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria. Interaction of the purified enzyme with signal peptides and a purified precursor protein.  
*J. Biol. Chem.* 266, 6416-6423
- ZIMMERMANN R, NEUWERT W (1980). Transport of proteins into mitochondria. Posttranslational transfer of ADP/ATP carrier into mitochondria in vitro  
*Eur. J. Biochem.* 109, 217-229

## **Danksagung**

Frau Prof. Pratje danke ich ganz herzlich für die Bereitstellung des Themas, ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre Unterstützung während all der Zeit. Vielen Dank, die Arbeit in Ihrem Labor hat mir großen Spaß gemacht!

Dem evangelischen Studienwerk „Haus Villigst“ danke ich herzlich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen eines Stipendiums und für die wertvollen Anregungen, die ich bei den Seminaren bekommen habe.

Des weiteren danke ich Dr. Jim Whelan und Dr. Dan Daley für eine großartige und ausserordentlich fruchtbare Kooperation, die mir diese Arbeit sehr erleichtert hat und für die Möglichkeit, dass ich einige Zeit in ihrem Labor in Perth verbringen konnte.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Pratje, insbesondere Barbara Schumacher, danke ich ganz herzlich für die Hilfe im Labor und das konstant gute Klima in der Gruppe! Den ehemaligen und derzeitigen Diplomanden dieses Labors ebenfalls herzlichen Dank für eine tolle Zeit, Nicole Seibel zusätzlich herzlichen Dank für das Lesen von Teilen des Manuskriptes und Patrizia Stohn für Hilfe bei Experimenten im Rahmen ihrer Projektstudie.

Außerdem danke ich Prof. Mühlbach sowie Dr. Werner und natürlich auch allen Mitarbeitern beider Arbeitsgruppen herzlich für zahlreiche Hinweise bezüglich meiner Arbeit und für eine angenehme Zusammenarbeit.

Nicht zuletzt möchte ich natürlich meinen Eltern für ihre Unterstützung danken und für die Zuversicht, die sie mir entgegengebracht haben. Ohne Euch wäre das alles nicht möglich gewesen!

Sven danke ich, dass er während dieser Zeit zu mir gehalten hat und mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand! Du hast mir die Kraft gegeben!