

Die Co-Evolution der Cytochrom c Reduktase und der mitochondrialen Prozessierungsprotease

Von dem Fachbereich Biologie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.

genehmigte
Dissertation

von
Stefanie Marx, geb. Brumme
geboren am 18.09.1970 in Sangerhausen

2000

Referent: PD Dr. H.-P. Braun

Koreferent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Tag der Promotion: 07.06.2000

Gedankt sei an dieser Stelle Prof. Dr. U. K. Schmitz für die Überlassung des Themas, für die geführten Diskussionen und für das in meine Arbeit gesetzte Vertrauen.

Mein besonderer Dank gilt Priv.-Doz. Dr. H.-P. Braun für die engagierte wissenschaftliche Betreuung der Arbeit, insbesondere für seine Unterstützung im vergangenen Jahr.

Frau Dr. I. B. Barthelmeß danke ich herzlich für den zur Verfügung gestellten Laborarbeitsplatz und für ihr Interesse an dem von mir bearbeiteten Projekt. Den ehemaligen Mitarbeitern ihrer Arbeitsgruppe danke ich für das gute und produktive Arbeitsklima im Labor.

Für die Ermöglichung eines Aufenthaltes in seinem Labor an der „Yale University School of Medicine“ in New Haven danke ich Herrn Prof. Dr. F. Kalousek. Dr. J. Adamec gilt mein Dank für die wissenschaftliche Unterstützung und die Gastfreundschaft während dieses Aufenthaltes.

Bei Prof. Dr. G. Auling und Inge Reupke vom Institut für Mikrobiologie der Universität Hannover möchte ich mich für die Unterstützung bei der Auswahl eines geeigneten Futterbakteriums für *Reclinomonas americana* bedanken.

Frau Dipl.-Biol. Elke Buchsteiner hat Vorarbeiten zu den phylogenetischen Analysen der vorliegenden Dissertation geleistet und mir darüber hinaus hilfreiche Hinweise zum Arbeiten mit Programmen des Phylip-Softwarepaketes gegeben. Auch ihr sei an dieser Stelle sehr gedankt. Allen Kollegen der Abteilung Angewandte Genetik, die in irgendeiner Weise einen Beitrag zur vorliegenden Arbeit geleistet haben, möchte ich ebenfalls danken.

Der größte Dank gilt meiner lieben Familie für den Rückhalt und die in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung. Insbesondere danke ich meinen Eltern für die zeitweilige Betreuung meines Sohnes. Nur so habe ich die Zeit zum Schreiben dieser Dissertation gefunden.

Kai-Uwe verdanke ich mehr, als ich in wenigen Sätzen sagen kann.

Meinem kleinen Sohn Benjamin möchte ich diese Arbeit widmen.

Inhalt

	Seite
I. Zusammenfassung	1
II. Einleitung	4
1. Evolution der Mitochondrien	4
2. Der Cytochrom c Reduktase-Komplex	7
3. Die mitochondriale Prozessierungsprotease	10
4. Ein Modell zur Evolution von MPP-Untereinheiten und Core-Proteinen	15
5. Zielsetzung der Arbeit	16
III. Material und Methoden	18
1. Material	18
1.1 Chemikalien, Lösungsmittel und sonstige Verbrauchsmittel	18
1.2 Versuchsorganismen	18
1.3 Antikörper	19
1.4 Plasmide und Expressionsvektoren	19
1.5 Oligonukleotide	20
2. Präparation von Mitochondrien	21
2.1 Aufreinigung aus <i>Solanum tuberosum</i>	21
2.2 Isolation aus <i>Platycerium bifurcatum</i>	21
2.3 Isolation aus <i>Equisetum arvense</i>	22
2.4 Aufreinigung aus <i>Polytomella</i> spp.	22
2.5 Isolation aus <i>Reclinomonas americana</i>	23
2.6 Aufreinigung aus <i>Neurospora crassa</i>	23
3. Proteinbiochemische Methoden	24
3.1 Grundmethoden der Proteinanalyse	24
3.2 Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus <i>Neurospora crassa</i>	27
3.3 Reinigung überexprimierter ‚His-Tag‘-Proteine	29
3.4 Prozessierungs-Enzymtests	30
4. Molekularbiologische Methoden	31
4.1 Grundtechniken zur Analyse von Nukleinsäuren	31

4.2	DNA-Sequenzierung	31
4.3	Transformation von Plasmid-DNA	31
4.4	Polymerasekettenreaktion	33
4.5	Southern Blot Analyse	33
4.6	Northern Blot Analyse	33
4.7	Screening einer cDNA-Bank von <i>Neurospora crassa</i>	34
4.8	Herstellung und Screening einer genomischen DNA-Bank von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	35
5.	Computeranalysen von DNA- und Aminosäuresequenzen	36
5.1	Identifikation von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen	36
5.2	Erstellung multipler Sequenzalignments	36
5.3	Bestimmung von Abstammungsverhältnissen	36
5.4	Ermittlung von degenerierten Oligonukleotidsequenzen	37
5.5	Berechnung und Vorhersage einiger Eigenschaften von Proteinen	37
IV.	Ergebnisse	38
1.	Charakterisierung der Untereinheitenkomposition und Analyse der Prozessierungsaktivität von Cytochrom c Reduktasen ausgewählter Eukaryoten	38
1.1	Zweidimensionale Auftrennung mitochondrialer Proteinkomplexe von niederen Pflanzen und <i>Reclinomonas americana</i> durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE	38
1.2	Aufreinigung der Cytochrom c Reduktasen von <i>Platyserium bifurcatum</i> , <i>Equisetum arvense</i> und <i>Polytomella</i> spp.	44
1.3	Identifizierung von Untereinheiten der aufgereinigten Cytochrom c Reduktasen	44
1.4	Stöchiometrie und Untereinheitenkomposition der aufgereinigten Cytochrom c Reduktasen	47
1.5	Die Prozessierungsaktivitäten der gereinigten Cytochrom c Reduktasen	50
2.	Untersuchungen zur Co-Evolution der Cytochrom c Reduktase und der mitochondrialen Prozessierungsprotease am Modellorganismus <i>Neurospora crassa</i>	52
2.1	Isolation der cDNA des <i>core II</i> aus <i>Neurospora crassa</i>	52
2.2	Genomische Kartierung des <i>core II</i> -Gens von <i>Neurospora crassa</i>	54
2.3	<i>In vitro</i> Mutagenese der <i>core II</i> -cDNA von <i>Neurospora crassa</i> – Konstruktion einer chimären cDNA aus <i>core II</i> und α - <i>mpp</i>	56
2.4	Erzeugung von <i>N. crassa</i> Transformanten mit einer chimären cDNA aus <i>core II</i> und α - <i>mpp</i> und Analyse der Cytochrom c Reduktasen transformierter Stämme hinsichtlich einer rekonstituierten Prozessierungsaktivität	58
2.5	<i>In vitro</i> Studien am überexprimierten chimären Protein aus Core II und α -MPP	68

3.	Identifizierung einer MPP-artigen Protease aus <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	71
3.1	Erstellung einer repräsentativen genomischen DNA-Bank von <i>Rhodobacter sphaeroides</i>	72
3.2	Isolation eines Gens für eine MPP-artige Protease	72
3.3	Überexpression des Gens für die MPP-artige Protease und Aufreinigung des rekombinanten Proteins	76
3.4	Immunologische Identifizierung der MPP-artigen Protease nach BN-PAGE von bakteriellem Gesamtprotein	77
4.	Phylogenetische Analyse der mitochondrialen Prozessierungsprotease auf der Grundlage von Sequenzvergleichen	80
4.1	Phylogenetische Beziehungen zwischen eukaryotischen Vertretern der Pitrilysinfamilie	82
4.2	Stammbaum eubakterieller Vertreter der Pitrilysinfamilie	85
4.3	Phylogenetische Beziehungen von eubakteriellen, eukaryotischen und archae Vertretern der Pitrilysinfamilie	87
4.4	Stammbaum der Unterfamilie MPP-artiger Proteine	90
4.5	Phylogenetische Analyse der Core-Proteine und Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease	92
V.	Diskussion	95
1.	Die Cytochrom c Reduktasen aus niederen Pflanzen	95
2.	Cytochrom c Reduktasen von Protisten – spiegeln sie Zwischenstadien in der Evolution der komplexen Cytochrom c Reduktasen höherer Eukaryoten wider?	97
3.	Die charakteristische hydrophobe Domäne der α -MPPs	98
4.	Hat sich die mitochondriale Prozessierungsprotease aus einer hydrophilen Protease, die sich ursprünglich im Cytosol von Bakterien befand, entwickelt?	101
5.	Die Evolution der mitochondrialen Prozessierungsprotease innerhalb der Evolution der Pitrilysinfamilie	102
6.	Kritische Beurteilung des Ausgangsmodells zur Evolution der MPP-Untereinheiten und Core-Proteine	105
7.	Ein Alternatives Modell für die Entstehung der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten	111
VI.	Literatur	114
VII.	Anhang	135



I. Zusammenfassung

Die sogenannten Core-Proteine der Cytochrom c Reduktase und die zwei Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease (MPP) sind strukturell sehr ähnlich aber ihre evolutionäre Beziehung zueinander ist ungeklärt. In der vorliegenden Dissertation werden Daten präsentiert, die bekräftigen, daß sich die mitochondriale Prozessierungsprotease aus einer bakteriellen Protease entwickelt hat und daß die Core-Proteine der Cytochrom c Reduktase Relikte der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease sind. Damit werden zwei Kernpunkte eines Modells von Braun und Schmitz (1995b) zur Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten gestützt.

Erstmals werden Ergebnisse von strukturellen und funktionellen Untersuchungen an Cytochrom c Reduktasen niederer Pflanzen präsentiert. Die Cytochrom c Reduktasen aus einem Schachtelhalm, *Equisetum arvense*, einem Farn, *Platycerium bifurcatum* und der chloroplastenfreien Alge, *Polytomella* spp., wurden über ein Mikroisoliationsverfahren präpariert, welches auf der nativen Auftrennung mitochondrialer Proteinkomplexe über BN-PAGE und anschließender Elektroelution beruht. In Übereinstimmung zu bisher untersuchten Cytochrom c Reduktasen von Eukaryoten weisen auch die drei isolierte Enzyme aus niederen Pflanzen eine komplexe Untereinheitenkomposition auf. Dies unterscheidet die Cytochrom c Reduktasen aus Eukaryoten von den einfach organisierten Proteinkomplexen der Eubakterien mit maximal vier Untereinheiten. Die Cytochrom c Reduktasen des Farns und des Schachtelhalms weisen, wie die entsprechenden Proteinkomplexe aus höheren Pflanzen, Prozessierungsaktivität gegenüber mitochondrialen Vorläuferproteinen auf und können deshalb als bifunktionelle Cytochrom c Reduktase/Prozessierungsprotease-Komplexe bezeichnet werden. Der Cytochrom c Reduktase-Komplex aus *Polytomella* spp. ist keine Prozessierungsprotease. Die Isolation und Sequenzierung der *core II*-cDNA von *Neurospora crassa* hat gezeigt, daß das Core II der Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora crassa* eine für α -MPPs charakteristische hydrophobe Domäne im C-terminalen Bereich nicht besitzt. Versuche zur Rekonstitution der Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora crassa* durch Einführung dieser Domäne in das Core II können bisher noch nicht abschließend beurteilt werden.

In umfassenden phylogenetischen Analysen werden die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den Core-Proteinen der Cytochrom c Reduktase, den Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease und anderen Mitgliedern der Pitrilysinfamilie aufgezeigt. Dabei wurde nachgewiesen, daß drei Sequenzen von putativen Proteasen aus α -

Proteobakterien eine sehr große Ähnlichkeit zu den β -MPPs aufweisen. Unter Einbeziehung der Auffassung, daß die rezenten α -Proteobakterien und die Mitochondrien einen gemeinsamen α -proteobakteriellen Vorfahren besaßen, ist dies ein wichtiges Indiz dafür, daß sich die mitochondriale Prozessierungsprotease aus einer Protease dieses gemeinsamen Vorfahren entwickelt hat.

Aus einer genomischen DNA-Bank von *Rhodobacter sphaeroides* wurde ein Gen isoliert, welches für eine MPP-artige Protease kodiert. Das entsprechende Protein wurde mit spezifischen Antikörpern immunologisch nachgewiesen. Vermutlich ist die putative Protease ein lösliches Enzym. Die Isolation und Charakterisierung der potentiellen MPP-artigen Protease aus *Rhodobacter sphaeroides* wird möglicherweise Hinweise darauf geben, warum eine Protease aus einem Vorfahren der Mitochondrien das Potential zur Entwicklung der Prozessierungsaktivität besaß.

Abschließend wird eine alternative Erklärungsmöglichkeit zum Modell von Braun und Schmitz (1995b) für die Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten vorgestellt.

Abstract

The so-called Core-proteins of the respiratory cytochrome bc_1 complex and the two subunits of the mitochondrial processing peptidase (MPP) are structurally similar but their evolutionary relationship remains a mystery. The data which are presented in this work support that the mitochondrial processing peptidase originated from an ancient bacterial protease and that the Core-proteins are relics of the mitochondrial processing peptidase. This is in agreement with two major assumption of a model for the evolution of MPP suggested by Braun and Schmitz (1995b).

For the first time data on the biochemical preparation and functional characterization of the cytochrome c reductases from lower plants are reported. Cytochrome c reductase complexes from the horsetail *Equisetum arvense*, from the staghorn fern *Platynerium bifurcatum*, and from the colorless algae *Polytomella* spp. were purified by a micro-isolation procedure based on BN-PAGE and electroelution. The subunit composition of the cytochrome c reductases from lower plants is very similar to the one reported for other mitochondrial cytochrome c reductases, which differs remarkably from the structure of the corresponding prokaryotic protein consisting of only three or four subunits. In agreement with the data from other plants, cytochrome c reductases from the fern and the horsetail comprise processing activity against

radiolabeled precursor proteins. Therefore, they are bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complexes. In contrast the cytochrome c reductase from *Polytomella* spp. has no proteolytic activity.

Furthermore a *core II*-cDNA clone from *Neurospora crassa* was isolated. Sequencing of the clone revealed that the Core II of the cytochrome c reductase from *Neurospora crassa* does not comprise the typical hydrophobic α -MPP domain. Experiments to reconstitute the processing activity by incorporating this α -MPP domain into the Core II from *Neurospora crassa* did not allow to draw definite conclusions.

Comprehensive phylogenetic analyses were performed to investigate the phylogenetic relationships between the Core-proteins and the subunits of the mitochondrial processing peptidase as well as the relationships between the other members of the pitrilysin family of endoproteases. The analyses revealed that three putative proteases from α -proteobacteria are strongly related to the β -MPPs. In consideration of the classical view that mitochondria and recent α -proteobacteria share a common α -proteobacterial ancestor this implies that the mitochondrial processing peptidase has evolved from a protease of this common ancestor.

A gene encoding a MPP-like protease was isolated from a genomic library of *Rhodobacter sphaeroides*. The corresponding protein was identified by Western Blotting with a specific antiserum. Most likely the protease is a soluble protein. The isolation and characterization of this putative MPP-like protease from *Rhodobacter sphaeroides* may help to understand why a protease from a ancestor of mitochondria had the potential to become a processing peptidase.

A new alternative model for the evolution of Core-proteins and MPP-subunits is presented.

Schlagwörter:

Cytochrom c Reduktase, mitochondriale Prozessierungsprotease, Mitochondrien

Keywords:

cytochrome c reductase, mitochondrial processing peptidase, mitochondria

II. Einleitung

Alle heute lebenden Organismen sind das Ergebnis eines Evolutionsprozesses, der auf der zufälligen Variation des Erbgutes und der Selektion genetischer Information, die den Besitzern ermöglicht, zu überleben und sich zu vermehren, beruht (Alberts et al., 1997). Dieser Evolutionsprozeß ist *a posteriori* weder in seinem spezifischen Ablauf rekonstruierbar, noch einer experimentellen Analyse zugänglich. Indizienbeweise werden deshalb genutzt, um den Verlauf der Evolution nachzuzeichnen und Evolutionsmechanismen zu begreifen.

In der vorliegenden Dissertation werden Aspekte zur Evolution bzw. Co-Evolution zweier mitochondrialer Enzyme, der Cytochrom c Reduktase und der mitochondrialen Prozessierungsprotease, untersucht. Da die Evolution von Proteinen zugleich aus der Entwicklung ihrer Funktionen und der Evolution der Organismen mit unterschiedlicher Komplexität resultiert, sind Untersuchungen zur Evolution mitochondrialer Proteine auch an das Verständnis zur Evolution der Mitochondrien gebunden. In den folgenden Kapiteln wird deshalb der aktuelle Kenntnisstand zur Evolution der Mitochondrien umrissen bzw. werden die Cytochrom c Reduktase und die mitochondriale Prozessierungsprotease sowie ein Modell zu ihrer Co-Evolution vorgestellt.

1. Evolution der Mitochondrien

Der Ursprung der Mitochondrien und die Entstehung der eukaryotischen Zelle

Der Ursprung der eukaryotischen Zellen mit spezialisierten Organellen und abgegrenztem Zellkern ist ein ungelöstes Rätsel. Nach der seit 30 Jahren weitgehend akzeptierten Endosymbionten-Hypothese stammen die Mitochondrien von einst freilebenden Organismen ab, die vor ca. 1,5 Milliarden Jahren als Symbionten in eine Wirtszelle aufgenommen wurden. Die urkaryotische Wirtszelle unterschied sich bereits durch ihre Größe, ein primitives Cytoskelett, den Zellkern und die Fähigkeit zur Endocytose von den übrigen Prokaryoten. Vermutlich stabilisierte sich die Endosymbiose durch eine erhöhte ATP-Ausbeute für den Wirt aus der Atmung des Endosymbionten. Dieser erhielt im Gegenzug metabolisierbare Substrate (Margulis, 1970). Zahlreiche Abstammungsuntersuchungen auf der Grundlage molekularer Daten haben im Einklang mit der Endosymbionten-Hypothese zu der Auffassung geführt, daß die einstigen Endosymbionten zu den α -Purpurbakterien gehörten und die urkaryotische Zelle von den Archaea abstammte (Villanueva et al., 1985; Cedergreen et al., 1988; Gupta, 1995; Gray, 1996; Andersson et al., 1998).

Aus aktueller Sicht lassen sich jedoch durch die klassische Endosymbionten-Hypothese folgende Sachverhalte nicht erklären:

(i) Das Kerngenom ist eine evolutionäre Chimäre, die aus einem archaeobakteriellen und eubakteriellen Vorfahren hervorgegangen ist (Feng et al., 1997). Der eubakterielle Anteil des Kerngenoms ist größer als durch einfachen Gentransfer erklärt werden kann. Darunter sind Gene, die nichts mit der mitochondrialen Biogenese oder Funktion zu tun haben (Keeling & Doolittle, 1997).

(ii) Hydrogenosomen und Mitochondrien sind monophyletischen Ursprungs (Bui et al., 1996). Im Unterschied zu Mitochondrien gewinnen die Hydrogenosomen aus einem mol Glucose unter anaeroben Bedingungen nur ein mol ATP und erzeugen H_2 , CO_2 und Acetat. Der ursprüngliche Vorteil der Endosymbiose, erhöhte ATP-Ausbeute, ist nicht gegeben.

(iii) Amitochondriale Archezoa, denen eine Rolle als nahe Verwandte der urkaryotischen Zelle zugeschrieben wurde, besitzen typische mitochondriale Proteine. In einigen Fällen kommen diese Proteine in Hydrogenosomen vor. Im Widerspruch zur Ausgangshypothese legt dies nahe, daß die amitochondrialen Archezoa einst Mitochondrien besaßen, diese aber sekundär verloren haben (Doolittle, 1998).

(iv) Das Genom des Archae *Archaeoglobus* besitzt einen großen Anteil eubakterieller Gene (Klenk et al., 1997).

Eine plausible Erklärung dieser Punkte und zugleich radikal neue Sicht auf die Evolution der eukaryotischen Zelle bietet die Hydrogen-Hypothese (Martin & Muller, 1998). Diese geht davon aus, daß die Entwicklung der eukaryotischen Zelle mit einer Syntrophie zwischen einem Methan-bildenden Archae und einem fakultativ anaeroben α -Purpurbakterium in einer anaeroben Umgebung begann. Die Attraktivität des α -Purpurbakteriums für den Methanbildner bestand in der Erzeugung und Exkretion von H_2 und CO_2 als Abfallprodukte der anaeroben Fermentation, welche dem Methanbildner als Substrate dienten. Aus einem zunächst losen Kontakt beider Syntrophie-Partner entstand ein Abhängigkeitsverhältnis, als die Bakterien aus ihrer wasserstoffreichen Umgebung entfernt wurden. Der Archae-Partner mußte das α -Purpurbakterium eng an sich binden, durfte es aber nicht von seinen organischen Substraten trennen. Erst der Transfer von Genen für Importproteine fermentierbarer Substrate und Enzyme für die Glycolyse vom Bakterium in das Genom des Archae erlaubten die totale Vereinnahmung. Die Folge davon war, daß im Cytoplasma des Archae gegenläufig zum eigenen anabolen Kohlenstoffmetabolismus die Glycolyse stattfand. Für das Überleben der Symbiose mußte der anabole Wirtmetabolismus verloren gehen. Damit konvertierte der Wirt von einem methanbildenden autotrophen Organismus zu einem heterotrophen. Der Symbiont

ging entweder verloren, wurde ein Hydrogenosom oder wurde ein Mitochondrium (in der evolutionären Linie, die zu vielzelligen Organismen führte). Die Divergenz der eukaryotischen Hauptlinien verlief demnach nahezu simultan und der Ursprung der Mitochondrien ist direkt und kausal mit der Entstehung der eukaryotischen Zelle verbunden (Gray et al., 1999).

Gentransfer vom Mitochondrium in den Zellkern und die Etablierung eines Proteinimportapparates

Die relativ geringe Anzahl von Genen in der mitochondrialen DNA von rezenten Organismen im Vergleich mit dem kleinsten bekannten eubakteriellen Genomen und die großen Unterschiede im Gengehalt unterschiedlicher Chondriome deuten auf einen relativ schnellen und extensiven Verlust und Transfer der genetischen Information zum Zellkern in einem sehr frühen Stadium der Evolution des protomitochondrialen Genoms (Gray et al., 1999). Tatsächlich kann jedoch der Transfer von Genen vom Mitochondrium in den Zellkern auch durch relativ rezente Beispiele belegt werden. So wurde der Transfer einzelner Gene von Atmungskettenproteinen und ribosomalen Proteinen in den Kern als auch der Transfer eines Abschnitts mit 75 % des mitochondrialen Genoms von *Arabidopsis thaliana* zum Chromosom 2 nachgewiesen (Nugent & Palmer, 1991; Grohmann et al., 1992; Kobayashi et al., 1997; Lin et al., 1999). Im Resultat des Gentransfers aus dem Mitochondrium in den Kern sind mehr als 98 % der mitochondrialen Proteine kernkodiert und werden an cytoplasmatischen Ribosomen translatiert (Attardi & Schatz, 1988; Neupert, 1997).

Parallel zu dieser Translokation von Genen haben sich Proteine eines ‚Protein-Import-Apparates‘, die für den Rücktransport von kernkodierten mitochondrialen Proteinen in die Mitochondrien verantwortlich sind, sowie spezifische Leitsequenzen, mit denen zu transportierende Eiweiße ausgestattet wurden, entwickelt. Die Leitsequenzen ermöglichen dabei die Zielsteuerung der mitochondrialen Vorläuferproteine zu den Mitochondrien, werden von Proteinen des Import-Apparates erkannt und sind für die intramitochondriale Sortierung von Proteinen, das heißt für den Transport zu Subkompartimenten innerhalb der Mitochondrien, verantwortlich. Die meisten Leitsequenzen sind N-terminale Extensionen, deren Längen zwischen 8 und 121 Aminosäureresten variieren (Schneider et al., 1998). Möglicherweise kann ihre Entstehung durch den Prozeß des ‚Exon Shuffling‘ erklärt werden, bei dem Exons nicht verwandter Gene neu kombinieren (Wischmann et al., 1995; Long et al. 1996). Wahrscheinlich ist auch, daß die Translokation von mitochondrialen Genen in den Kern in jedem

Einzelfall mehrfach stattgefunden hat und daß es von der genetischen Umgebung der Insertionsereignisse abhing, ob die translozierten Gene mit Zusatzsequenzen ausgestattet wurden, die für Leitsequenzen kodieren.

Zu den im Verlauf der Evolution entstandenen Proteinen des ‚Protein-Import-Apparates‘ gehören: (i) Translokasen der äußeren und inneren mitochondrialen Membran, die Leitsequenzen erkennen und den Transfer über die Membranen oder die Insertion in Membranen katalysieren, (ii) Enzyme, die Leitsequenzen abtrennen, nachdem die importierten Proteine ihren Bestimmungsort erreicht haben und (iii) Chaperone im Cytosol, welche die mitochondrialen Vorläuferproteine in einer Import-kompetenten Konformation erhalten und Chaperone bzw. Chaperonine im Inneren der Mitochondrien, die in die Translokation, Faltung und Assemblierung von importierten Proteinen involviert sind (Braun & Schmitz, 1999).

Die Konservierung mitochondrialer Leitsequenzen in mitochondrialen und hydrogenosomalen Vorläuferproteinen von ursprünglichen Protisten impliziert die Konservierung von Komponenten des Importapparates, die teilweise sehr früh in der Evolution der Mitochondrien entstanden sein müssen (Häusler et al., 1997).

2. Der Cytochrom c Reduktase-Komplex

Die Cytochrom c Reduktase (Ubichinol Cytochrom c Oxidoreduktase oder bc_1 -Komplex) ist ein essentieller Bestandteil der Elektronentransportketten von Mitochondrien und vielen respiratorischen und photosynthetischen Bakterien, über die Elektronen mit hohem Elektronenübertragungspotential auf einen terminalen Elektronenakzeptor übertragen werden (Gennis et al., 1993; Crofts & Berry, 1998). Innerhalb der Elektronentransportketten katalysiert die Cytochrom c Reduktase den Transport von Elektronen vom Ubichinol auf Cytochrom c und ist einer der Komplexe, bei denen der Elektronentransfer mit der Translokation von Protonen über eine biologische Membran gekoppelt ist. Der aus der Translokation von Protonen über biologische Membranen resultierende pH-Gradient und das Membranpotential erzeugen eine protonenmotorische Kraft, die zum Antrieb der ATP-Synthese über F_0F_1 -ATP-Synthasen dient (Mitchell 1961).

Alle Cytochrom c Reduktase-Komplexe verschiedener Organismen enthalten drei respiratorische, das heißt direkt am Elektronentransfer beteiligte Untereinheiten: das Cytochrom b mit den beiden redoxprothetischen Hämgruppen b_{562} und b_{565} , das Cytochrom c_1 mit einer Hämgruppe als Redoxzentrum und das Eisenschwefelprotein mit einem Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppe. Die vier Redoxzentren wirken in der Form zusammen, daß Elek-

tronen von einem Zweielektronencarrier (Ubichinol) auf Einelektronencarrier (Cytochrom c) übertragen werden. Dabei überträgt das Ubichinol-(QH₂)-Molekül eines seiner Elektronen hohen Potentials über das Eisen-Schwefel-Protein auf Cytochrom c₁, welches das Cytochrom c reduziert. Das zweite Elektron des Ubichinol-(QH₂)-Moleküls wird auf Cytochrom b übertragen. Insgesamt werden dabei zwei Protonen des Ubichinols an der positiv geladenen Seite der Membran deponiert. Nachdem der Vorgang ein zweites Mal durchlaufen ist, wird das Ubichinon-(Q)-Molekül unter Aufnahme von zwei Protonen an der negativ geladenen Seite der Membran mit Hilfe der beiden Elektronen am Cytochrom b reduziert (Mitchell, 1975; Crofts & Meinhardt, 1982; Brandt & Trumpower, 1994).

Die bakteriellen bc₁-Komplexe besitzen zusätzlich zu den drei respiratorischen Untereinheiten maximal eine weitere Untereinheit (Trumpower, 1990; Crofts & Berry, 1998; Yu et al., 1999). Im Gegensatz dazu enthalten mitochondriale Cytochrom c Reduktase-Komplexe sechs bis acht Untereinheiten, die nicht direkt am Elektronentransfer beteiligt sind (Schägger et al., 1986; Brandt et al., 1994; Braun & Schmitz, 1995c; Schägger et al., 1995). Die Ursachen für diesen Unterschied sind ebenso wie die Funktionen der zusätzlichen Untereinheiten bisher nur wenig verstanden.

Zwei dieser zusätzlichen Untereinheiten besitzen Molekulargewichte von ca. 50 kDa, vier bis sechs Untereinheiten sind mit Molekulargewichten unter 20 kDa klein. Von den beiden großen Untereinheiten nahm man ursprünglich an, daß sie den Kern des Cytochrom c Reduktase-Komplexes bilden (Silman et al., 1967). Obwohl später bewiesen wurde, daß sie periphere, der Matrix zugewandte Untereinheiten des Cytochrom c Reduktase-Komplexes sind, werden sie traditionell als ‚Core‘-Proteine bezeichnet (Leonard et al., 1981; Karlsson et al., 1983). Über die Komplementation von Hefemutanten konnte gezeigt werden, daß die Core-Proteine eine essentielle Funktion für die Assemblierung des Komplexes besitzen (Oudshoorn et al., 1987; Crivellone et al., 1988; Gatti & Tzagoloff, 1990). Ebenfalls aus Versuchen zur Komplementation von Hefemutanten wurden verschiedenen kleinen Untereinheiten des Hefekomplexes Bedeutungen zugeschrieben. Demnach ist die Untereinheit VI in die Dimerisierung des Cytochrom c Reduktase-Komplexes involviert (Schoppink et al., 1989; Schmitt & Trumpower, 1990). Die Untereinheiten VII und VIII sind essentiell für die Komplexassemblierung und die Untereinheit IX interagiert mit dem Eisen-Schwefel-Protein und den Cytochromen b und c₁ (Maarse et al., 1988; Phillips et al., 1990).

Die Aufklärung von Kristallstrukturen des Cytochrom c Reduktase-Komplexes aus Rind und Huhn in den letzten drei Jahren hat neue detaillierte Einblicke in die Struktur und Funktionsweise dieses Komplexes gewährt (Xia et al., 1997; Iwata et al., 1998; Zhang et al., 1998). Die

Abbildung 1 zeigt ein Modell von Yu et al. (1999) der Kristallstruktur des Cytochrom c Reduktase-Komplexes von Rind.

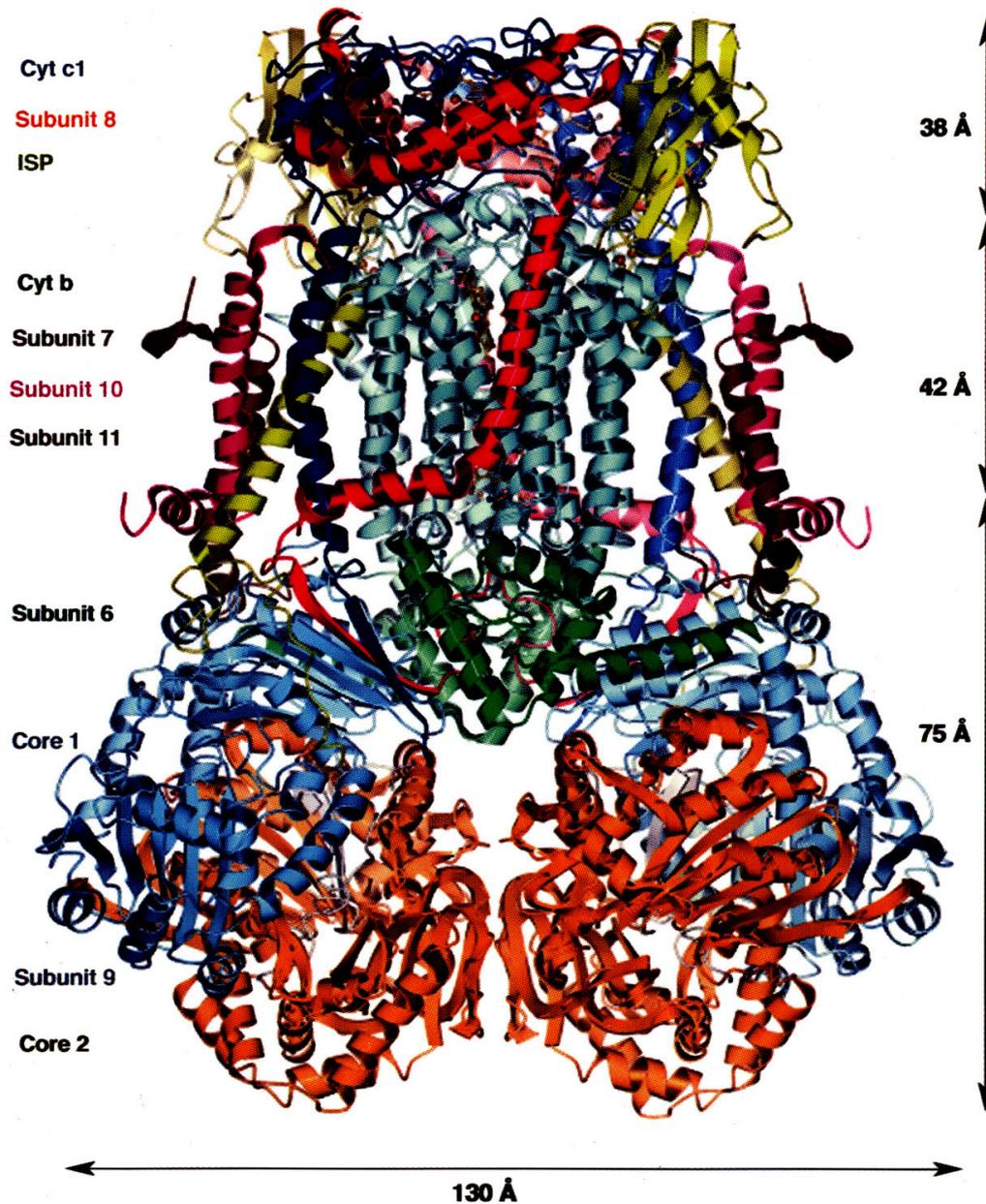


Abbildung 1: Struktur-Modell des dimeren Cytochrom c Reduktase-Komplex (Abbildung aus Yu et al., 1999). Die Polypeptide sind in Form von Bandmodellen dargestellt. Die Ausdehnungen der Regionen des Komplexes, die im Intermembranraum, in der inneren mitochondrialen Membran und in der mitochondrialen Matrix liegen, sind rechts neben dem Modell angegeben, die Untereinheitenbezeichnungen stehen links neben dem Modell.

Der Komplex liegt als strukturelles und funktionelles Dimer vor. Jedes Monomer besteht aus elf unterschiedlichen Untereinheiten. Nach ihrer Lage gegenüber der inneren mitochondrialen

Membran kann der Komplex in drei Regionen unterteilt werden: die Region im Intermembranraum, eine Transmembranregion und die Region in der Matrix. Die Transmembranregion besteht aus 13 die Membran durchspannenden Helices in jedem Monomer. Acht der Helices gehören zum Cytochrom b, die restlichen fünf stammen vom Cytochrom c_1 , dem Eisen-Schwefel-Protein und den Untereinheiten VII, X und XI. Die Region im Intermembranraum wird von den funktionellen Domänen des Cytochrom c_1 und Eisen-Schwefel-Proteins sowie der Untereinheit VIII gebildet. Die das Redoxzentrum tragende Domäne des Eisen-Schwefel-Proteins ist in den untersuchten Kristallen an unterschiedlichen Positionen innerhalb der Region im Intermembranraum lokalisiert. Auf Grund dieser Daten wird vermutet, daß der Transfer des Elektrons vom Ubichinol zum Cytochrom c_1 durch die Bewegung dieser Domäne des Eisen-Schwefel-Proteins realisiert wird (Zhang et al., 1998).

Mehr als die Hälfte der molekularen Masse des Komplexes resultiert aus der Matrixregion. Diese Region enthält die beiden Core-Proteine, einen Teil der Untereinheit VII, den C-terminalen Bereich des Cytochrom c_1 , den N-Terminus des Eisen-Schwefel-Proteins und die Untereinheit IX. Die Untereinheiten I und II (Core-Proteine) sind strukturell nahezu identisch. In Säugetieren wird die Leitsequenz des Eisen-Schwefel-Proteins erst nach der Integration dieser Untereinheit in den Cytochrom c Reduktase-Komplex abgetrennt. Die abgetrennte Leitsequenz ist identisch mit der Untereinheit IX und liegt zwischen den beiden Core-Proteinen.

3. Die mitochondriale Prozessierungsprotease

Kurz nach der Translokation von Vorläuferproteinen in die Mitochondrien werden mitochondriale Leitsequenzen endoproteolytisch durch Enzyme des ‚Import-Apparates‘, die Prozessierungsproteasen, abgespalten, wobei das reife Protein entsteht. Viele Vorläuferproteine werden in einem Schritt durch die mitochondriale Prozessierungsprotease (MPP) in ihre reifen Formen konvertiert. Es konnte aber auch gezeigt werden, daß Vorläuferproteine in zwei aufeinanderfolgenden Schritten durch die mitochondriale Prozessierungsprotease prozessiert werden (Branda et al., 1999). Einige mitochondriale Proteine werden durch zwei weitere Prozessierungsproteasen, die mitochondriale Intermediat-Peptidase (MIP) oder die Innere-Membran-Protease (IMP), prozessiert (Isaya et al., 1991; Schneider et al., 1991; Kalousek et al., 1992; Nunnari et al., 1993). MIP entfernt ein Oktapeptid vom N-Terminus von bereits durch MPP prozessierten Proteinen. Weitgehend unbekannt ist die biologische Bedeutung dieser Aktivität. Die IMP ist für die Entfernung von Extensionspeptiden für die intramito-

chondriale Sortierung verantwortlich, nachdem bereits Matrix-Leitsequenzen in einem initialen Schritt durch MPP abgespalten wurden.

In jedem der genannten Fälle ist die mitochondriale Prozessierungsprotease an der Reifung der mitochondrialer Vorläuferproteine beteiligt. MPP ist damit für die mitochondriale Biogenese und Funktion sowie die Lebensfähigkeit der meisten eukaryotischen Zellen essentiell (Yaffe et al., 1985; Witte et al., 1988).

Die mitochondriale Prozessierungsprotease ist ein Vertreter der Pitrilysinfamilie

Die mitochondriale Prozessierungsprotease ist ein gut untersuchtes Protein, welches aus zwei strukturell nicht identischen, aber ähnlichen Untereinheiten, α -MPP und β -MPP, besteht (Schatz, 1996; Neupert, 1997; Glaser et al., 1998). Die *in vitro* Aktivität des Enzyms ist abhängig von divalenten Kationen wie Co^{2+} , Zn^{2+} oder Mn^{2+} , wobei neuere Daten vermuten lassen, daß MPP *in vivo* eine Zinkprotease ist (Luciano et al., 1998). Mutationsstudien an der mitochondrialen Prozessierungsprotease haben gezeigt, daß die β -MPP-Untereinheit über ein inverses Metallbindemotiv (HXXEH) zum Zinkbindemotiv von Proteasen der Thermolysinfamilie (HEXXH) verfügt, welches essentiell für die Prozessierungsaktivität ist (Becker & Roth, 1992; Perlman et al., 1993; Kitada et al., 1995; Striebel et al., 1996). Zusätzlich befindet sich 76 Aminosäurereste vom inversen Zinkbindemotiv in Richtung C-Terminus entfernt ein weiterer essentieller Glutaminsäurerest (Becker & Roth, 1993). Auf Grund dieser Merkmale wurde MPP als ein Vertreter der von Rawlings und Barrett (1993) definierten Pitrilysinfamilie (M16-Familie, Clan ME) klassifiziert.

Die Pitrilysinfamilie erhielt ihren Namen nach dem ersten charakterisierten Enzym dieser Familie, dem Pitrilysin aus *Escherichia coli* (Cheng & Zipser, 1979). Im Bereich der inversen Zinkbindedomäne ist die Aminosäuresequenz von Vertretern der Pitrilysinfamilie hochkonserviert (Abb. 2).

IDE	Human	98	SDEFPNIAGLSHFCEHMLFLGTK..	(X) ⁶³	..VNAVDS	EHEKVMND	AW	P14735
IDE	Rat	98	SDFPNIPGLSHFCEHMLFLGTK..	(X) ⁶³	..VNAVDS	EHEKVMND	AW	P35559
IDE	Drosophila	71	SDPTNLPGLAHFCEHMLFLGTE..	(X) ⁶³	..INAVNS	EHEKNLPS	DLW	P22817
IDE?	Eimeria	67	YDEQDVPGLAHFLEHMLFLGTS..	(X) ⁶¹	..VNAIDA	EHQKNIPN	DDE	M98842
NRDC	Rat	234	ADFDLPLGLAHFLEHMLVFMGSL..	(X) ⁶³	..VEAVDS	EYQLARPS	DAN	L27124
Pitriylisin	<i>E. coli</i>	78	EDPEAYQGLAHYLEHMSLMGSK..	(X) ⁶³	..RNAVNA	ELTMARTR	DGM	P05458
PgqF	Klebsiella	39	HEESRFPGLAHLLEHLLFYGGE..	(X) ⁶³	..VAVIDA	EYRLIQQHE	PS	P27508
YddC	<i>E. coli</i>	66	QEEEDNELGVAHFVHEHMMFN	(X) ⁶²	..KLEVDA	ERGVITEE	WRA	P31828
PP?	Bacillus	?	HETPEINGISHFLEHMF	(X) ⁶²	..KNVVEE	EIKMYEDA	PDD	Q04805
β-MPP	Rat	89	YENEKNNGTAHFLEHMAFKG	(X) ⁶²	..RGVILRE	MQEVETN	LQE	Q03346
β-MPP	Yeast	61	AENVKNNGTAHFLEHLAFKGT	(X) ⁶²	..RDVIRE	SEEVDKMY	DE	P10507
β-MPP	Neurospora	74	AETDETNGTAHFLEHLAFKGT	(X) ⁶²	..RDVILRE	SEEVKQLEE		P11913
β-MPP1	Potato	133	FETEENNGVAHFLEHMI	(X) ⁶²	..RSVILRE	MEVEVEK	QPEE	X80237
β-MPP2	Potato	130	FEDTETNGTAHFLEHMI	(X) ⁶²	..RDVILRE	MEVEVEG	QTEE	X80235
Core I	<i>Euglena</i>	60	WETEKNNGVAHFLEHMMNF	(X) ⁶²	..RQTI	VQKE	DVEARIDE	D16671
Consensus			XXXXXXXXGXHXHXE	(X) ⁵⁴⁻⁵⁶	XXXXXXXXXXXX			

Abbildung 2: Ausschnitt aus einem multiplen Sequenzvergleich im Bereich der Metallbindedomäne mit Pitriylisin, Insulin-Degrading Enzymes (IDE), N-Arginin-dibasischen Konvertasen (NRDC), einer putativen Protease aus *Bacillus subtilis* (PP), YddC aus *Escherichia coli*, β-MPP-Untereinheiten und dem Core I aus *Euglena gracilis* (Abbildung aus Braun & Schmitz, 1995b). Die Aminosäurereste des inversen Metallbindemotivs und der an der Metallbindung beteiligte Glutaminsäurerest sind schwarz unterlegt. Aminosäurepositionen, die in sieben der fünfzehn Eiweiße konserviert sind, sind grau unterlegt. Accession-Nummern der Proteine sind rechts neben dem Alignment angegeben.

Die zwei Histidinreste des inversen Zinkbindemotivs und der 75-78 Aminosäurereste in Richtung C-Terminus vom inversen Zinkbindemotiv entfernte Glutaminsäurerest sind Liganden, welche ein divalentes Kation im aktiven Zentrum binden (Becker & Roth, 1993). Der Glutaminsäurerest des inversen Zinkbindemotivs ist zwar essentiell, aber nicht an der Bindung des divalenten Kations beteiligt (Becker & Roth, 1992; Perlman et al., 1993; Kitada et al., 1998). Die Mitglieder der Pitriylisinfamilie sind hochspezifische Metalloendoproteasen. Die physiologischen Funktionen dieser Proteasen sind vielfältig. Beispielsweise sind Insulin oder der ‚Transforming grow factor α‘ Substrate für das ‚Insulin-Degrading Enzym‘, ein Somatostatin-Vorläuferprotein ist Substrat für NRD-Konvertasen und Peptidfragmente des Hämoglobins sind Substrat für das Falcilysin, einer Protease des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (Shii et al., 1986; Affholter et al., 1988; Chesneau et al., 1994; Kolakovich Eggleston et al., 1999). Bisher ungeklärt ist, wie die hohe Spezifität dieser Enzyme in Bezug auf die Schnittstellen in den Substraten erreicht wird. Sicher scheint jedoch, daß sekundär- bzw. tertiärstrukturelle Elemente in die Substraterkennung involviert sind.

Die Mitglieder der Pitriylisinfamilie können auf Grund ihrer Größe zwei Unterfamilien zugeordnet werden, einer Unterfamilie von Proteinen mit Molekulargewichten von ca. 100 kDa und einer Unterfamilie von Proteinen mit Molekulargewichten von ca. 50 kDa. In die zweite Unterfamilie werden die Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease eingeordnet (Braun & Schmitz, 1995b).

Charakteristika der MPP-Untereinheiten und ihre Beziehung zu den Core-Proteinen der Cytochrom c Reduktase

Die mitochondriale Prozessierungsprotease wurde zuerst aus *Neurospora crassa* und wenig später aus weiteren Organismen isoliert (Hawlitschek et al., 1988; Yang et al., 1988; Ou et al., 1989; Kleiber et al., 1990; Braun et al., 1992). Alle bisher identifizierten mitochondrialen Prozessierungsproteasen werden von der α - und der β -Untereinheit gebildet, deren molekulare Massen zwischen 50 kDa und 57 kDa liegen. Interessant ist, daß sich die Interaktion der beiden Untereinheiten bei den Prozessierungsproteasen verschiedener Organismen unterscheidet. In Hefe und Ratte bilden α -MPP und β -MPP einen festen Komplex, der aus der mitochondrialen Matrix als Heterodimer isoliert werden kann (Pfanner & Neupert, 1990; Geli et al., 1990; Brunner et al., 1994). In *N. crassa* liegen die beiden Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease zum Teil als individuelle Proteine in der mitochondrialen Matrix vor, können aber auch als Dimere isoliert werden. Alpha-MPP ist in *N. crassa* ein eher seltenes Protein (0,03 % des mitochondrialen Proteins). Beta-MPP kommt ca. 15 mal häufiger vor als α -MPP, wobei 75 % des β -MPPs mit dem Cytochrom c Reduktase-Komplex assoziiert vorliegen. Beta-MPP ist mit dem Core I-Protein des Cytochrom c Reduktase-Komplexes identisch (Schneider et al., 1990; Weiss et al., 1990). Das aufgereinigte Core I-Protein (β -MPP) ist ebenso wie der intakte Cytochrom c Reduktase-Komplex gemeinsam mit der α -MPP-Untereinheit zur Prozessierung mitochondrialer Vorläuferproteine fähig. Bei Kartoffel und weiteren höheren Pflanzen (Weizen und Spinat) ist die Aktivität der mitochondrialen Prozessierungsprotease nicht in der mitochondrialen Matrix lokalisiert, sondern an die innere mitochondriale Membran gebunden. Die Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease sind vollständig mit dem Cytochrom c Reduktase-Komplex assoziiert und identisch mit den Core-Proteinen (Untereinheit I und II) dieses Komplexes (Braun et al., 1992; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995). Damit sind die Cytochrom c Reduktasen höherer Pflanzen bifunktionelle Enzyme, wobei ihre zwei Enzymaktivitäten voneinander unabhängig sind (Emmermann & Schmitz, 1993; Braun & Schmitz, 1995c).

Sequenzvergleiche der Core-Proteine und der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease belegen klar die Zugehörigkeit aller vier Proteine zur Pitrilysinfamilie. Deutlich wird aber auch, daß nur die β -MPPs eine vollständige inverse Zinkbindedomäne besitzen und deshalb den proteolytisch wirkenden Teil der mitochondrialen Prozessierungsproteasen darstellen müssen. Bei den α -MPPs und Core-Proteinen fehlt mindestens eine der

an der Metallbindung beteiligten Aminosäuren. Eine Ausnahme davon stellt das Core I von *Euglena gracilis* dar (Abb. 3a).

β -MPP	Rat	92	E K N N G T A H F L E H M A F K G T K . . (X) ₆₂ . . R G V I L R E M Q E V E T	Q03346
β -MPP	Yeast	64	V K N N G T A H F L E H L A F K G T Q . . (X) ₆₂ . . R D V I I R E S E E V D K	P10507
β -MPP	Neurospora	77	D E T N G T A H F L E H L A F K G T T . . (X) ₆₂ . . R D V I L R E S E E V E K	P11913
β -MPP	potato	136	E E N N G V A H F L E H M I F K G T E . . (X) ₆₂ . . R S V I L R E M E E V E K	X80237
Core I	Euglena	63	E K N N G V A H F L E H M N F K G T G . . (X) ₆₂ . . R Q T I V Q E K E D V E A	D16671
Core I	Beef	84	E K N N G A G Y F V E H L A F K G T K . . (X) ₆₂ . . R D V I L Q E L Q E N D T	P31800
Core I	Human	84	E K N N G A G Y F L E H L A F K G T K . . (X) ₆₂ . . R D V I L R E M Q E N D A	D26485
Core I	Yeast	64	P Y N N G V S N L W K N I F L S K E N . . (X) ₆₁ . . V L K Q V Q D F E E N D H	P07256
α -MPP	Rat	102	K Y L S G I A H F L E H K L A F S S T A . . (X) ₆₃ . . R M A V Q F E L E D L N M	P20069
α -MPP	Yeast	55	R N L K G C T H I L D R L A F K S T E . . (X) ₆₂ . . K L S A E Y E I D E V W M	P11914
α -MPP	Neurospora	88	D Y V R G A S H I M D R L A F K S T S . . (X) ₆₂ . . I M T A Q Y E V N E I W S	P23955
α -MPP	Potato	111	P A S Y G A T H L L E R M A F K S T L . . (X) ₆₂ . . L E K V K A E I S E Y S K	P29677
Core II	Rat	73	Y N Y L G T S H L L R L A S T L T T K . . (X) ₆₂ . . R S Q L K I D K A V A F Q	P32551
Core II	Beef	74	S N N L G T S H L L R L A S S L T T K . . (X) ₆₂ . . Q P Q L R I D K A V A L Q	P23004
Core II	Human	74	F S N L G T T H L L R L T S S L T T K . . (X) ₆₂ . . Q P Q L K I D K A V A F Q	P22695
Core II	Yeast	42	A T K D G V A H L L N R F N F Q N T N . . (X) ₆₃ . . L P A A R Y D Y A V A E Q	P07257
Core II	Euglena	90	I F N A G I S S F M K H A L T K D G L . . (X) ₆₆ . . K R L V E L E S K E T K R	D16672
A				
β -MPP	Rat	309	I C L M V A N T L I G N W D R - S F G G - G M N L S S K L A Q L T C H G N L C H	Q03346
β -MPP	Yeast	284	F V A L A T Q A I V G N W D R - A I G T - G T N S P S P L A A A S Q M G S L A N	P10507
β -MPP	Neurospora	297	F T G L V T Q A I V G N Y D K - A L G N - A P H Q G S K L S G F V H K H D L A T	P11913
β -MPP	Potato	356	I A L M V M Q Q M L G S W N K - S S G G - G K H M G S E L V Q R V A I N E L A E	X80237
Core I	Euglena	278	I K I K V L E Q L L G S Y S R - D K G E - A A Y S C F A R A I V M D F D P K V	D16671
Core I	Beef	302	V A L Q V A N A I I G H Y D C - T Y G G - G A H L S S P L A S I A A T N K L C Q	P31800
Core I	Human	302	V A L Q V A N A I I G H Y D C - T Y G G - G V H L S S P L A S G A V A N K L C Q	D26485
Core I	Yeast	276	F V A K L A A Q I F G S Y N - - A F E P - A S R L Q G I K L L D N I Q E Y Q L C	P07256
α -MPP	Rat	334	I P F A V L N M M M G G G G S F S A G G P G K G M S R L Y L N V L N R H H W M	P20069
α -MPP	Yeast	274	Y A L A T L Q T L L I G G G G S F S A G G P G K G M Y S R L Y T H V L N Q Y Y F V	P11914
α -MPP	Neurospora	374	Y A L A T L Q T L L I G G G G S F S A G G P G K G M Y S R L Y T N V L N Q H G W V	P23955
α -MPP	Potato	324	M T L T V L Q M L M G G G G S F S A G G P G K G M Y S R L Y L R V L N Q Y P Q I	P29677
Core II	Rat	283	N A F S V L Q H L L G A G P H - - - I K R G N N T T S L L S Q A V A K G S Q Q P	P32551
Core II	Beef	284	N A F S V L Q H V L G A G P H - - - V K R G S N A T S S L Y Q A V A K G V H Q P	P23004
Core II	Human	284	N A F S V L Q H V L G A G P H - - - V K R G S N T T S H L H Q A V A K A T Q Q P	P22695
Core II	Yeast	258	N Y L T S A L S E L S G L I S - - - S A K L D K F T D G G L F T L F V R D Q D S	P07257
Core II	Euglena	309	A F K A P G R S N L K E H A A - - - S L V I A Q A L S N A V S P V L N T S F A P	D16672
B				

Abbildung 3: Zwei Ausschnitte aus einem multiplen Sequenzvergleich mit MPP-Untereinheiten und Core-Proteinen aus verschiedenen Organismen (Abbildung aus Brumme et al., 1998). A: Alignment im Bereich der Metallbindedomäne. Aminosäurereste des inversen Zinkbindemotivs und der an der Metallbindung beteiligte Glutaminsäurerest sind schwarz unterlegt, andere Aminosäurereste, die in mindestens sechs der Proteine konserviert sind, sind grau unterlegt. B: Alignment im Bereich der α -MPP-Domäne. Aminosäurepositionen, die in mindestens drei der vier α -MPPs konserviert sind, sind schwarz unterlegt, weitere Aminosäurereste, die in mindestens sechs Proteinen konserviert sind, sind grau unterlegt. Accession-Nummern der Proteine sind rechts neben den Alignments angegeben.

Da sowohl α -MPP als auch β -MPP für die Aktivität der mitochondrialen Prozessierungsprotease in allen Organismen essentiell sind, stellt sich die Frage nach der Funktion von α -MPP (Geli et al., 1990; Saavedra-Alanis et al., 1994; Kojima et al., 1998). Auf Grund verschiedener experimenteller Daten wird vermutet, daß α -MPP in die Substraterkennung und die Substratbindung involviert ist (Yang et al., 1988; Luciano et al., 1997; Shimokata et al., 1998). Jedoch scheint für eine effektive Substratbindung der Komplex aus beiden Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease erforderlich zu sein (Shimokata et al.,

1998; Ito, 1999). Eine nur bei den α -MPP-Untereinheiten konservierte hydrophobe glycinreiche Domäne mit einer Länge von 20 Aminosäureresten in der C-terminalen Hälfte der Proteine hat vermutlich eine entscheidende Bedeutung für die Funktion dieser Untereinheiten (Abb. 3b).

4. Ein Modell zur Evolution von MPP-Untereinheiten und Core-Proteinen

Die strukturelle Ähnlichkeit von Core-Proteinen der Cytochrom c Reduktase und Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsproteasen sowie der Sachverhalt, daß β -MPP und Core I in *N. crassa* und höheren Pflanzen sowie α -MPP und Core II von höheren Pflanzen identische Proteine sind, werfen eine Reihe von Fragen auf. (i) Warum sind Komponenten des Proteinimportapparates strukturell mit Untereinheiten eines Proteinkomplexes der Atmungskette verwandt? (ii) Welche Ursache gibt es für die Bifunktionalität der Cytochrom c Reduktasen von Pflanzen? (iii) Stammen die Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease von den Core-Proteinen der Cytochrom c Reduktase ab, oder verhält es sich umgekehrt? Eine mögliche Antwort auf diese Fragen gibt ein Modell (Abb. 4) zur Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten (Braun & Schmitz, 1995b).

In diesem Modell wird ausgehend von der Endosymbiontenhypothese eine bakterielle pitrilysinartige Protease als Vorfahre der Core/MPP-Proteine postuliert. Diese hat im Zuge der Endosymbiose die Fähigkeit zur Abtrennung der Leitsequenzen von Vorläuferproteinen entwickelt. Die Urprotease war ein hydrophiles Protein im Cytosol des Bakteriums. Das Ur-MPP-Protein heftete sich später an die Cytochrom c Reduktase an. Möglicherweise bedeutete die Anheftung der Protease an die Cytochrom c Reduktase einen Vorteil, weil durch die Lokalisierung an der Membran ein unmittelbarer Zugriff auf die importierten Proteine möglich war. Eine alternative Erklärungsmöglichkeit ist, daß der Cytochrom c Reduktase-Komplex abhängig von neuen zur Matrix orientierten Untereinheiten wurde, um vor den Matrixproteasen besser geschützt zu sein (Boumans et al., 1997). Später in der Evolution hat zunächst ein Genduplikationsereignis zur Evolution zweier verschiedener Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease geführt. Dieser relativ ursprüngliche Zustand ist in den Mitochondrien höherer Pflanzen erhalten. Im weiteren Verlauf der Evolution kam es zu einem schrittweisen Ablösen der beiden Protease-Untereinheiten von der Cytochrom c Reduktase, möglicherweise um das ‚Proteinprozessing‘ und die Atmungskette unabhängig voneinander regulieren zu können. Da die Untereinheiten der Prozessierungsprotease durch die Co-Evolution der Protease und Cytochrom c Reduktase inzwischen unentbehrlich für die

Assemblierung des Komplexes waren, konnte diese Entwicklung nur von weiteren Genduplikationsereignissen ausgehen. Die Core-Proteine von Säugetieren und Hefe sind aus dieser Perspektive evolutionäre Relikte der mitochondrialen Prozessierungsprotease.

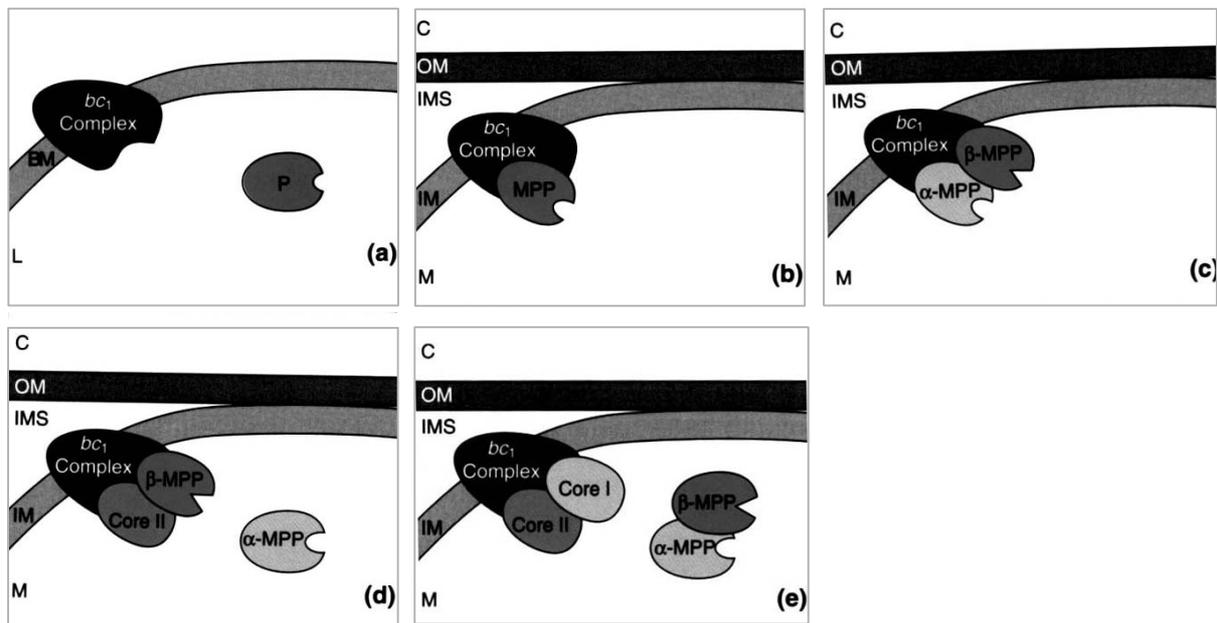


Abbildung 4: Hypothetisches Modell zur Co-Evolution der Cytochrom c Reduktase (bc_1 Komplex) und der mitochondrialen Prozessierungsprotease (MPP) (Abbildung aus Braun & Schmitz, 1995b). a: unabhängiges Vorliegen des Cytochrom c Reduktase-Komplexes und einer löslichen Protease (P) im Cytoplasma des Vorläufers der Mitochondrien. b: Umwandlung der Protease zu einer Prozessierungsprotease und Assoziation dieser an die Cytochrom c Reduktase während der frühen Endosymbiose. c: Entwicklung einer dimeren im Cytochrom c Reduktase-Komplex integrierten Prozessierungsprotease, bestehend aus einer α - und einer β -Untereinheit (α -MPP und β -MPP) nach einer Genduplikation. Die Situation entspricht derjenigen in höheren Pflanzen. d: Das Ablösen der α -MPP-Untereinheit aus dem Cytochrom c Reduktase-Komplex, welche inzwischen essentiell für die Assemblierung des Komplexes geworden war, nach einem Genduplikationsereignis führt zur Entwicklung des Core II-Proteins. Die Situation liegt in *Neurospora crassa* vor. e: Das Ablösen der β -MPP-Untereinheit vom Cytochrom c Reduktase-Komplex, welche inzwischen ebenfalls essentiell für die Assemblierung des Komplexes geworden war, führt zur Entstehung des Core I-Proteins nach einem weiteren Genduplikationsereignis. Dieses Stadium reflektiert den Zustand in Säugetieren und in Hefe. C, Cytoplasma; BM, bakterielle Membran; M, Matrix; IM, innere mitochondriale Membran; IMP, Intermembranraum; L, Lumen; OM, äußere mitochondriale Membran.

5. Zielsetzung der Arbeit

Das von Braun und Schmitz (1995b) aufgestellte Modell zur Evolution der MPP-Untereinheiten und Core-Proteine ist die Arbeitshypothese der vorliegenden Dissertation. Es postuliert

einen Ausgangspunkt für die Entwicklung der MPP- und Core-Proteine und eine zeitliche Reihenfolge von noch heute in rezenten Organismen vorkommenden Stadien in der Co-Evolution von MPP und dem Cytochrom c Reduktase-Komplex. Durch gezielte Untersuchungen sollen bestätigende oder widerlegende Indizien für diesen vorgeschlagenen Ausgangspunkt und die postulierte Richtung der Evolution erarbeitet werden. So soll gezeigt werden, daß zu den Vorfahren der Mitochondrien nahe verwandte, rezente Bakterien Proteasen besitzen, die mit der mitochondrialen Prozessierungsprotease möglicherweise von einer gemeinsamen Ur-Protease abstammen. Außerdem sollen die Cytochrom c Reduktase-Komplexe verschiedener Organismen, darunter niedere Pflanzen, isoliert und charakterisiert werden, um Indizien für den ursprünglichen Zustand in der Co-Evolution von MPP und dem Cytochrom c Reduktase-Komplex zu finden. Durch eine gezielte Veränderung der Core II-Untereinheit der Cytochrom c Reduktase von *N. crassa* soll die Prozessierungsaktivität des Komplexes rekonstituiert werden. Damit soll der Beweis dafür erbracht werden, daß das Core II-Protein ein Relikt der α -MPP-Untereinheit der Prozessierungsprotease ist. Ferner werden umfangreiche phylogenetische Untersuchungen anhand von Stammbäumen durchgeführt, die Auskunft über die Abstammungsverhältnisse der Mitglieder der Pitrilysinfamilie, insbesondere die verwandtschaftlichen Beziehungen zur mitochondrialen Prozessierungsprotease, geben sollen.

III. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien, Lösungsmittel und sonstige Verbrauchsmittel

Die Lösungsmittel und verwendeten Chemikalien zur Herstellung von Medien, Puffern, Lösungen etc. wurden von den Firmen Serva, Heidelberg (research grade); Biorad, USA (Elektrophoresis purity grade); Merk, Darmstadt und Fluka, Darmstadt bezogen. Restriktionsendonukleasen, Polymerasen und DNA-modifizierende Enzyme der Firmen Boehringer Mannheim, Mannheim; Eurogentec, Belgien und New England Biolabs, USA wurden verwendet. Auf die Hersteller von Säulenmaterialien, Filtern, Apparaturen und verwendeten Kits wird im Methodenteil verwiesen.

1.2 Versuchsorganismen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen mit folgenden Organismen durchgeführt:

<i>Versuchsorganismus</i>	<i>Bezugsquelle/Anbieter</i>
<i>Erwinia Chrysanthemi</i> (ATCC 8484)	Professor G. Auling, Hannover
<i>Escherichia coli</i> -Stämme: XL1-Blue	Stratagene, Heidelberg
BB4	Stratagene, Heidelberg
SOLR	Stratagene, Heidelberg
XL1-Blue MRF ⁺	Stratagene, Heidelberg
XLORL	Stratagene, Heidelberg
BL21 (DE3)	Novagen, USA
<i>Equisetum arvense</i> (Ackerschachtelhalm)	natürliche Vorkommen
<i>Neurospora crassa</i> : Wildtyp K93-5a	Dr. H. Prokisch, Hannover
<i>Platycerium bifurcatum</i> (Geweihfarn)	Berggarten, Hannover
<i>Polytomella</i> spp.(198.80, E. G. Pringsheim)	SAG-Sammlung von Algenkulturen, Göttingen
<i>Reclinomonas americana</i> Stamm NZ (ATCC 50394)	American Type Culture Collection, USA
<i>Rhodobacter sphaeroides</i> (ATCC 17023)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig
<i>Solanum tuberosum</i> (Kartoffel)	Einzelhandel

Tabelle 1: verwendete Organismen

1.3 Antikörper

Die aufgeführten Antikörper wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet:

<i>Antigen</i>	<i>Organismus</i>
Core I	<i>Neurospora crassa</i>
Core II	<i>Neurospora crassa</i>
FeS-Protein	<i>Neurospora crassa</i>
β -MPP	<i>Neurospora crassa</i>
Prozessierungsprotease homologes Protein (RSP)	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>

Tabelle 2: Antikörper, die für die Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung standen.

1.4 Plasmide und Expressionsvektoren

Die aufgeführten Plasmide und Expressionsvektoren dienen entweder zur Vermehrung und Identifizierung von speziellen DNA-Fragmenten oder zu ihrer Expression in *E. coli* bzw. *Neurospora crassa*. Der genaue Verwendungszweck ist in Tabelle 3 angegeben.

<i>Vektor</i>	<i>einklonierte Sequenz</i>	<i>Selektionsmarke</i>	<i>Verwendung</i>
pBluescript SK- (Stratagene, Heidelberg)	<i>core II</i> , verändertes <i>core II</i> aus <i>N. crassa</i>	Ampicillin	Identifizierung der cDNA, Vermehrung in SOLR, XL1-Blue
pBARMTE1 (Fungal Genetics Stock Center, USA)	<i>core II</i> , verändertes <i>core II</i> aus <i>N. crassa</i>	Basta	Expression der Gene in <i>N. crassa</i>
PET-11d (Novagen, USA)	β - <i>mpp</i> , α - <i>mpp</i> , <i>core II</i> , verändertes <i>core II</i> aus <i>N. crassa</i>	Ampicillin	Expression in BL21(DE3), Coexpression von β - <i>mpp</i> mit <i>core II</i> und verändertem <i>core II</i> in BL21(DE3)
pET-28a (Novagen, USA)	<i>core II</i> , verändertes <i>core II</i> aus <i>N. crassa</i>	Kanamycin	Coexpression der Gene mit β - <i>mpp</i> in BL21(DE3)
pBK-CMV-Phagemid (Stratagene, Heidelberg)	<i>rsp</i> aus <i>Rhodobacter</i> <i>sphaeroides</i>	Kanamycin	Identifizierung der DNA, Vermehrung in XLORL, XL1-Blue
pET-21b (Novagen, USA)	<i>rsp</i> aus <i>Rhodobacter</i> <i>sphaeroides</i>	Ampicillin	Expression des Gens in BL21(DE3)

Tabelle 3: Auflistung verwendeter Vektoren

1.5 Oligonukleotide

Spezielle Oligonukleotide dienen entweder zum Screening von DNA-Banken oder als Primer zur Amplifikation von DNA-Fragmenten durch PCR mit dem Ziel, diese in verschiedene Vektoren einzuklonieren oder als Sonden einzusetzen. Die zur Anwendung gekommenen Primer und ihre Funktionen sind im folgenden erklärt.

Primerpaare (Name des Primers, zur Klonierung in einen Vektor eingeführte Restriktionsschnittstelle, Sequenz)	Erklärung
PB1: <u>PshAI</u> 5' TATATAgACTTCCgTCCTTCAgATgCTTATggg 3' PB2: <u>NarI</u> 5' TATATAggCgCCCTgTgggTACTgATTTAAgAC 3'	Amplifikation einer 130 bp Sequenz aus dem α - mpp von <i>Solanum tuberosum</i> zur Einklonierung in das <i>core II</i> von <i>N. Crassa</i>
PB3: 5' CTTCAgATgCTTATggg 3' PB4: 5' CTgTgggTACTgATTTA 3'	Amplifikation einer 102 bp Sequenz aus dem α - mpp von <i>Solanum tuberosum</i> , Herstellung der α [³² P] markierten Sonde MCTR
FCHIM: <u>NcoI</u> 5' ATATACCATggCTgCTgCTgCTTCTCCC 3' RCHIM: <u>BamHI</u> 5' TATggATCCTATACCTTgAgACCGAg 3'	Amplifikation von <i>core II</i> und verändertem <i>core II</i> von <i>N. crassa</i> zur Einklonierung in pET-11d
HC1: <u>NdeI</u> 5' ATATACATATggCTgCTgCTgCTTCTCCC 3' RCHIM: <u>BamHI</u> 5' TATggATCCTATACCTTgAgACCGAg 3'	Amplifikation von <i>core II</i> und verändertem <i>core II</i> von <i>N. crassa</i> zur Einklonierung in pET-28a
RHH: <u>NdeI</u> 5' ATATACATATgACCgTTCTCCTCgACA 3' RHR2: <u>NotI</u> 5' ATATAgCggCCgCgCggATCTGTgCgAgggC 3'	Amplifikation von <i>rsp</i> von <i>Rhodobacter sphaeroides</i> zur Einklonierung in pET-21b
Oligonukleotide zum Screening von Banken (Name, Sequenz)	Erklärung
INZG: 5' DIG-TTRAANgCCATRTgYTCNARRAARTg 3' INZK: 5' DIG-CATRTgYTCNARRAARTg 3'	abgeleitet aus einer innerhalb bakterieller Vertreter der Pitrilysinfamilie konservierten Sequenz H F L E H M A F K bzw. H F L E H M; zum Screening einer genomischen DNA-Bank von <i>R. sphaeroides</i>
COREIIN: 5' DIG- TTRAARAANggYTCNACCCAYTT 3'	abgeleitet aus einer bekannten Peptidsequenz von Core II aus <i>N. crassa</i> K W V E P F F K; zum Screening einer cDNA-Bank von <i>N. crassa</i>

Tabelle 4: Auflistung verwendeter Oligonukleotide

2. Präparation von Mitochondrien

Die Präparation physiologisch intakter Mitochondrien erfolgte bei 4 °C.

2.1 Aufreinigung aus *Solanum tuberosum*

(nach Douce, 1985 und Braun & Schmitz, 1995a)

Handelsübliche Kartoffelknollen wurden für die Isolation von Mitochondrien verwendet. Diese wurden geschält, zerkleinert, zum Zellaufschluß in einem Verhältnis von 1 : 1 mit Aufschlußpuffer (0,4 M Mannitol, 1 mM EGTA, 25 mM MOPS, 0,1 % BSA, 15 mM β -Mercaptoethanol, 0,05 mM PMSF, pH 7,8) versetzt und mittels Küchenmixer homogenisiert. Das Lysat wurde durch zwei Lagen Nylonmembran (100 μ m Porengröße) filtriert und anschließend 5 Minuten bei 3500 x g zur Abtrennung von Zellbruchstücken, Zellkernen und Amyloplasten zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde die Mitochondrienfraktion durch Zentrifugation bei 18000 x g für 30 Minuten pelletiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde diese in Resuspensionspuffer (0,4 M Mannitol, 10 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 0,1 % BSA, 0,1 mM PMSF, pH 7,2) aufgenommen, mit einem ‚Dounce-Homogenisator‘ homogenisiert und durch Zentrifugation bei 70000 x g für 45 Minuten in einem dreiphasigen Percoll-(Pharmacia, Schweden) Gradienten (14 %, 26 %, 45 % Percoll in 0,4 M Mannitol, 10 mM KH_2PO_4 , 1 mM EGTA, 0,1 % BSA, 0,1 mM PMSF, pH 7,2) fraktioniert. Die reinen Mitochondrien wurden an der Phasengrenze von 26 % zu 45 % Percoll entnommen, zweimal gewaschen und danach in Resuspensionspuffer so aufgenommen, daß die Proteinkonzentration ca. 10 mg/ml betrug.

2.2 Isolation aus *Platyserium bifurcatum*

(nach Brumme et al., 1998)

Das Pflanzenmaterial wurde in Gewächshäusern kultiviert. Auf Grund ihres geringen Gehaltes an Chloroplasten sind die sterilen Wedel der Farne gut für die Isolation von Mitochondrien geeignet. Die Wedel wurden frisch geerntet, sofort zerkleinert und mit dem ca. doppelten Volumen Aufschlußpuffer im Küchenmixer homogenisiert. Bei den weiteren Arbeitsschritten wurde analog zum Protokoll für die Aufreinigung von Mitochondrien aus *Solanum tuberosum* verfahren. Bei der Percoll-Gradientenzentrifugation reicherten sich die Mitochondrien in zwei Banden in der 45 %-26 % Interphase und der 26 % Phase an. Die mitochondriale Fraktion

wurde so in Resuspensionspuffer aufgenommen, daß eine Konzentration von 1 mg mitochondriales Protein/ml eingestellt wurde.

2.3 Isolation aus *Equisetum arvense*

(nach Brumme et al., 1998)

Etiolierte unter der Erde liegende Teile der Sprosse aus natürlichen Pflanzenbeständen wurden verwendet. Die Epidermis dieser wurde abgeschält und die Sproßabschnitte wurden zu ca. 5 cm großen Stücken zerkleinert. Der Aufschluß des Pflanzenmaterials erfolgte mit dem ca. zehnfachen Volumen Aufschlußpuffer durch Mörsern. Die Aufreinigung der mitochondrialen Fraktion wurde analog zum Protokoll für die Isolation von Mitochondrien aus *Solanum tuberosum* durchgeführt. Im Percoll-Gradienten bildete die mitochondriale Fraktion eine helle, rotbraune Bande in der 26 % Phase. Die Mitochondrien wurden vom Percoll-Gradienten abgenommen, mit Resuspensionspuffer gewaschen und darin aufgenommen. Die Konzentration des mitochondrialen Proteins betrug ca. 1,5 mg/ml Probe.

2.4 Aufreinigung aus *Polytomella* spp.

(nach Gutiérrez-Cirlos et al., 1994, modifiziert)

Polytomella spp. (198.80, E. G. Pringsheim) wurde in 2,5 l Kolben in *Polytomella* Medium nach Schlösser (1994) bei 25 °C kultiviert. Nach ca. 4 bis 5 Tagen Wachstum wurden die Zellen durch Zentrifugation bei 2000 x g für 10 Minuten pelletiert. Das Zellpellet wurde zweimal in 20 mM Na-Phosphatpuffer, pH 7,0, gewaschen und danach in 4 Volumen 0,32 M Saccharose, 4 mM EDTA, 20 mM Tris-HCl, pH 7,4, resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte mittels ‚Dounce-Homogenisator‘. Das resultierende Homogenisat wurde zweimal für 8 Minuten bei 1000 x g zentrifugiert. Die mitochondriale Fraktion wurde durch Zentrifugation des Überstandes für 15 Minuten bei 10000 x g erhalten und danach in Resuspensionspuffer aufgenommen. Zur weiteren Aufreinigung der mitochondrialen Fraktion erfolgte eine Percoll-Stufengradientenzentrifugation mit 14 %, 22 % und 45 % Phasen für 45 Minuten bei 70000 x g. Die mitochondrialen Banden wurden aus der 45 %-22 % Interphase und der 22 %-14 % Interphase abgenommen. Nach zwei Waschschritten wurden die Mitochondrien in Resuspensionspuffer aufgenommen, so daß die Konzentration an mitochondrialem Protein 2 mg/ml betrug.

2.5 Isolation aus *Reclinomonas americana*

(nach Lang et al., 1977, modifiziert)

Reclinomonas americana Stamm NZ (ATCC 50394) wurde bei 24 bis 26 °C unter Schütteln bei 100 rpm in mit *Erwinia Chrysanthemi* (ATCC 8484) bakterisiertem ATCC-Medium 802 kultiviert. Zu Beginn der stationären Wachstumsphase wurden die Kulturen durch Zentrifugation bei 5000 x g für 5 Minuten geerntet. Die Zellpellets wurden einmal mit 0,6 M Sorbitol, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, gewaschen und danach im Verhältnis 1 : 2,5 im gleichen Puffer resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels Glaskugeln (0,25–0,56 mm Durchmesser). Dazu wurde die Zellsuspension mit den Glaskugeln (3 g/ml Zellsuspension) bei einer Frequenz von 2 Hz kräftig auf- und abgeschüttelt. Die Anreicherung einer Mitochondrien enthaltenden Fraktion aus dem Lysat erfolgte durch zwei differentielle Zentrifugationschritte und anschließende Percoll-Gradientenzentrifugation analog zum Protokoll zur Isolation von Mitochondrien aus *Solanum tuberosum*. Mitochondrien enthaltende Banden konnten aus der 26 % Phase des Percoll-Gradienten entnommen werden. Diese wurden nach zweimaligem Waschen zu einer Konzentration von 1 mg/ml mitochondriales Protein in Resuspensionspuffer aufgenommen.

2.6 Aufreinigung aus *Neurospora crassa*

(nach Schleyer et al., 1982)

Zur Aufreinigung von *Neurospora crassa* Mitochondrien wurde in Flüssigkulturen eine sich in der exponentiellen Wachstumsphase befindliche Myzelmasse herangezogen. Dazu wurden die Flüssigkulturen mit Konidien angeimpft und über Nacht in Schikanen-Erlenmeyerkolben bei 29 °C und 170 rpm geschüttelt. Als Medium wurde Minimalmedium nach Vogels (1964) verwendet. Die Hyphen der Übernachtskultur wurden mittels Glasfilternutsche auf Filterpapier abgesaugt und dreimal mit eiskaltem Wasser gewaschen. Der Zellaufschluß erfolgte durch Mörsern unter Zugabe der gleichen Menge Seesand und Hyphen und dem ca. doppelten Volumen an 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, 0,1 % BSA, 0,1 mM PMSF, pH 7,2. Über zwei differentielle Zentrifugationsschritte, wie im Protokoll zur Isolation von Mitochondrien aus *Solanum tuberosum* beschrieben, erfolgte die Aufreinigung der Mitochondrien. Die mitochondriale Fraktion wurde so in Resuspensionspuffer aufgenommen, daß die Konzentration an mitochondrialem Protein 10 mg/ml betrug.

3. Proteinbiochemische Methoden

3.1 Grundmethoden der Proteinanalyse

Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Laemmli, 1970)

Dieses diskontinuierliche Gelsystem wurde zur Auftrennung von radioaktiv markierten mitochondrialen Vorläuferproteinen von ihren reifen Formen genutzt sowie zur schnellen Analyse von Zelllysaten aus Überexpressionsversuchen. Die Acrylamidkonzentrationen betragen je nach Anwendung im Sammelgel 4,5 % und im Trenngel 8 %-12 %. Zur Auftrennung von maximal 150 µg Gesamtprotein je Spur wurden Protean II Gelapparaturen (Biorad, USA) mit den Dimensionen 20 x 16 x 0,15 cm verwendet. Die Herstellung der Gellösungen für die diskontinuierliche Gelelektrophorese erfolgte nach Laemmli (1970). Als Proteinstandard diente der „Rainbow-Marker“ RPN 756 (Amersham, England).

Tricin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (nach Schägger & von Jagow, 1987)

Das Gelsystem besitzt vergleichsweise zur Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese bessere Trenneigenschaften für kleine Proteine mit Größen unter 20 kDa. Es eignet sich auf Grund des Fehlens von Glycin im Laufpuffer als präparatives Gel mit anschließendem Blot und darauffolgender Proteinsequenzierung besser als das Glycin-Gelsystem. Unter anderem kam es als 2. Geldimension nach Blau-Nativer-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE) von Proteinkomplexen zur Anwendung. Die Acrylamidkonzentrationen betragen im Proben- gel 4 %, im Spacergel 10 % und im Trenngel je nach Anwendung 12 % bzw. 16,5 %. Die Herstellung des Gels sowie der Gellauf erfolgten wie in Schägger und von Jagow (1987) beschrieben. Die Gelapparatur, der eingesetzte Proteinstandard und die maximal auftrennbare Gesamtproteinmenge pro Spur waren identisch zur Glycin-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.

Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese

(nach Schägger & von Jagow, 1991 und Schägger et al., 1994)

Die Blau-Native-Polyacrylamidgelelektrophorese ist ein diskontinuierliches elektro-phoretisches System zur nativen Auftrennung von Proteinkomplexen aus Membranen. BN-PAGE wird in Gegenwart von Coomassie durchgeführt. Dieses bindet an die Proteinkomplexe und verleiht ihnen eine negative Nettoladung, ohne die native Struktur zu beeinflussen. Damit wird es möglich, die Proteinkomplexe entsprechend ihres Molekulargewichtes aufzutrennen. Zur Charakterisierung der Untereinheitenkomposition der Komplexe können denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophoresen als zweite Geldimensionen durchgeführt werden.

BN-PAGE wurde hier zur Auftrennung von mitochondrialen und bakteriellen Proteinkomplexen genutzt. Dabei wurden als Trenngele Acrylamid-Gradientengele zwischen 4,5 % (Polyacrylamid, T = 4,5 % / C = 3 %, 250 mM ACA, 25 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4 °C) und 12,6 % (Polyacrylamid, T = 12,6 % / C = 3 %, 250 mM ACA, 20 % Glycerin, 25 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4 °C) bzw. 16 % (Polyacrylamid, T = 16 % / C = 3 %, 250 mM ACA, 20 % Glycerin, 25 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4 °C) und 4 %ige Sammelgele (Polyacrylamid, T = 4 % / C 3 %, 250 mM ACA, 25 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4 °C) verwendet. Aufgetrennt wurde maximal 1 mg mitochondriales bzw. bakterielles Protein.

Die Mitochondrien, welche wie unter 2.2 beschrieben hergestellt wurden, wurden durch Zentrifugation bei 15000 x g sedimentiert, anschließend in 75 µl 750 mM ACA, 50 mM Bis-Tris, 0,5 mM EDTA, pH 7,0, aufgenommen und durch Zugabe von 15 µl 10 % n-Dodecylmaltosid solubelisiert. Unlösliche Probenbestandteile wurden durch Zentrifugation bei 15000 x g abgetrennt. Die Zugabe von 15 µl einer 5 % igen Coomassie-Stammlösung in 750 mM ACA erfolgte unmittelbar vor dem Auftragen der Proben.

Bakterielles Zelllysate mit einer Proteinkonzentration von 10 µg/µl wurde nach Farchaus und Wachtveitl (1993) hergestellt, im Verhältnis 1 : 1 mit 1,5 M ACA, 100 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA, pH 7,0, gemischt und durch Zugabe von 15 µl 10 % n-Dodecylmaltosid solubelisiert. Die weitere Probenvorbereitung erfolgte analog zur Probenvorbereitung für die Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen.

Der Probenlauf erfolgte bei 4 °C mit einer Einlaufphase von 45 Minuten bei 100 V und einer Auftrennphase von ca. 6 Stunden bei einer bis zu 500 V ansteigenden Spannung. 50 mM Tricin, 0,1 % Serva Blue G, 0,03 % n-Dodecylmaltosid, 15 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4 °C diente als Kathodenpuffer, 50 mM Bis-Tris, pH 7,0 bei 4 °C als Anodenpuffer.

Färbung von Proteingelen

Die Proteingele wurden je nach Anforderungen an die Färbung mit 0,25 % Coomassie in 45 % Methanol, 10 % Essigsäure gefärbt und mit 35 % Methanol, 7,5 % Essigsäure entfärbt oder nach Heukeshoven & Dernick (1988) Silber-gefärbt.

Western Blotting

(nach Towbin et al., 1979)

Der Transfer von Proteinen aus Gelen auf geeignete Filterträger erfolgte in einer Naßblot-Apparatur (Trans Blot Cell, 18 x 24 x 9,5 cm, Elektrodenabstand 8 cm, Biorad, USA). Abhängig vom geplanten Nachfolgeexperiment wurden Puffer, Filterträger und Blotbedingungen gewählt.

Für das Blotten von Proteinen aus präparativen Gelen zur anschließenden Proteinsequenzierung wurden Polyvinylidendifluorid- (PVDF) Membranfilter (Millipore, USA) verwendet, die nach Herstellerangaben vorbehandelt wurden. Das Blotten erfolgte bei 500 mA für ca. 15 Stunden in 20 mM Tris-HCl, 0,05 % SDS, 1mM DTT, 20 % Methanol, pH 8,8 bei 4 °C. Anschließend wurden die Membranfilter in destilliertem Wasser gewaschen, mit 0,5 % Ponceau-S (Sigma, USA) in 1 % Essigsäure gefärbt und mit destilliertem Wasser entfärbt. Die auf diese Weise visualisierten Proteinbanden wurden ausgeschnitten und zur Proteinsequenzierung verwendet.

Erfolgte nach dem Blotten die Identifizierung einzelner Proteinbanden mittels Immunfärbung wurden Nitrozellulosefilter BA 83 (Schleicher und Schuell, Dassel) verwendet. Als Blotpuffer kam 20 mM Tris-HCl, 150 mM Glycin, 20 % Methanol zum Einsatz. Das Blotten bei 200 mA für 6 Stunden war ausreichend für einen nahezu vollständigen Transfer der Proteine.

Immunfärbung

(nach Hsu et al., 1981)

Das zur Anwendung gekommene Verfahren zur Immunodetektion von Proteinen basiert auf einer über das Biotin-Avidin-System verstärkten Farbreaktion. Unter Nutzung des Vecastain-ABC-Kit (Vector Inc.,USA) und 0,1 M Tris-HCl, 0,1 % Tween 20, 0,15 M NaCl, pH 7,4 als Inkubationspuffer wurde wie folgt verfahren: Die Western Blots wurden nacheinander für jeweils mindestens 2 Stunden mit primärem Antikörper (1:1000 in Inkubationspuffer

verdünnt) und mit biotinyliertem sekundären Antikörper (1 Tropfen auf 15 ml Inkubationspuffer) inkubiert. Der darauffolgende Inkubationsschritt mit dem Avidin-Peroxidase-Komplex (je 1 Tropfen auf 15 ml Inkubationspuffer), dessen Bindung über das Biotin an den sekundären Antikörper stattfindet, erfolgte für zwei Stunden. Die Entwicklung erfolgte mit 0,1 M Tris-HCl, 0,3 mM NiCl₂, 0,03 % H₂O₂, 1,5 mM DAB (Sigma, USA), pH 7,4, wobei die Peroxidase eine Reaktion mit H₂O₂ als Oxidationsmittel katalysiert, in deren Folge DAB zu einem dunklen Niederschlag oxidiert wird. Nach jedem Inkubationsschritt wurde dreimal 10 Minuten mit Inkubationslösung gewaschen.

Elektroelution von Proteinkomplexen

(nach Schägger, 1995)

In BN-Gelen aufgetrennte Proteinkomplexe können unter bestimmten Voraussetzungen mittels Elektroelution aus Gelstreifen nativ isoliert werden. Die Elektroelution mitochondrialer Proteinkomplexe wurde in einer Elektroelutionskammer (Electroeluter Concentrator ECU-040, CBS Scientific Co., Del Mar, CA) über Nacht, bei 150 V und 4 °C in Elektrodenpuffer (25 mM Tricin, 0,1 mM PMSF, 7,5 mM Bis-Tris, pH 7,0) durchgeführt. Die so aufgereinigten Cytochrom c Reduktasen konnten in Prozessierungs-Enzymtests eingesetzt werden.

Sequenzierung von Proteinen

(nach Lottspeich, 1985)

Die Aminosäuresequenzierung unter Anwendung der Phenylthiohydantoin-Methode (Edman, 1950) wurden von Dr. V. Kruft, Applied Biosystems GmbH, mittels automatischen Procise-HT Proteinsequenzierer (Modell ABI 494A, Applied Biosystems, USA) durchgeführt.

3.2 Reinigung der Cytochrom c Reduktase aus *Neurospora crassa*

(nach Weiss & Juchs, 1978, Weiss & Kolb, 1979 und Linke & Weiss, 1986)

Das hier angewandte Verfahren nutzt die hohe Bindungsspezifität der Cytochrom c Reduktase zu ihrem natürlichen Elektronenakzeptor, Cytochrom c, zur Aufreinigung der Cytochrom c Reduktase mittels Affinitätschromatographie. Diesem ersten Reinigungsschritt wurde eine Druckfiltration und Gelfiltrationschromatographie nachgeschaltet.

Affinitätschromatographie

Kovalente Kopplung von Cytochrom c an CNBr-aktivierte Sepharose

5 g CNBr-aktivierte Sepharose (Pharmacia, Schweden) wurden in 50 ml 1 mM HCl vorgequollen und durch Waschen mit 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3) von Additiven befreit. Anschließende Inkubation für 3 Stunden im gleichen Puffer diente der Inaktivierung eines Teils der Kopplungsgruppen. Nach dem Waschen der CNBr-aktivierten Sepharose mit Kopplungspuffer (0,5 M NaCl, 0,1 M NaHCO₃, pH 8,3) erfolgte die Kopplungsreaktion dieser mit 27 mg Cytochrom c für 3 Stunden in Kopplungspuffer. Anschließend wurde nacheinander mit Kopplungspuffer, 1 M Ethanolamin (pH 8,0) und alternierend mit Kopplungspuffer und 0,1 M Na-Acetat, 0,5 M NaCl (pH 4,5) gewaschen. Das Säulenmaterial wurde mit Waschpuffer (20 mM Tris-Acetat, 0,04 % Triton X100, 0,2 mM PMSF, 5 % Saccharose, pH 7,0) in eine Säule (1 cm x 10 cm) gepackt und äquilibriert.

Chromatographische Auftrennung

Ca. 3 g Mitochondrien wurden abzentrifugiert, in hypotonischem Puffer (0,2 M Na-Phosphat, pH 7,3) aufgenommen und durch Ultraschall aufgebrochen. Um Verunreinigung durch Cytochrom c zu vermeiden, sind zunächst unzerstörte Mitochondrien bei 5000 x g abzentrifugiert worden. Die Cytochrom c Reduktase enthaltenden Membranfragmente wurden durch Ultrazentrifugation bei 150000 x g für 90 Minuten pelletiert, danach in Wasser zu einer Proteinkonzentration von 40 mg/ml aufgenommen und durch 2 kurze Ultraschall-Impulse wieder in Suspension gebracht. Durch Zusatz von Triton X-100 (Sigma, USA) zu einer Endkonzentration von 3,3 % erfolgte die Solubelisierung der Membranproteine. Membranlipide und mit ihnen in Assoziation verbliebene Proteine wurden durch Zentrifugation bei 60000 x g von der Probe abgetrennt. Der rotbraune Überstand ist direkt auf die Cytochrom c Sepharose-Säule gegeben worden. Diese wurde mit ca. 3 Säulenvolumen Waschpuffer gewaschen. Die Elution von gebundenem Protein erfolgte über einen linearen Salzgradienten mit 50 ml 20–200 mM Tris-Acetat unter Zusatz von 2 mM Na-Ascorbat. Eluierte Fraktionen, welche Cytochrom c Reduktase enthielten, konnten an Hand ihrer rötlichen Farbe identifiziert werden.

Druckfiltration und Gelfiltrationschromatographie

Ca. 10 ml Eluat von der Affinitätssäule wurden unter Verwendung eines Diaflo XM 300 Filters (Amicon, USA) in einer 10 ml Druckfiltrationskammer (Amicon, USA) zu einem Volumen von ca. 0,5 ml eingengt, wobei es zu einer selektiven Aufkonzentrierung von Proteinen mit Größen über 300 kDa bei etwa gleichbleibender Konzentration von verunreinigenden kleineren Proteinen kam.

Das Konzentrat wurde über eine AcA 34 (Serva, Heidelberg) Gelfiltrationssäule (1 cm x 50 cm) weiter aufgereinigt.

3.3 Reinigung überexprimierter ‚His-Tag‘-Proteine

Einige Überexpressionsvektoren enthalten für 6, 8 oder 10 Histidinreste kodierende Sequenzen (‚His-Tag‘ Sequenzen), welche N-terminal oder C-terminal mit dem Zielprotein exprimiert werden können. Für die Aufreinigung der Zielproteine wird die Affinität der Histidinreste zu immobilisierten divalenten Kationen genutzt.

Probeninduktion

100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Vorkultur eines Bakterienstammes zur Expression von ‚His-Tag‘-Proteinen angeimpft und bei 37 °C geschüttelt bis eine OD₆₀₀ von 0,4–1 erreicht wurde. Dann wurde mit 1 mM IPTG induziert und für weitere 2–3 Stunden geschüttelt.

Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen

Die Aufreinigung der Proteine erfolgte mit ‚His Bind Resin‘ (Novagen, USA) als Säulenmaterial in Minisäulen bei einer Säulenbetthöhe von 2,5 cm. Das Säulenmaterial wurde durch Waschen mit entionisiertem Wasser, 50 mM NiSO₄ und Bindungspuffer (5 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9) vorbereitet. Parallel dazu wurden die Zellen aus 100 ml induzierter Bakterienkultur für 5 Minuten bei 5000 x g pelletiert und danach in 4 ml Bindungspuffer resuspendiert. Der Zellaufschluß erfolgte durch 6-10 Impulse Ultraschall für 15 Sekunden, nicht aufgeschlossene Zellen wurden abzentrifugiert und der Zellextrakt wurde direkt auf die Säule gegeben. Die Säule wurde mit 10 Säulenvolumen Bindungspuffer und 6

Säulenvolumen Waschpuffer (60 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9) gewaschen. Spezifisch gebundenes Protein wurde im Anschluß mit 6 Volumen 1 M Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9, eluiert. Mit dieser Methode konnten auch Proteine ohne ‚His-Tag‘, welche mit den ‚His-Tag‘-Proteinen Dimere bilden, gemeinsam mit dem ‚His-Tag‘-Protein von der Säule coeluiert werden.

Aufreinigung unter denaturierenden Bedingungen

Die Vorbereitung der Säule und die Induktion der Zellkultur erfolgte wie für die Aufreinigung unter nicht denaturierenden Bedingungen beschrieben, jedoch enthielten die verwendeten Puffer zusätzlich 6 M Urea zur Solubelisierung von Proteinen.

Das bakterielle Zellpellet wurde in 40 ml Bindungspuffer aufgenommen und die Zellen wurden durch Ultraschallbehandlung lysiert. Unlösliche Zellbruchstücke und ‚inclusion bodies‘ wurden abzentrifugiert und danach in 20 ml Bindungspuffer aufgenommen und erneut mit Ultraschall behandelt. Diese Schritte wurden ein- bis zweimal wiederholt. Das dann entstandene Pellet wurde in 6 M Urea enthaltenden Bindungspuffer aufgenommen. Nach einstündiger Inkubation auf Eis wurde unlösliches Material abzentrifugiert. Der Überstand wurde direkt auf die vorbereitete Säule gegeben. Diese wurde mit 10 Volumen 6 M Urea enthaltenden Bindungspuffer und 6 Volumen Waschpuffer (20 mM Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9) gewaschen. Die Elution erfolgte mit 6 Volumen 1 M Imidazol, 6 M Urea, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7,9.

3.4 Prozessierungs-Enzymtests

Zur Bestimmung der Prozessierungsaktivität wurden die daraufhin zu untersuchenden Proteine bzw. mitochondrialen Fraktionen mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen der β -Untereinheit der ATP-Synthase von *Nicotiana tabacum* und *Saccharomyces cerevisiae* sowie dem FeS-Protein von *Solanum tuberosum* inkubiert. Die Synthese der Vorläuferproteine erfolgte aus den entsprechenden Plasmiden in Gegenwart von L-[³⁵S] Methionin mit einem gekoppelten Transkriptions/Translations-Kit (TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems, Promega Corporation, USA) nach Angaben des Herstellers. Die Prozessierungsversuche wurden bei 28 °C in einem Volumen von 120 μ l mit 88 μ l Prozessierungspuffer (22 mM Tris-HCl, 25 mM NaCl, 0,6 % Triton X-100, 1 mM PMSF, 300 μ M ZnCl₂), 1-4 μ l radioaktiv markiertem Vorläuferprotein und ca. 2 μ g gereinigtem Protein bzw. 100 μ g

Gesamtprotein durchgeführt. Nach einer Stunde wurde die Reaktion durch Zugabe des gleichen Volumens 2-fach konzentrierten Laemmlipuffers (Laemmli, 1970) gestoppt. Durch Zugabe von 3 mM EDTA ist die Inhibierung der Prozessierungsaktivität gezeigt worden. Die Prozessierungsprodukte wurden über Glycin-SDS-Polyacrylamidgele aufgetrennt und durch Auflegen eines Autoradiographiefilmes detektiert.

4. Molekularbiologische Methoden

4.1 Grundtechniken zur Analyse von Nukleinsäuren

Enzymatische Modifikationen von DNA wie Restriktionsverdau, Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA und Ligation von DNA-Fragmenten mit linearisierter Vektor-DNA sowie Techniken wie Phenolextraktion, Ethanol-fällung etc. und die Auftrennung von Nukleinsäuren in Agarosegelen wurden nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten erfolgte mittels QIAEXII Gel Extraction System bzw. QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN GmbH, Hilden). Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* wurde nach der Methode von Zhou et al. (1990) oder mittels QIAGEN Plasmid Mini Kit bzw. QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) isoliert.

4.2 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Didesoxymethode (Sanger, 1977) durch die Firma Replicon, Berlin mittels ALF-Sequencer (Pharmacia, USA).

4.3 Transformation von Plasmid-DNA

Transformation in E. coli

Unterschiedliche *E. coli*-Stämme dienten entweder zur Vermehrung von Plasmid-DNA, zur Vermehrung und Identifizierung von rekombinanter DNA in Form von Plasmiden oder zur Expression von Genen mit Hilfe von Expressionsvektoren. Die Herstellung von kompetenten Zellen und die Transformation erfolgten nach der Methode von Nishimura et al. (1990). Alternativ dazu wurden Transformationen durch Elektroporation unter Verwendung eines BioRad Gene Pulser (BioRad, USA) bei 12,5 kV/cm, 200 Ω und 25 μ F durchgeführt. Hierbei

wurde ein Protokoll von Zabarovsky und Winberg (1990) angewandt. Transformierte Zellen bildeten auf Grund einer erworbenen Antibiotika-Resistenz auf Antibiotika enthaltenden LB-Platten Kolonien.

Transformation in Neurospora crassa und Herstellung homokaryotischer Transformanten

Die Herstellung von kompetenten Sphäroplasten und die Transformation erfolgten nach Vollmer und Yanofsky (1986). Dazu wurden zunächst aus frisch gekeimten Konidien unter Einsatz von ‚Lysing Enzymes‘ (Sigma, USA) Protoplasten hergestellt. Diese wurden mit CaCl kompetent gemacht und mit hochreiner DNA transformiert. Hierbei wurde 1 µg DNA mit 2 µl 50 mM Spermidin und 5 µl Heparin (5 mg/ml) gemischt, 20 Minuten auf Eis gelagert und danach mit 100 µl Sphäroplasten weitere 30 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde der Ansatz mit 1 ml einer 40 % PEG 4000-Lösung versetzt und für 20 Minuten bei Raumtemperatur belassen. 250 µl des Transformationsansatzes wurden mit 10 ml eines Topagars gemischt und sofort auf Bottomagarplatten ausgegossen. Das Sorbose- und Sorbitol-haltige Medium in Top- und Bottomagar führt zum kolonieartigen Wachstum von *N. crassa* und erlaubt die Isolation von Einzelkolonien auf den Platten. Die Selektion von Basta-resistenten Transformanten erfolgte nach Pall (1993) durch Zusatz von 200 µg/ml Phosphinothricin (Sigma, USA) zum 0,5 % Prolin enthaltenden N-freien Topagar. Einzelne Kolonien wurden nach 2 bis 3 Tagen zur nochmaligen Selektion in 1 ml Selektionsmedium (0,5 % Prolin und 200 µg/ml Phosphinothricin enthaltendes N-freies Minimalmedium nach Vogels (1964)) übertragen.

Über einkernige Mikrokonidien wurden aus den so erhaltenen primären Transformanten homokaryotische Stämme isoliert. Dazu wurden die Transformanten auf SC-Medium, supplementiert mit 1 mM Iodoacetat, überimpft (Ebbole & Sachs, 1990). Die gebildeten Konidien wurden 7 Tage nach Inokulation mit sterilem Wasser abgeschwemmt und zur Isolierung der Mikrokonidien durch einen Filter mit 5 µm Porenweite filtriert. 100 µl des Filtrats wurden erneut auf 200 µg/ml Phosphinothricin und 0,5 % Prolin enthaltende Sorbose- und Sorbitol-haltige Platten ausgestrichen. Pro Transformant wurden nach 2 bis 3 Tagen 3 Kolonien isoliert und erneut auf Selektionsmedium überprüft.

4.4 Polymerasekettenreaktion

In Abhängigkeit von der Primersequenz und der Länge des zu amplifizierenden Fragments wurden bei der PCR-Amplifikation von spezifischen DNA-Fragmenten Bedingungen innerhalb der im folgenden angegebenen Bereiche gewählt: Denaturierung für 5 Minuten bei 94 °C; danach 30–40 Zyklen Denaturierung für 1 Minute bei 94 °C, Annealing für 1 Minute bei Temperaturen von 2–5 °C unter dem Schmelzpunkt (berechnet nach der G/C-Regel) von Primern und Template-DNA und Extension für 1–2 Minuten bei 72 °C. Die Reaktion wurde in 100 µl 1 x PCR-Puffer durchgeführt. Der Reaktionsansatz enthielt 2,5 Units *Taq*- bzw. *Pfu*-Polymerase, 250 µM dNTPs, je 0,2 µM Primer und 2-5 ng Template-DNA (Plasmid-DNA).

4.5 Southern Blot Analyse

Das Blot-Verfahren nach Southern (1975) wurde zur Untersuchung der Einbaurate von in *N. crassa* transformierten Expressionsvektoren genutzt.

N. crassa wurde in Minimalmedium nach Vogels (1964) in Schüttelkolben kultiviert. Die genomische DNA wurde nach der Methode von Lee et al. (1988) aus dem Myzel dieser Schüttelkulturen isoliert, mit Restriktionsenzymen restringiert und in Agarosegelen aufgetrennt (ca. 10 µg DNA). Der Transfer der DNA auf Trägermembranen erfolgte nach Sambrook et al. (1989) durch die Kapillarmethode.

Als Sonden dienten Digoxigenin-markierte DNA-Fragmente, welche durch ‚random primed‘-Reaktion (Feinberg & Vogelstein, 1983) mittels ‚Random Primed DNA Labeling Kit‘ (Boehringer Mannheim, Mannheim) hergestellt wurden. Die Hybridisierung und Detektion erfolgte nach einem Protokoll der Firma Boehringer Mannheim. Bei der Detektion kam der DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) zur Anwendung.

4.6 Northern Blot Analyse

Die Northern Blot Analyse diente dem Nachweis von RNA-Transkripten von in *N. crassa* transformierter und in das Genom eingebauter DNA. Es wurde wie für die Southern Blot Analyse aus Schüttelkulturen von *N. crassa* homogenes Myzel gewonnen. Die Gesamt-RNA-Präparation erfolgte aus in flüssigem Stickstoff gemörsertem Myzel nach der Methode von Sokolowsky et al. (1990).

Ca. 40 µg Gesamt-RNA wurden nach Sambrook et al. (1989) in denaturierenden Formaldehyd-Agarose-Gelen aufgetrennt und im Elektroblobverfahren auf Nylonmembranen (Hybond N, Amersham, Großbritannien) unter Verwendung einer Naßblotkammer (Trans Blot Cell, 18 x 24 x 9,5 cm, Elektrodenabstand 8 cm, Biorad, USA) übertragen. Der Blot erfolgte in 25 mM Na-Phosphat-Puffer, pH 7,0 für 2 Stunden bei 500 mA.

Die Herstellung einer [³²P]-markierten Sonde erfolgte in einer linearen PCR unter Verwendung nur eines Primers nach Stürzl & Roth (1990). Die Prähybridisierung und Hybridisierung wurde nach Sambrook et al. (1989) bei 65°C durchgeführt. Anschließend wurden die Hybridisierungssignale durch Auflegen eines Autoradiographiefilmes detektiert.

4.7 Screening einer cDNA-Bank von *Neurospora crassa*

Die verwendete cDNA-Bank, welche die myceliale mRNA des *N. crassa* Wild-Typ-Stammes 74-OR23-1VA repräsentiert, wurde von Orbach, Sachs und Yanofsky (1990) mittels Lambda Zap Version I⁺ System konstruiert und von Frau Dr. I. B. Barthelmess zur Verfügung gestellt. Die Bank wurde in geeigneten Konzentrationen ausplattiert (20000 pfu/Platte in der ersten Screeningrunde, 100–1000 pfu/Platte in jeder weiteren Screeningrunde). Zur Infektion mit den Bakteriophagen diente der *E. coli*-Stamm BB4. Die Phagen-DNA wurde auf Nylonmembranen (Hybond-N+, Amersham, Großbritannien) übertragen.

Unspezifische Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit 5 x SSC, 0,1 % N-Laurylsarcosin, 0,02 % SDS, 1 % Blockierungs-Lösung (Boehringer Mannheim, Mannheim) abgesättigt. Nach Zugabe eines degenerierten, am 5'-Ende Digoxigenin-markierten Oligonukleotides (synthetisiert durch die Firma TIB MOLBIOL, Berlin) in einer Konzentration von 10 pmol/ml erfolgte die Hybridisierung bei 44 °C über Nacht. Anschließende Waschschrte mit 2 x SSC bzw. 0,5 x SSC, 0,1 % SDS je 2 mal für 5 bzw. 15 Minuten wurden bei Hybridisierungstemperatur durchgeführt. Die Detektion der Hybridisierungssignale erfolgte mittels DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Zur *in vivo* Excision von pBluescript SK aus dem Lambda Zap Vektor wurde das ExAssistTM/SOLRTM System verwendet.

4.8 Herstellung und Screening einer genomischen DNA-Bank von *Rhodobacter sphaeroides*

Herstellung der genomischen DNA-Bank

Rhodobacter sphaeroides (ATCC 17023) wurde wie in Benning und Somerville (1992) beschrieben in Sistroms Medium (Sistrom, 1960) bei 28 °C unter Dauerlicht in einem Klimaschrank kultiviert. Die Präparation von hochmolekularer DNA erfolgte nach Murray und Thompson (1980) aus 250 ml Standkulturen. Zur Konstruktion einer genomischen DNA-Bank unter Verwendung des ‚Predigest ZAP Express™ BamHI/CIAP Vector Cloning Kit‘ (Stratagene, Heidelberg) wurde die hochmolekulare DNA mit dem Restriktionsenzym *Sau3A* partiell zu Fragmenten mit einer Größe von ca. 3 kbp verdaut. Auf diese Weise wurden zur vorverdauten Vektor-DNA kompatible Enden erhalten. Nach Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte die Ligation mit der Vektor-DNA nach Herstellerangaben. Die Verpackung der ligierten Phagen-DNA zu Phagenpartikeln nach Becker und Gold (1975) wurde mittels Gigapack III Gold Packaging Extract (Stratagene, Heidelberg) nach Anweisungen des Herstellers durchgeführt.

Screening der Bank

Die genomische DNA-Bank wurde mit 5´Digoxigenin markierten Oligonukleotiden gescreent (synthetisiert von der Firma TIB MOLBIOL, Berlin). Das Screeningverfahren entsprach demjenigen zum Screening der cDNA-Bank von *Neurospora crassa*. Die Hybridisierungstemperaturen lagen 5 °C unter dem Schmelzpunkt (berechnet nach der G/C-Regel). Die Phagenvermehrung erfolgte im *E. coli*-Stamm XL1-Blue MRF´. Die *in vivo* Excision von pBK-CMV-Phagemiden mit inserierten DNA-Fragmenten aus dem ZAP Express-Vektor erfolgte durch Co-Infektion mit Ex Assist Helferphagen. Die Selektion der pBK-CMV-Phagemide wurde mittels *E. coli*-Stamm XL0LR durchgeführt. Verfahren wurde bei der Excision nach einem Protokoll der Firma Stratagene, Heidelberg.

5. Computeranalysen von DNA- und Aminosäuresequenzen

5.1 Identifikation von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen

Zur Identifikation von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen wurden mit Programmen des GCG-Software-Paketes (Devereux et al., 1984) die Datenbanken des European Bioinformatics Institute (EBI, Hinxton, UK) und die Datenbanken „Genbank“ (NCBI, Bethesda, USA) sowie „DNA Data Bank of Japan“ (DDBJ, Mishima, Japan) durchsucht. Außerdem wurden unter Nutzung des Service des „Institute for Genomic Research“ Datenbanken von Sequenzierprojekten durchsucht. Die zur Anwendung gekommenen Programme waren FASTA, TFASTA und BLAST.

FASTA sucht nach Ähnlichkeiten zwischen der Ausgangssequenz und einer beliebigen Gruppe von weiteren Sequenzen des gleichen Typs nach der Methode von Pearson und Lipman (1988). TFASTA leitet von einer Aminosäuresequenz Nukleinsäuresequenzen ab und sucht unter Nutzung des selben Algorithmus wie FASTA nach Ähnlichkeiten dieser Sequenzen zu einer beliebigen Gruppe von Nukleinsäuresequenzen. BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) vergleicht Sequenzen nach der Methode von Altschul et al. (1990).

5.2 Erstellung multipler Sequenzalignments

Multiple Alignments wurden mit dem Programm PILEUP des GCG-Software-Paketes bzw. mit dem Programm ClustalW unter Nutzung des Service des European Bioinformatics Institute erstellt. PILEUP benutzt eine vereinfachte Form der progressiven, multiplen Alignment-Methode von Feng und Doolittle (1987), wobei das multiple Alignment aus einer Gruppe von verwandten Sequenzen durch fortschreitenden paarweisen Vergleich gebildet wird. ClustalW erstellt multiple Alignment nach einer von Thompson et al. (1994) überarbeiteten progressiven, multiplen Alignment-Methode.

5.3 Bestimmung von Abstammungsverhältnissen

Zur Bestimmung von Abstammungsverhältnissen wurden ausgewählte Phylogenie-Programme des Phylip-Softwarepaketes genutzt.

Mit Hilfe des Programmes SEQBOOT wurden zunächst mit der BOOTSTRAP-Methode (Felsenstein, 1985) aus einem vorgegebenen Datensatz 100 verschiedene Datensätze, die

durch einen zufälligen Austausch einer von der Datengröße abhängigen Anzahl von Aminosäuren entstehen, mit 17 unterschiedlichen Sequenzreihenfolgen gebildet.

Danach wurden mit dem Programm PROTDIST Distanz-Matrizen unter Anwendung der Dayhoff PAM-Methode zur Bewertung der Aminosäureaustausche berechnet. Bei dieser Methode wird die Wahrscheinlichkeit eines Wechsels von einer Aminosäure in eine andere Aminosäure in Form von Einheiten eingestuft. Eine Einheit entspricht der Austauschwahrscheinlichkeit von 1 %. Die Matrix wird mit Hilfe der Einheiten für die Austauschwahrscheinlichkeiten der verschiedenen Aminosäuren berechnet.

Mittels des Programmes NEIGHBOR wurden unter Anwendung der UPGMA-Methode aus den Distanz-Matrizen Stammbäume erstellt. Die UPGMA-Methode geht davon aus, daß die Evolutionsrate der untersuchten Moleküle relativ konstant ist.

CONSENSUS wurde genutzt um einen Stammbaum nach der M1-Methode (Margush & McMorris, 1981) zu bilden, der mit allen errechneten Stammbäumen (100) am besten übereinstimmt. DRAWGRAM kam zur Erstellung von Stammbaumdiagrammen zur Anwendung.

5.4 Ermittlung von degenerierten Oligonukleotidsequenzen

Die Sequenzen der zum Screening von DNA-Banken notwendigen degenerierten Oligonukleotide wurden mit dem Programm PROBE der PC-Gene-Software ermittelt.

5.5 Berechnung und Vorhersage einiger Eigenschaften von Proteinen

Die Berechnung der theoretischen Molekulargewichte und isoelektrischen Punkte von Proteinen sowie die Erstellung von Hydrophobizitätsprofilen nach Kyte und Doolittle (1982) erfolgte mit Programmen des ‚ExpASy‘ (Expert Protein Analysis System) unter Nutzung eines Service des Swiss Institute of Bioinformatics.

IV. Ergebnisse

1. Charakterisierung der Untereinheitenkomposition und Analyse der Prozessierungsaktivität von Cytochrom c Reduktasen ausgewählter Eukaryoten

Die Bindung der beiden Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease an die Cytochrom c Reduktase ist ein ursprünglicher Zustand innerhalb der Co-Evolution der beiden Enzyme (Braun & Schmitz, 1995b; Braun et al., 1997). Dieser ursprüngliche Zustand ist in den Cytochrom c Reduktasen von Pflanzen konserviert. Um die Thesen zu überprüfen, wurden die zwei niederen Pflanzen *Platycerium bifurcatum* (Geweihfarn) und *Equisetum arvense* (Ackerschachtelhalm), die Alge *Polytomella* spp. und der Protist *Reclinomonas americana* (Flavin & Nerad, 1993) ausgewählt, um aus ihnen die Cytochrom c Reduktasen zu isolieren und hinsichtlich ihrer Prozessierungsproteaseaktivitäten zu charakterisieren. Die Aufreinigung von Mitochondrien aus den Modellorganismen und die Identifizierung mitochondrialer Proteinkomplexe nach zweidimensionaler Auftrennung mittels Blau-Native Polyacrylamid-gelelektrophorese (BN-PAGE) und Tricin-SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese (Tricin-SDS-PAGE) war die Grundlage für diese Vorhaben.

1.1 Zweidimensionale Auftrennung mitochondrialer Proteinkomplexe von niederen Pflanzen und *Reclinomonas americana* durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE

BN-PAGE ist eine leistungsfähige Methode zur Charakterisierung von membrangebundenen Proteinkomplexen (Schägger & von Jagow, 1991). Hierbei werden die Proteinkomplexe unter milden Bedingungen mit nicht-ionischen Detergenzien solubelisiert und anschließend in Gegenwart von Coomassie Blau nativ im elektrischen Feld aufgetrennt. Coomassie Blau bindet an die Proteinkomplexe, verleiht ihnen eine negative Nettoladung und erlaubt damit eine Auftrennung der Proteinkomplexe entsprechend ihres Molekulargewichtes. Die Identifizierung einzelner mitochondrialer Proteinkomplexe kann durch die Analyse der Untereinheitenkomposition in denaturierenden SDS-Polyacrylamid-gelelektrophoresen als zweite Dimension erfolgen.

Mitochondriale Proteinkomplexe von *Platycerium bifurcatum*, *Equisetum arvense* und *Polytomella* spp.

Zur Isolation sehr reiner Mitochondrien aus Pflanzen ohne chloroplastidäre Verunreinigungen wird häufig etioliertes Gewebe zum Beispiel aus Knollen oder etiolierten Keimlingen verwendet. Die meisten biochemischen Untersuchungen an Pflanzenmitochondrien wurden deshalb an Organellen aus diesen Geweben durchgeführt.

Solche Gewebe sind allerdings aus niederen Pflanzen nicht verfügbar. Als Ausgangsmaterial zur Isolation von Mitochondrien aus niederen Pflanzen dienten deshalb die sterilen Hüllwedel des Geweihfarns *P. bifurcatum*, welche im Gehalt an Chloroplasten stark reduziert sind sowie etiolierte unterirdische Sproßteile des Ackerschachtelhalms *E. arvense*. Außerdem wurde die chloroplastenfreie, zu den Chlorophyta zählende Alge *Polytomella* spp. verwendet. Mitochondrien aus Kartoffelknollen dienten als Vergleichsorganellen.

Die Methoden zur Isolation von Mitochondrien aus *P. bifurcatum* und *E. arvense* sind neu entwickelt worden und ausführlich im Methodenteil beschrieben. Für die Isolation von Mitochondrien aus *Polytomella* spp. wurden bereits existierende Protokolle angepaßt.

Nach der BN-PAGE von mitochondrialem Gesamtprotein aus *Polytomella* spp. waren vier Proteinkomplexe in Form von Banden im Gel sichtbar (Daten nicht gezeigt). Einer der aufgetrennten Proteinkomplexe konnte nach erfolgter Tricin-SDS-PAGE (2. Geldimension) auf Grund seiner Untereinheitenkomposition als der bereits von Gutiérrez-Cirlos et al. (1993) beschriebene Cytochrom c Reduktase-Komplex identifiziert werden (Abb. 5).

Nach zweidimensionaler Auftrennung von mitochondrialem Gesamtprotein von *P. bifurcatum* wurden die F_0F_1 -ATP-Synthase und die Cytochrom c Reduktase auf Grund ihrer Untereinheitenkomposition erkannt (Abb. 6). Der Cytochrom c Reduktase-Komplex weist in Blau-Nativen Gelen ein apparentes Molekulargewicht von ca. 500 kDa auf (Daten nicht gezeigt).

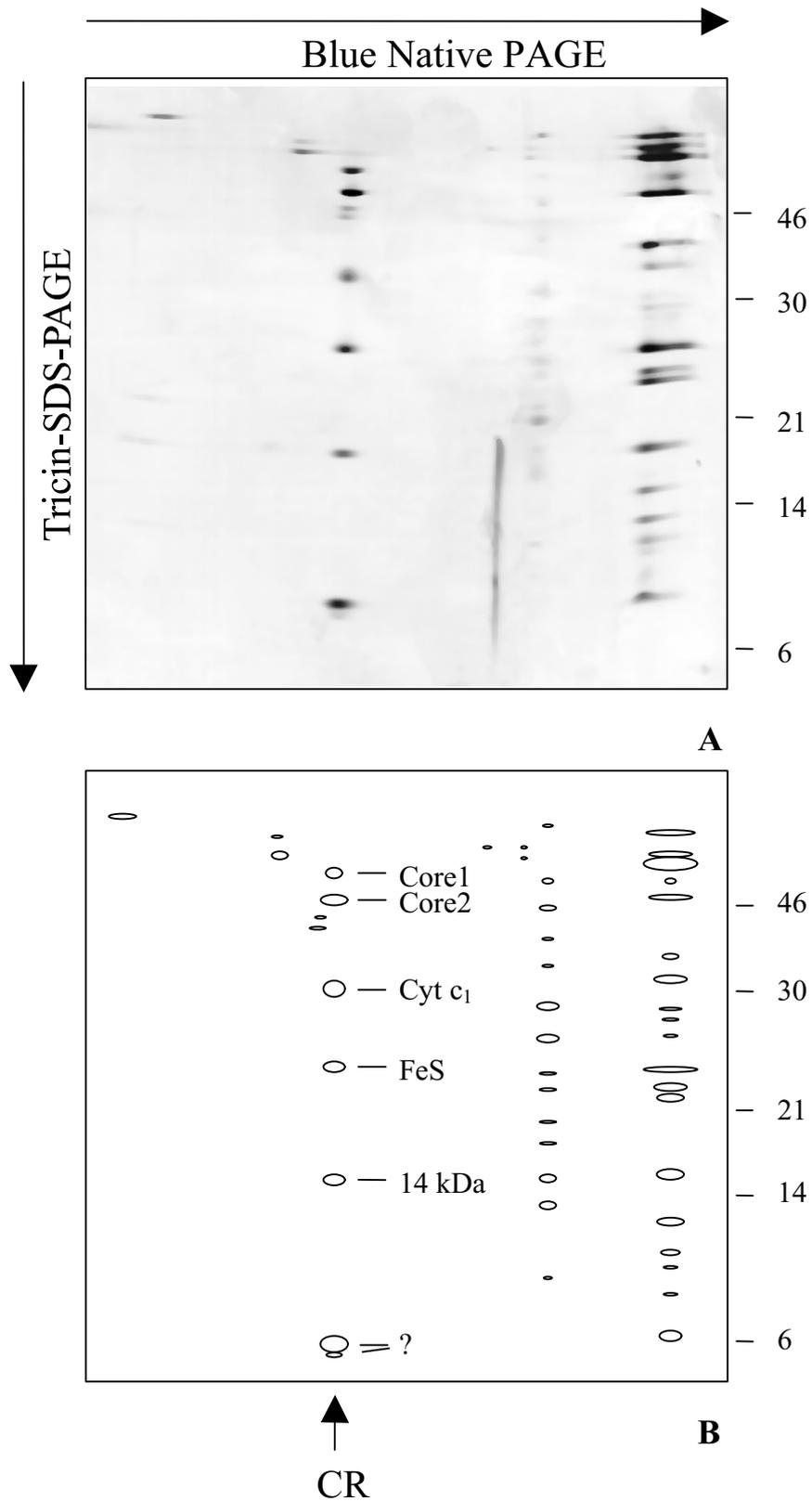


Abbildung 5: Zweidimensionale Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen aus *Polytomella* spp. durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE. A: Silber-gefärbtes Gel. B: Schema des Gels. Die molekularen Massen von Standardproteinen sind rechts in kDa angegeben. CR, Cytochrom c Reduktase; Cyt, Cytochrom; FeS, Eisen-Schwefel-Protein; ?, nicht identifizierte Untereinheiten.

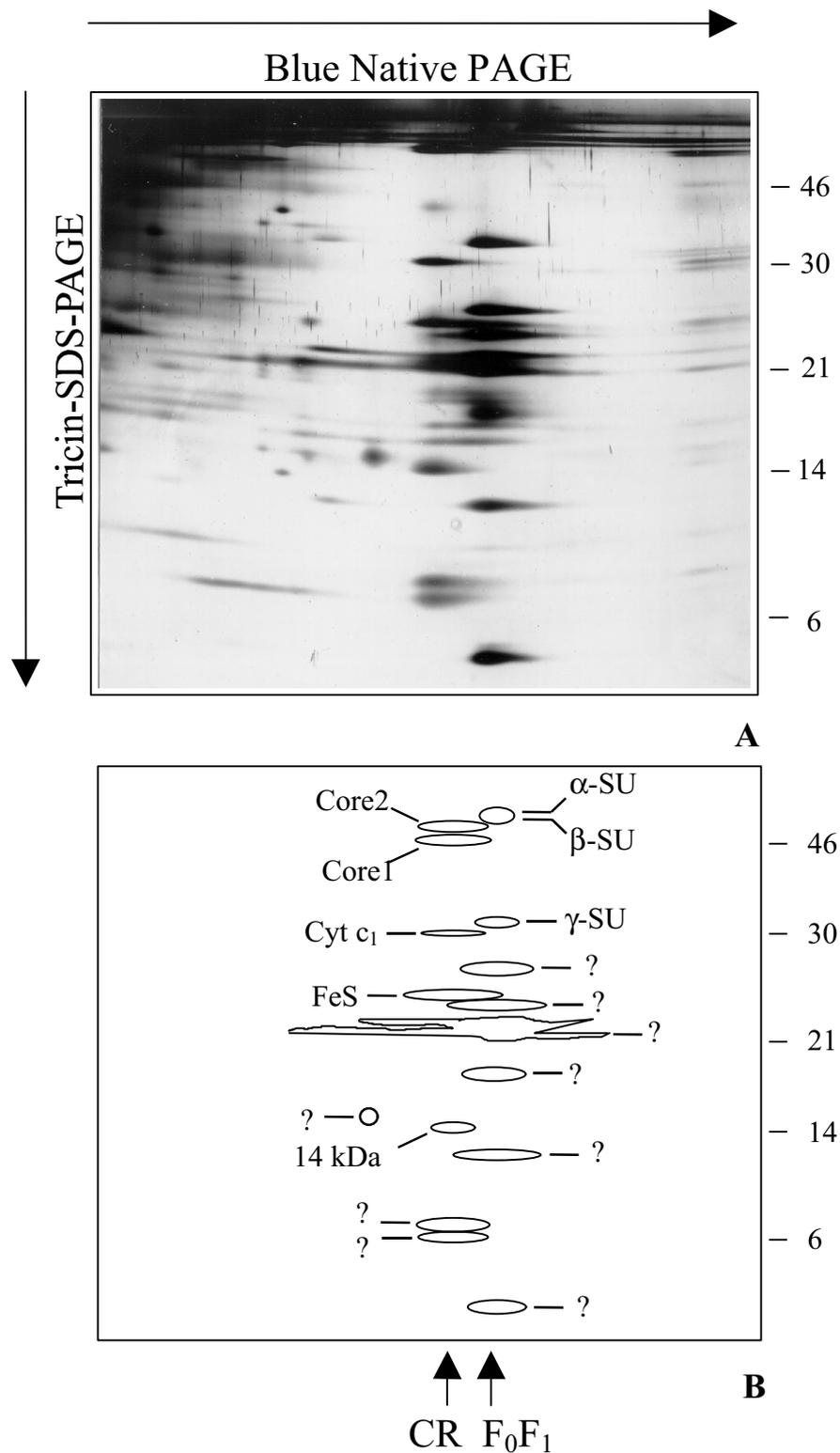


Abbildung 6: Zweidimensionale Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen aus *P. bifurcatum* durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE. A: Silber-gefärbtes Gel. B: Schema des Gels. Die molekularen Massen von Standardproteinen sind rechts in kDa angegeben. CR, Cytochrom c Reduktase; Cyt, Cytochrom; FeS, Eisen-Schwefel-Protein; SU, Subunit; F₀F₁, F₀F₁-ATP-Synthase; ?, nicht identifizierte Untereinheiten.

Auch nach der zweidimensionalen Auftrennung von mitochondrialem Gesamtprotein aus *E. arvensis* mittels BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE wurde die Cytochrom c Reduktase durch Vergleich der Anzahl und Größe der Untereinheiten identifiziert (Abb. 7). In Blau-Nativen ersten Geldimensionen konnte dem Cytochrom c Reduktase-Komplex eine 500 kDa Bande zugeordnet werden (Daten nicht gezeigt).

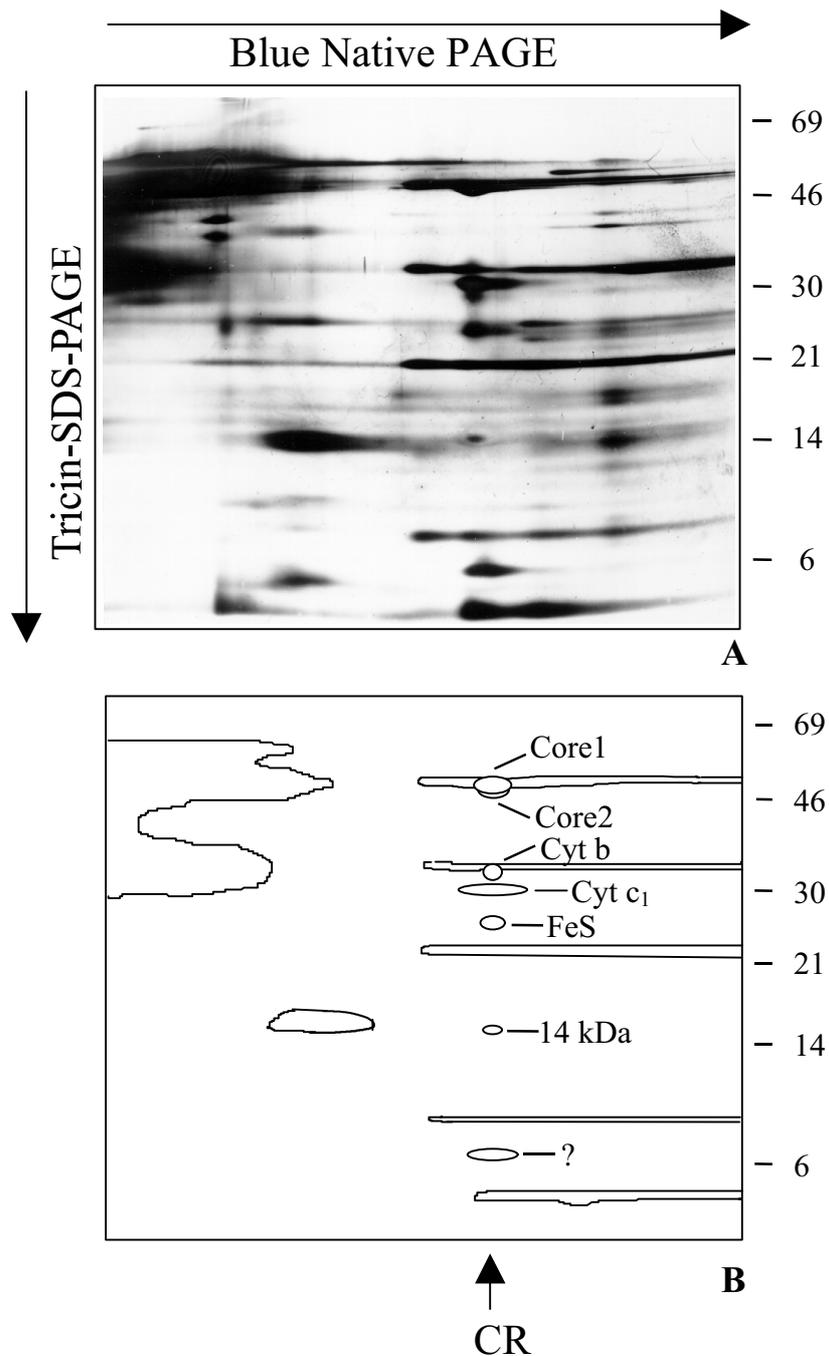


Abbildung 7: Zweidimensionale Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen aus *E. arvensis* durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE. A: Silber-gefärbtes Gel. B: Schema des Gels. Die molekularen Massen von Standardproteinen sind rechts in kDa angegeben. CR, Cytochrom c Reduktase; Cyt, Cytochrom; FeS, Eisen-Schwefel-Protein; ?, nicht identifizierte Untereinheit.

Mitochondriale Proteinkomplexe von *Reclinomonas americana*

Das Chondriom des Protisten *Reclinomonas americana* besitzt besonders ursprüngliche Merkmale (Lang et al., 1997; Gray et al., 1999). Der Organismus selbst gehört zu einer Protozoengruppe, die sehr früh in der Evolution von den Haupteukaryotenlinien abgezweigt ist (Gray et al., 1998). Damit ist *R. americana* ein geeigneter Modellorganismus für evolutionsbiologische Untersuchungen an mitochondrialen Proteinkomplexen der Atmungskette auf molekularer Ebene. Die Charakterisierung der Cytochrom c Reduktase dieses Organismus kann Einblicke in den Zustand zu Beginn der Co-Evolution von mitochondrialer Prozessierungsprotease und Cytochrom c Reduktase geben.

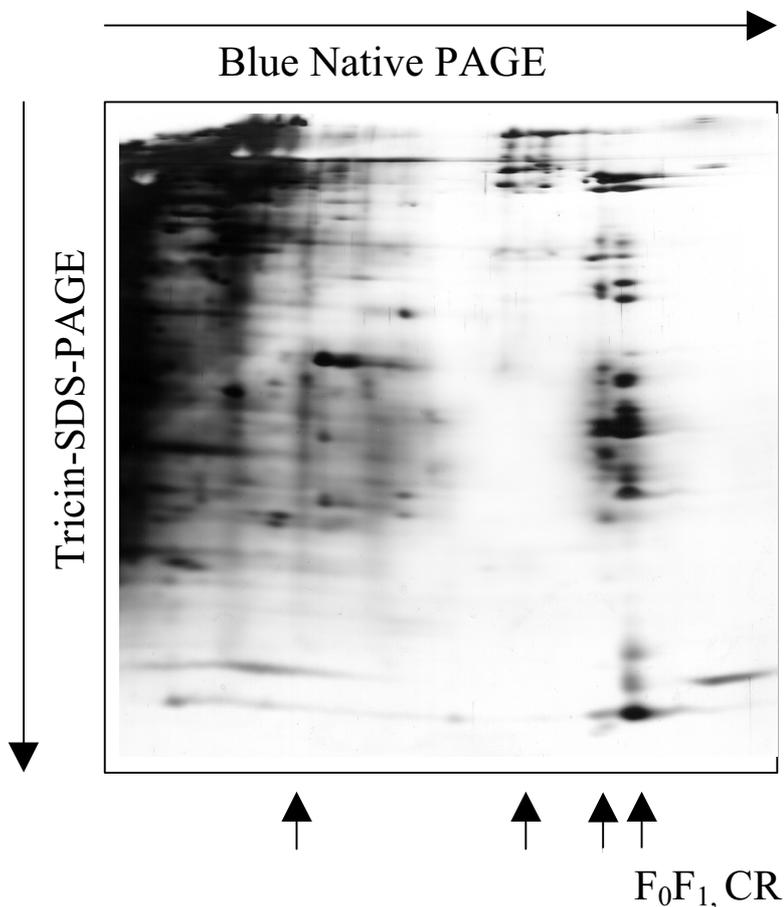


Abbildung 8: Zweidimensionale Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen aus *R. americana* durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE. Die Pfeile weisen auf noch nicht identifizierte Proteinkomplexe. Der mit F₀F₁ und CR beschriftete Pfeil weist auf Proteinkomplexe, bei denen es sich möglicherweise um die F₀F₁-ATP-Synthase und die Cytochrom c Reduktase handelt, welche vermutlich im BN-Gel durch eine gemeinsame Bande repräsentiert werden.

Jedoch führten Versuche zur Aufreinigung von Mitochondrien aus *Reclinomonas americana* nach einem modifizierten Protokoll von Lang et al. (1977) nur zu geringen Ausbeuten mit schwankender Qualität. Nach zweidimensionaler Auftrennung der isolierten mitochondrialen Fraktionen durch BN-PAGE und Tricine-SDS-PAGE waren deshalb je nach Qualität der Mitochondrienpräparation 3 bis 5 unterschiedliche Proteinkomplexe nur sehr schwach erkennbar, deren zweifelsfreie Identifizierung bisher noch nicht möglich war. Allerdings läßt das aus einer Bande im BN-Gel resultierende Proteinmuster nach Auftrennung der Proteinkomplexe in der zweiten Geldimension vermuten, daß die F_0F_1 -ATP-Synthase und die Cytochrom c Reduktase in der ersten Geldimension durch eine gemeinsame Bande repräsentiert werden und sich deren Untereinheiten in der zweiten Geldimension teilweise überlagern (Abb. 8).

1.2 Aufreinigung der Cytochrom c Reduktasen von *Platyserium bifurcatum*, *Equisetum arvense* und *Polytomella* spp.

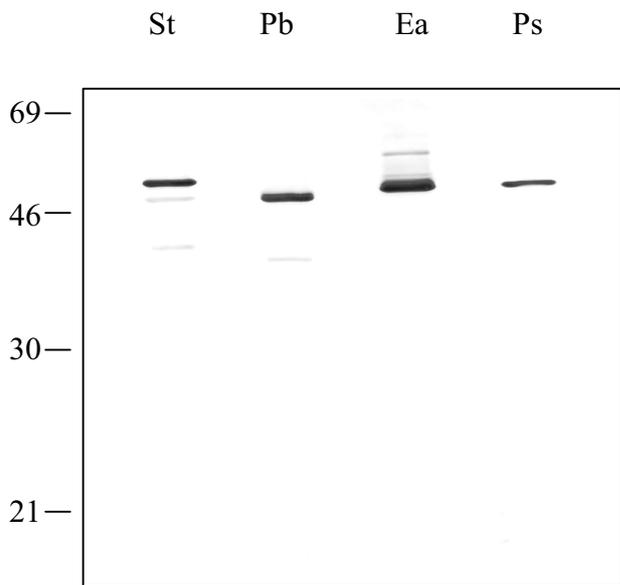
Auf Grund des limitierten Ausgangsmaterials zur Isolation von Mitochondrien aus den Versuchsorganismen standen nur sehr geringe Mengen aufgereinigter Organellen zur Verfügung. Ein klassisches biochemisches Reinigungsverfahren zur Isolation der Cytochrom c Reduktasen konnte nicht angewandt werden. Die Reinigung der Cytochrom c Reduktasen aus *P. bifurcatum*, *E. arvense*, *Polytomella* spp. und als Kontrolle aus *S. tuberosum* erfolgte deshalb über ein auf BN-PAGE und Elektroelution basierendes Verfahren. Dazu wurden die als Banden in Blau-Nativen Gelen sichtbaren Cytochrom c Reduktase-Komplexe der vier Organismen aus mehreren Banden der Gele ausgeschnitten und elektroeluiert. Die Qualität der erhaltenen Fraktionen wurde durch Tricine-SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung überprüft (Abb. 11).

1.3 Identifizierung von Untereinheiten der aufgereinigten Cytochrom c Reduktasen

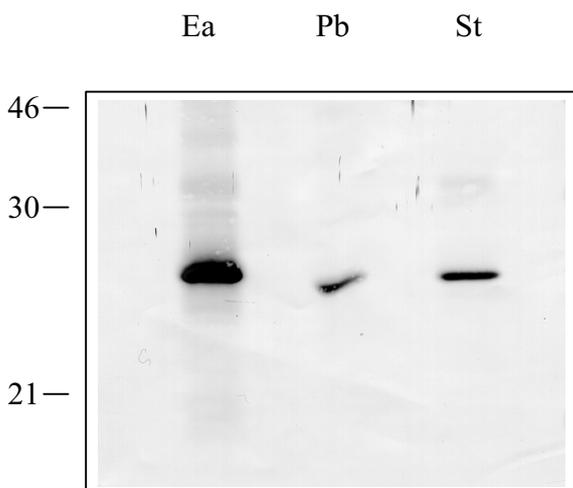
Immunologische Identifizierung von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktasen

Gereinigte Cytochrom c Reduktasen aus *P. bifurcatum*, *E. arvense*, *Polytomella* spp. und als Kontrolle aus *S. tuberosum* wurden über Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulosemembranen übertragen und mit Antikörpern, die gegen das Core I-Protein und das Eisen-Schwefel-Protein von *Neurospora crassa* gerichtet sind, analysiert (Abb. 9). Der gegen das

Core I gerichtete Antikörper erkannte jeweils eine Untereinheit der Cytochrom c Reduktasen, deren apparentes Molekulargewicht bei *S. tuberosum* 56 kDa, bei *P. bifurcatum*, *E. arvense* und *Polytomella* spp. 53 kDa ist. Das Serum, welches gegen das Eisen-Schwefel-Protein gerichtet ist, erkannte ebenfalls jeweils eine Untereinheit der Cytochrom c Reduktasen. Demnach repräsentieren die 26 kDa Banden die Eisen-Schwefel-Proteine der Cytochrom c Reduktasen von *P. bifurcatum* und *E. arvense* und eine 24 kDa Bande wie erwartet das Eisen-Schwefel-Protein der Cytochrom c Reduktase von *S. tuberosum*.



A



B

Abbildung 9: Immunologische Identifizierung der Core I-Proteine und Eisen-Schwefel-Proteine der Cytochrom c Reduktase-Komplexe von *S. tuberosum* (St), *P. bifurcatum* (Pb), *E. arvense* (Ea) und *Polytomella* spp. (Ps). Die aufgereinigten Cytochrom c Reduktase-Komplexe wurden durch Tricine-SDS-PAGE aufgetrennt, anschließend auf Nitrozellulosemembranen geblottet und mit Antikörpern, die gegen das Core I von *Neurospora crassa* (A) und gegen das Eisen-Schwefel-Protein von *Neurospora crassa* (B) gerichtet sind, inkubiert. Die molekularen Massen von Standardproteinen sind links neben dem Blot angegeben.

Identifizierung von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktasen durch Bestimmung von Primärstrukturen

Die Identifizierung einzelner Untereinheiten der Cytochrom c Reduktasen durch Bestimmung der Primärstruktur sollte zweifelsfrei die Identität der aufgereinigten Komplexe bestätigen bzw. Aussagen über die strukturelle Intaktheit der gereinigten Komplexe zulassen. Dazu wurden die Cytochrom c Reduktasen über präparative Tricin-SDS-PAGE in ihre Untereinheiten zerlegt und auf PVDF-Membranen transferiert. Einzelne Ponceau S gefärbte Banden wurden ausgeschnitten und zur direkten N-terminalen Proteinsequenzierung verwendet.

Organismus	apparentes Molekulargewicht	N-terminale Sequenzen	Identität
<i>P. bifurcatum</i>	30 kDa	DEAEEXLXA	Cytochrom c ₁
<i>E. arvense</i>	32 kDa	DEAEHSLAA	Cytochrom c ₁
<i>P. bifurcatum</i>	26 kDa	DTEVALQPSDDPTVA	FeS-Protein
<i>E. arvense</i>	26 kDa	STNAVTQSLDXAV	FeS-Protein
<i>E. arvense</i>	8 kDa	GKVAVRLKEVVYTLSPHQQN	QCR8-Protein

Tabelle 5: N-terminale Sequenzen von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktasen von *P. bifurcatum* und *E. arvense*. Die Aminosäuresequenzen sind im Einbuchstaben-Kode angegeben. X steht für Aminosäuren, die nicht eindeutig bestimmt werden konnten.

Für 5 Untereinheiten der beiden Cytochrom c Reduktase-Komplexe ließen sich die Identitäten anhand der ermittelten N-terminalen Aminosäuresequenzen bestimmen.

Die N-terminale Sequenz der 30 kDa Untereinheit der Cytochrom c Reduktase von *P. bifurcatum* weist eine signifikante Sequenzidentität zum reifen Cytochrom c₁ verschiedener Organismen auf (Abb. 10A). Bei dem 26 kDa Protein dieses Cytochrom c Reduktase-Komplexes handelt es sich wie bereits immunologisch nachgewiesen um das Eisen-Schwefel-Protein. Die N-terminale Sequenz dieser Untereinheit zeigt aber nur eine geringe Ähnlichkeit zum N-Terminus der Eisen-Schwefel-Proteine von anderen Organismen (Abb. 10B). Dieses Ergebnis war auf Grund der allgemein geringen Identitäten N-terminaler Sequenzen von Eisen-Schwefel-Proteinen verschiedener anderer Organismen zu erwarten. Offensichtlich ist der N-Terminus dieser Untereinheit nur sehr schwach konserviert.

Die 32 kDa Untereinheit der Cytochrom c Reduktase von *E. arvense* wurde auf Grund der hohen Sequenzähnlichkeit zum Cytochrom c₁ anderer Organismen als Cytochrom c₁ identifi-

ziert (Abb. 10A). Der N-Terminus des bereits durch Immunfärbung nachgewiesenen Eisen-Schwefel-Proteins von *E. arvense* weist eine relativ geringe Sequenzidentität zum Eisen-Schwefel-Protein anderer Organismen auf (Abb.10B). Die Aminosäuresequenz der ersten 20 N-terminalen Aminosäuren einer der kleinen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase von *E. arvense* besitzt hohe Sequenzidentität zum N-Terminus des *qcr8*-Genproduktes von Spaltheife und dazu homologen Sequenzen aus anderen Organismen (Abb. 10C).

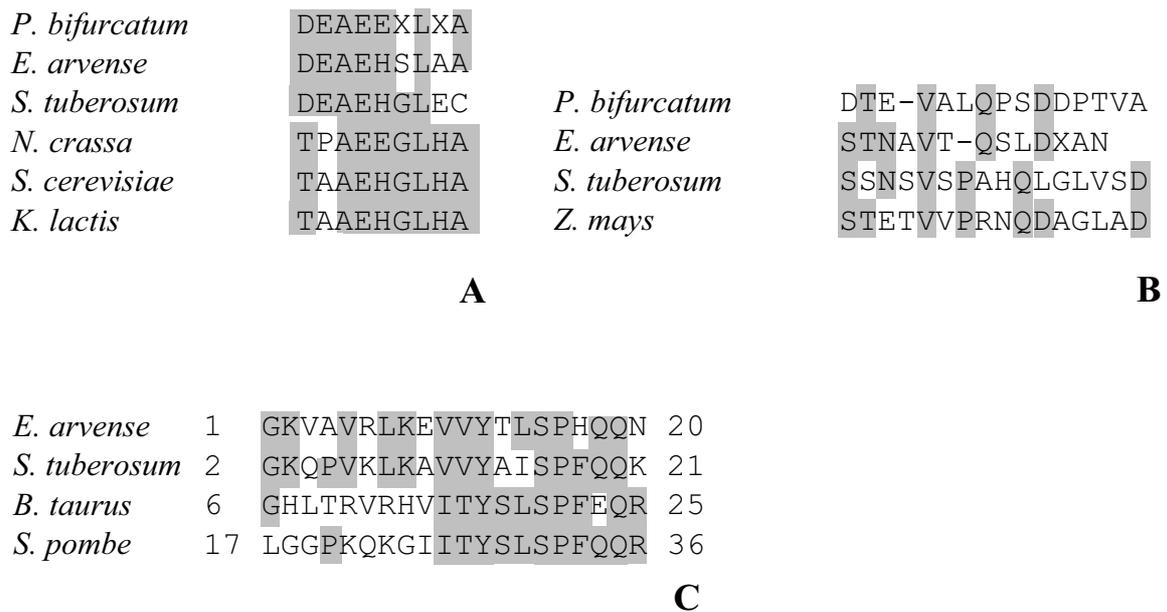


Abbildung 10: Alignments der N-terminalen Aminosäuresequenzen: (A) des Cytochrom c_1 von *P. bifurcatum*, *E. arvense*, *S. tuberosum* (P29610), *N. crassa* (P07142), *S. cerevisiae* (P07143) und *K. lactis* (Q00988). (B) des Eisen-Schwefel-Proteins von *P. bifurcatum*, *E. arvense*, *S. tuberosum* (P37841), *Z. mays* (P49727). (C) des QCR8-Proteins von *E. arvense* (P81247), *S. tuberosum* (P46269), *B. taurus* (P13271) und *S. pombe* (P50523). Aminosäuren, die in mindestens der Hälfte der aufgeführten Eiweiße konserviert sind, sind grau unterlegt.

1.4 Stöchiometrie und Untereinheitenkomposition der aufgereinigten Cytochrom c Reduktasen

Die Cytochrom c Reduktase aus Solanum tuberosum

Die Cytochrom c Reduktase aus *Solanum tuberosum* ist ein gut charakterisierter Proteinkomplex und wurde als Kontrollenzym isoliert und analysiert (Braun & Schmitz, 1992; Braun & Schmitz, 1995c; Jänsch et al., 1996). Die kalkulierte molekulare Masse des dimeren Cytochrom c Reduktase-Komplexes aus Kartoffel beträgt 495 kDa. In BN-Gelen weist er ein apparentes Molekulargewicht von 480 kDa auf (Jänsch et al., 1995).

Nach Auftrennung der über BN-PAGE und Elektroelution aufgereinigten Cytochrom c Reduktase aus *Solanum tuberosum* im Tricin-SDS-Gel und anschließender Silberfärbung sind 10 Untereinheiten erkennbar (Abb. 11): Das Core I (apparente molekulare Masse: 56 kDa), das Core II (52 kDa), Cytochrom b (35 kDa), Cytochrom c₁ (31 kDa), das FeS-Protein (24 kDa), die 14 kDa Untereinheit und vier Untereinheiten unter 10 kDa.

Die Cytochrom c Reduktase aus P. bifurcatum

Die apparente molekulare Masse des Cytochrom c Reduktase-Komplexes von *P. bifurcatum* liegt in Blau-Nativen Gelen bei 500 kDa (Daten nicht gezeigt). Da ähnliche Größen unter gleichen Versuchsbedingungen auch für die intakten dimeren Cytochrom c Reduktasen von Hefe, Rind und Kartoffel beschrieben wurden, kann davon ausgegangen werden, daß auch die Cytochrom c Reduktase von *P. bifurcatum* als Dimer vorliegt (Schägger et al., 1994; Jänsch et al., 1995).

Eine Analyse des gereinigten Komplexes in Tricin-SDS-Gelen ergab 15 Banden (Abb. 11). Durch Immunfärbung und N-terminale Sequenzierung sowie durch Vergleich der aufgetrennten Banden mit den in zweiten Geldimensionen erkennbaren Untereinheiten der Proteinkomplexe wurde deutlich, daß der aufgereinigte Cytochrom c Reduktase-Komplex durch einige Untereinheiten der F₀F₁-ATP-Synthase verunreinigt ist. Diese läuft in Blau-Nativen Gelen auf fast identischer Höhe mit der Cytochrom c Reduktase.

In Tricin-SDS-Gelen liegt das apparente Molekulargewicht des Core I-Protein bei 53 kDa. Auf nahezu identischer Höhe ist die Bande für das Core II. Dies geht aus Silbergefärbten Gelen hervor, in denen die 53 kDa-Bande als Doppelbande sichtbar ist. Der obere Bandenbereich besitzt eine für Core II-Banden in Silbergelen typische braune Farbe, wohingegen der untere Bandenbereich, wie für Core I-Banden typisch, rotbraun ist.

Die apparenten molekularen Massen von Cytochrom c₁ und dem Eisen-Schwefel-Protein liegen, wie durch Immunfärbung und N-terminale Sequenzierung der Untereinheiten gezeigt werden konnte, bei 30 kDa bzw. 26 kDa. Neben einem 14 kDa großen Protein sind noch zwei weitere Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht unter 10 kDa Bestandteile der Cytochrom c Reduktase von *P. bifurcatum*.

Cytochrom b konnte nicht auf Gelen identifiziert werden. Da Cytochrom b jedoch im Kern des Komplexes liegt und deshalb ein Dissoziieren dieser Untereinheit ausgeschlossen werden kann, ist nicht anzunehmen, daß es im aufgereinigten Cytochrom c Reduktase-Komplex fehlt (Bechmann et al., 1992; Iwata et al., 1998). Für das Vorhandensein von Cytochrom b spricht außerdem, daß der isolierte Komplex als intaktes Dimer vorzuliegen scheint. Das Phänomen,

daß Cytochrom b, möglicherweise auf Grund seiner starken Hydrophobizität, nur als sehr diffuse Bande in Gelen visualisiert werden kann, wurde zudem bereits für die Cytochrom c Reduktasen von anderen Organismen beschrieben (Priest & Hajduk, 1992; Braun & Schmitz, 1993; Braun et al., 1995).

Die Cytochrom c Reduktase aus E. arvensis

Die Cytochrom c Reduktase aus *E. arvensis* konnte in sehr reiner Form isoliert werden. Sie besitzt in Blau-Nativen Gelen ein apparentes Molekulargewicht von ca. 500 kDa und liegt demnach als dimerer Komplex vor.

Nach der Auftrennung der Cytochrom c Reduktase in Tricin-SDS-Gelen (Abb. 11) können 10 Untereinheiten, deren apparente Molekulargewichte bei 53 kDa, 36 kDa, 32 kDa, 26 kDa, 14 kDa und unter 10 kDa liegen, identifiziert werden. Die beiden Core-Proteine besitzen ein apparentes Molekulargewicht von 53 kDa und sind durch ihre unterschiedliche Färbung in Silber-gefärbten Gelen zu erkennen (Core II: braun, Core I: rotbraun). Die drei respiratorischen Untereinheiten Cytochrom b, Cytochrom c₁ und das Eisen-Schwefel-Protein werden, wie durch Immunfärbung und N-terminale Sequenzierung gezeigt wurde, durch die Banden bei 36 kDa, 32 kDa und 26 kDa repräsentiert. Das ‚14-kDa Protein‘ hat ein apparentes Molekulargewicht von 15 kDa. Von den vier kleinen Untereinheiten der Cytochrom c Reduktase wurde das zweitkleinste als Homologes zum *qcr8*-Genprodukt von Hefe identifiziert.

Die Cytochrom c Reduktase von Polytomella spp.

In hoch reiner Form wurde auch die Cytochrom c Reduktase von *Polytomella* spp. isoliert. In Silber-gefärbten Tricin-SDS-Gelen wurden neun verschiedene Untereinheiten visualisiert (Abb. 11). Core I wird durch eine Bande bei 53 kDa repräsentiert. Das apparente Molekulargewicht von Core II liegt bei 49 kDa. Die 32 kDa Banden entsprechen Cytochrom b und Cytochrom c₁, wobei Cytochrom b eine relativ diffuse Bande wenig oberhalb der Cytochrom c₁-Bande bildet. Als Banden in Tricin-SDS-Gelen wurden außerdem die 14 kDa Untereinheit und drei weitere Untereinheiten unter 12 kDa visualisiert. Die Untereinheitenkomposition der Cytochrom c Reduktase von *Polytomella* spp. wurde zuvor bereits von Gutiérrez-Cirlos et al. (1994) beschrieben. Die Identifizierung der Untereinheiten erfolgte dabei durch direkte

Proteinsequenzierung bzw. durch Immunfärbung. Gutiérrez-Cirlos et al. (1994) haben eine weitere Untereinheit mit einem apparenten Molekulargewicht unter 12 kDa beschrieben.

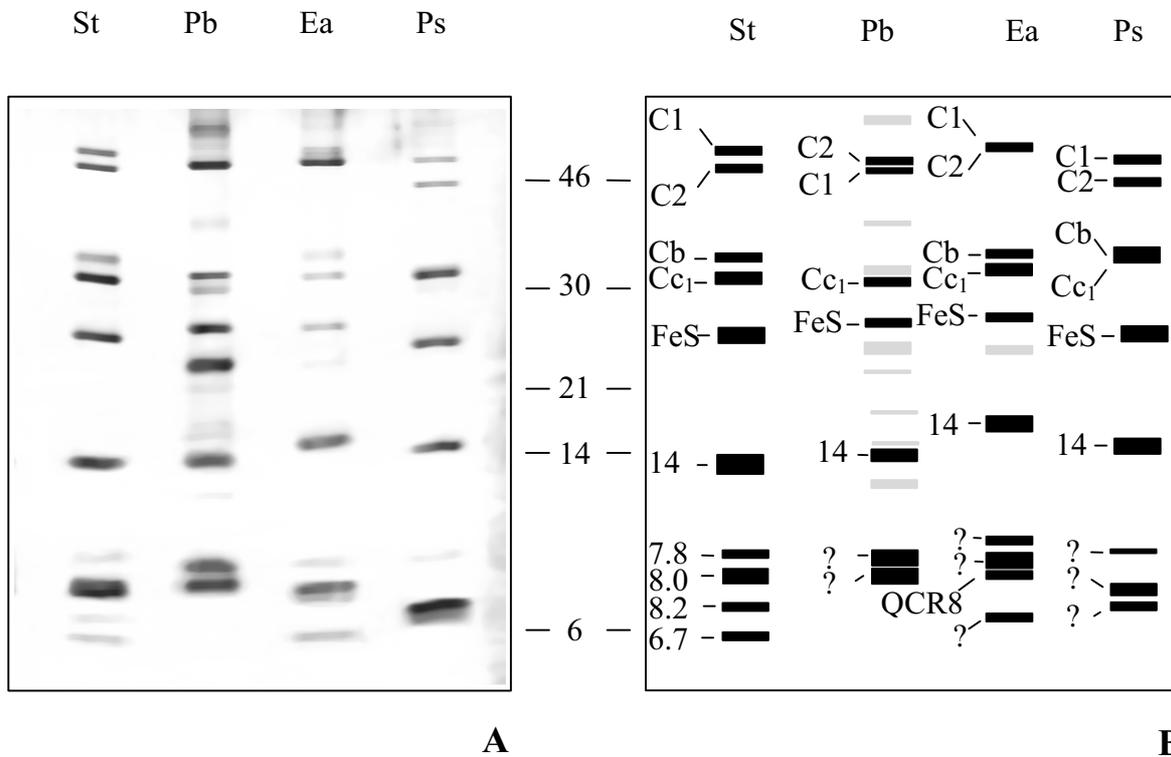


Abbildung 11: Tricine-SDS-PAGE der Cytochrom c Reduktase-Komplexe von *S. tuberosum* (St), *P. bifurcatum* (Pb), *E. arvense* (Ea) und *Polytomella* spp. (Ps) (A). Alle vier Proteinkomplexe wurden wie im Methodenteil beschrieben über BN-PAGE und Elektroelution isoliert. Das Gel wurde Silber-gefärbt. Ein Schema des Gels ist rechts gezeigt (B). Die Molekulargewichte von Standardproteinen sind in kDa in der Mitte angegeben. C1, Core I; C2, Core II; Cb, Cytochrom b; Cc₁, Cytochrom c₁; FeS, Eisen-Schwefel-Protein; QCR8, zum *qcr8* Genprodukt von Hefe homologes Protein. Die Zahlen repräsentieren kleine Untereinheiten und ihre kalkulierten Molekulargewichte in kDa. ? steht für nicht eindeutig identifizierbare Untereinheiten. Die im Schema grau wiedergegebenen Banden kennzeichnen Kontaminationen der Cytochrom c Reduktasen. Die 8 kDa Untereinheit der Cytochrom c Reduktase aus Kartoffel erscheint in diesem Gel aus unbekanntem Gründen als Doppelbande.

1.5 Die Prozessierungsaktivitäten der gereinigten Cytochrom c Reduktasen

Die Cytochrom c Reduktase von *S. tuberosum* ist eine hochaktive Prozessierungsprotease (Braun et al., 1992).

Um zu überprüfen, ob die gereinigten Cytochrom c Reduktasen von *P. bifurcatum*, *E. arvense* und *Polytomella* spp. ebenfalls eine spezifische Prozessierungsaktivität besitzen, wurden *in vitro* Prozessierungsenzymtests durchgeführt. Als Substrate dienten zwei mitochondriale Vorläuferproteine, die in Gegenwart von ³⁵S-Methionin synthetisiert wurden: die β-Untereinheit des ATP-Synthase-Komplex von *Nicotiana tabacum* und das FeS-Protein von *Solanum*

tuberosum. Beide Vorläuferproteine werden durch die Cytochrom c Reduktase von *Solanum tuberosum* in ihre reifen Formen umgesetzt. Die Cytochrom c Reduktase/Prozessierungsprotease von Kartoffel ist eine Metallopeptidase, die durch Zusatz des Metall-Chelators EDTA gehemmt wird (Abb. 12, Spuren 2). Für die Cytochrom c Reduktasen aus *P. bifurcatum* und *E. arvense* konnte nachgewiesen werden, daß sie ebenfalls in der Lage sind, die beiden mitochondrialen Vorläuferproteine in ihre reifen Formen umzusetzen. Die Hemmbarkeit der Reaktionen durch Zugabe von EDTA verdeutlicht, daß es sich hierbei um spezifische Reaktionen von Metallopeptidasen handelt (Abb. 12, Spuren 3-6). Die Cytochrom c Reduktase von *Polytomella* spp. besitzt keine meßbare Prozessierungsaktivität (Abb.12, Spur 7).

Daraus kann geschlußfolgert werden, daß die Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsproteasen von *P. bifurcatum* und *E. arvense* ebenso wie diejenigen von bisher daraufhin untersuchten höheren Pflanzen als Core-Proteine in die Cytochrom c Reduktase integriert sind (Braun et al., 1992; Emmermann et al., 1992; Braun et al., 1993; Eriksson et al., 1994; Glaser et al., 1994; Braun et al., 1995; Braun & Schmitz, 1995c). Die Untereinheiten der Prozessierungsprotease von *Polytomella* spp. hingegen sind entweder beide nicht oder nur eine der beiden Untereinheiten nicht in den Cytochrom c Reduktase-Komplex integriert.

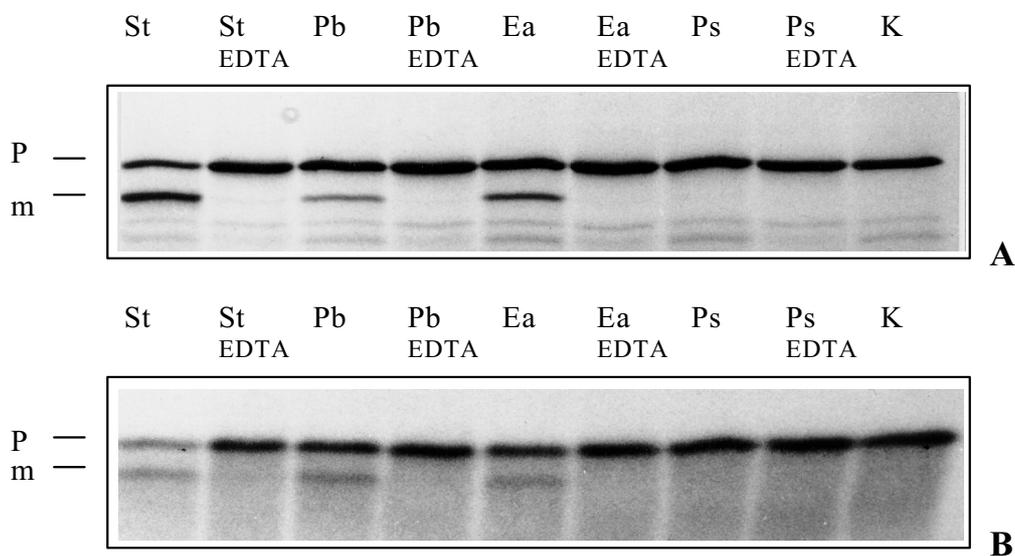


Abbildung 12: Die Prozessierungsaktivität der isolierten Cytochrom c Reduktasen von *S. tuberosum* (St), *P. bifurcatum* (Pb), *E. arvense* (Ea) und *Polytomella* spp. (Ps). Das Vorläuferprotein der β -Untereinheit des F_1 -Teils der ATP-Synthase von *Nicotiana tabacum* (A) und das Vorläuferprotein des FeS-Proteins von *S. tuberosum* (B) wurden *in vitro* in Gegenwart von ^{35}S -Methionin synthetisiert und mit den isolierten Cytochrom c Reduktasen mit oder ohne Zusatz von EDTA inkubiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden anschließend über SDS-PAGE aufgetrennt und danach durch Fluorographie sichtbar gemacht. K, Kontrolle; p, Precursor oder Vorläuferprotein; m, reife Form des Proteins.

2. Untersuchungen zur Co-Evolution der Cytochrom c Reduktase und der mitochondrialen Prozessierungsprotease am Modellorganismus *Neurospora crassa*

Wenn die Core-Proteine der Cytochrom c Reduktase evolutionäre Relikte der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease sind und es möglich ist, die für die Prozessierungsaktivität erforderlichen strukturellen Eigenschaften wieder in die nicht aktiven Core-Proteine zu integrieren, sollten die Prozessierungsaktivitäten der Cytochrom c Reduktasen von *Neurospora crassa*, *Saccharomyces cerevisiae* oder Säugern rekonstituierbar sein. Ausgehend von dieser Hypothese wurde versucht, *Neurospora crassa*-Transformanten mit zur Prozessierung fähigen Cytochrom c Reduktasen zu erzeugen. Dieser von der Isolation und gezielten Veränderung der *core II*-cDNA von *Neurospora crassa* ausgehende Versuch wird im folgenden Kapitel beschrieben. Außerdem wurde *in vitro* überprüft, ob das Core II-Protein und das veränderte Core II in Lösung Dimere mit der β -MPP-Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungsprotease bilden.

2.1 Isolation der cDNA des *core II* aus *Neurospora crassa*

Zur Isolation der cDNA des *core II* von *Neurospora crassa* wurde die von Orbach, Sachs und Yanofsky (1990) konstruierte cDNA-Bank, welche die myceliale mRNA des *N. crassa* Wild-Typ-Stammes 74-OR23-1VA repräsentiert, mit einem degenerierten Oligonukleotid gescreent. Die Sequenz des degenerierten Oligonukleotids (COREIIN: 5' DIG-TTRAARAANggYTCNACCCAYTT 3') wurde mit Hilfe des Programmes PROBE der PC-Gene-Software aus einer bekannten Peptidsequenz des Core II (K W V E P F F K) abgeleitet. Das Screening der cDNA-Bank führte zur Isolation eines positiven Klonen. Das Insert dieses Klons wurde nach der *in vivo* Excision durch Restriktion mit *EcoRI* aus dem Plasmid pBluescript SK- erhalten und seine Größe wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung im Agarose-Gel mit 1,8 kbp bestimmt (Daten nicht gezeigt). Das dieses Insert enthaltende Plasmid wurde mit CpBluescript bezeichnet.

Die Sequenzanalyse ergab eine genaue Insertgröße von 1801 bp (Abb. 13). Der offene Leserahmen mit einer Größe von 1362 bp wird von dem Startcodon ATG und dem Stopcodon TAG begrenzt. Am Ende des 3'-nichtcodogenen Bereichs liegt ein kurzer polyadenylierter Sequenzabschnitt. Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Aminosäuresequenz hat eine Länge von 454 Aminosäureresten. Der Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz mit der bereits bekannten Aminosäuresequenz am N-Terminus des reifen Core II und mit einer durch

direkte Sequenzierung ermittelten Peptidsequenz des Core II bestätigt, daß der isolierte cDNA-Klon die mRNA für das Core II von *Neurospora crassa* repräsentiert. Auf Grund der vorliegenden Daten kann davon ausgegangen werden, daß der isolierte cDNA-Klon vollständig ist. Das aus der Aminosäuresequenz kalkulierte Molekulargewicht des Core II beträgt 46939 Da, das kalkulierte Molekulargewicht des nativen Proteins beträgt 43930 Da. In Tricine-SDS-Gelen liegt das apparente Molekulargewicht des reifen Core II bei ca. 45 kDa. Der theoretische isoelektrische Punkt des reifen Proteins liegt bei pH 6,89.

CCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCCCTCCCAAGCAGTGCTCGCT	60
↑	
GCGCAATCATCTAGAACC GTCAATTGGACGACATCGACCCCTCCAACCATGATCTCCCGA	120
M I S R	4
TCGGCTCTCCTGAGGGGAAGCCAGCTGGCCCTTCGCCGCCGGCGCTGCGAAGACGGCC	180
S A L L R G S Q L A L R R P A A A K T A	24
CAGCGCGGCTTTGCTGCTGCTGCTGCTTCTCCCGCGGCGTCATACGAACCCACCACCATC	240
Q R G F A A A A A S P A A S Y E P T T I	44
GCCGGCGTCAAGGTTGCCTCGCGCGACGACTCCGGCCCCGACCACCCGCCTCGCCGGCGTC	300
A G V K V A S R D D S G P T T R L A G V	64
GCAAAGGCCGGTACCCGTTACGAGCCCCTTGCCGGTCTGACCGTCGGTCTGGAGGAGTTT	360
A K A G T R Y E P L A G L T V G L E E F	84
GCGTTCAAGAACACCAACAAGAGAACCGCCCTCCGCATCACCCGCGAGTCCGAGCTCCTC	420
A F K N T N K R T A L R I T R E S E L L	104
GGCGCCAATTGCAGGCCTACCACACGCGAGGCCGTCGTCCTCCAGGCCTCCTTCCTC	480
G G Q L Q A Y H T R E A V V L Q A S F L	124
CGCGAGGACCTCCCCTACTTCACCGAGCTCCTTGCCGAGGTCATCTCTGAGACCAAGTAC	540
R E D L P Y F T E L L A E V I S E T K Y	144
ACCACCCACGAGTTCCACGAGCTCGTTCGAGAAGTGCATCCACGAGAAGCAGGCCAAGCTC	600
T T H E F H E L V E N C I H E K Q A K L	164
GACTCTGCCGCCATCGCCCTCGATGCCGCCACAACGTCGCCTTCCACAGCGGCCTCGGT	660
D S A A I A L D A A H N V A F H S G L G	184
TCTCCCCTCTACCCTACCGTCGACACCCCTACCTCGTCCTACCTCAACGAGAACTCGGTC	720
S P L Y P T V D T P T S S Y L N E N S V	204
GCCGCCTTCGCCAACCTCGCCTACAACAAGGCCAACATCGCCGTTGTCGCCGATGGTGCC	780
A A F A N L A Y N K A N I A V V A D G A	224
AGCCAGGCCGGTCTCGAGAAGTGGGTTGAGCCCTTCTTCAAGGGTGTTCCCGCCACCAGC	840
S Q A G L E K W V E P F F K G V P A T S	244
TCCGGCAACCTGAACACTGCCGCCTCCAAGTACTTTGGTGGTGAGCAGCGGTTGCCAAG	900
S G N L N T A A S K Y F G G E Q R V A K	264
AACGGCAAGAACGCCATCGTCATTGCCTTCCCCGGTGCTTCCCTTGCGTCCCCACCCC	960
N G K N A I V I A F P G A S L G V P H P	284

GAGACTTCCGTCCTCGTCGGTCTCCTCGGCGGTGTCTCCAACATCAAGTGGTCCCCGGT	1020
E T S V L V G L L G G V S N I K W S P G	304
TTCAGCCTCCTCGCCAAGGCCACCGCCGCAACCCCGGCGCCGAGGCCTTTGCTCACAAC	1080
F S L L A K A T A A N P G A E A F A H N	324
TACGCCTACTCCGATGCTGGTCTCCTCGCCATCCAGATCACCGGCAAGGGTGCCGCCGTC	1140
Y A Y S D A G L L A I Q I T G K G A A V	344
GGCAAGGTCGCCGTCGAGGCCGTCAAGGGTCTCAAGGCCATCGCTGCCGGTGGTGTCTCC	1200
G K V A V E A V K G L K A I A A G G V S	364
AAGGAGGACCTCACCAAGGCTATCGCCAAGGCCAAGTTCAACCTCCTCTCCGCCAGCGAG	1260
K E D L T K A I A K A K F N L L S A S E	384
GTTTCCGGCACTGGCCTCGTCCACGCCGGTGCCAACCTTCTTGCCGGTGGCAAGCCCATC	1320
V S G T G L V H A G A N L L A G G K P I	404
CAGGTTGCCGAGACCCTCAAGGCTCTTGAGGGCGTTACCGCTGAGAAGCTCCAGGCTGCT	1380
Q V A E T L K A L E G V T A E K L Q A A	424
GCCAAGAAGCTCCTTGAGGGCAAGGCTTCCGTTTCCGCCGTCGGTGACCTCCACGTCCTT	1440
A K K L L E G K A S V S A V G D L H V L	444
CCCTATGCTGAGGATCTCGGTCTCAAGGTATAGACGTAGACTAGACTTTGGGGGCGCAGA	1500
P Y A E D L G L K V * 454	
GCGGGTTGTGCAATTCGTAGTTAATTGAAAGAGGAAATACCTAAACGCAGCGAAACGAAC	1560
CGATTGAAACTGGAAAGGCGTGATACTTTTTTGAGAAGACGCCAGGGTTGGGAGACAAA	1620
AACCAAAACCGTGTACCAACAGCAAAACCGGCCGGGATGAAGTGTGTTGTAGACCTTTCT	1680
CGTTGTGAAGCGGGAGATGAAGAACGAACGGCTGGGGACCGACGACTTTTTGTGCATATA	1740
CAAACCTCTAGACTTTTTATCATTCTCGCCACTACTTCTCTAGCAGAGCTATAAAACAC	1800
AAAATGCAGCAGGCATTATTTCTTTTGTGAAAAAAAAAAGGAATTCGATATCAAGCTTA	1860
	↑
TCGATACCGTCGACCTCGAGGGGG	1884

Abbildung 13 (diese und vorherige Seite): Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Core II von *Neurospora crassa* (Accession-Nr.: E286572). Die Pfeile markieren den Beginn bzw. das Ende der Insertsequenz. Grau unterlegt ist die Leitsequenz des Core II. Schwarz unterlegt sind die durch direkte Aminosäuresequenzierung bekannte N-terminale Sequenz des reifen Proteins und die Peptidsequenz, aus welcher die Sequenz des degenerierten Oligonukleotids abgeleitet wurde.

2.2 Genomische Kartierung des *core II*-Gens von *Neurospora crassa*

Zur Bestimmung der Lage des *core II*-Gens im Genom von *N. crassa* wurde ein mit einer *core II*-Sonde detektierbarer RFLP (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus) kartiert. Als *core II*-Sonde (COBP) diente ein 950 bp langes, ‚random primed‘ markiertes, durch

Restriktion des Plasmides CpBluescript mit *Bam*HI und *Psh*AI entstandenes *core II*-Fragment. Zur Kartierung wurde die von Metzenberg et al. (1984) erstellte Kartierungspopulation, die eine Kreuzungsnachkommenschaft von Eltern entfernter Verwandtschaft darstellt (Oak Ridge Laborstamm und Mauriceville Wild-Isolat), verwendet. In Southern Blot Untersuchungen wurde für die mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV geschnittene genomische DNA der Elternstämme ein Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus detektiert. Dieser wurde genutzt, um festzustellen, von welchem der Eltern jeweils das *core II* auf die Nachkommen übertragen wurde (Abb. 14).

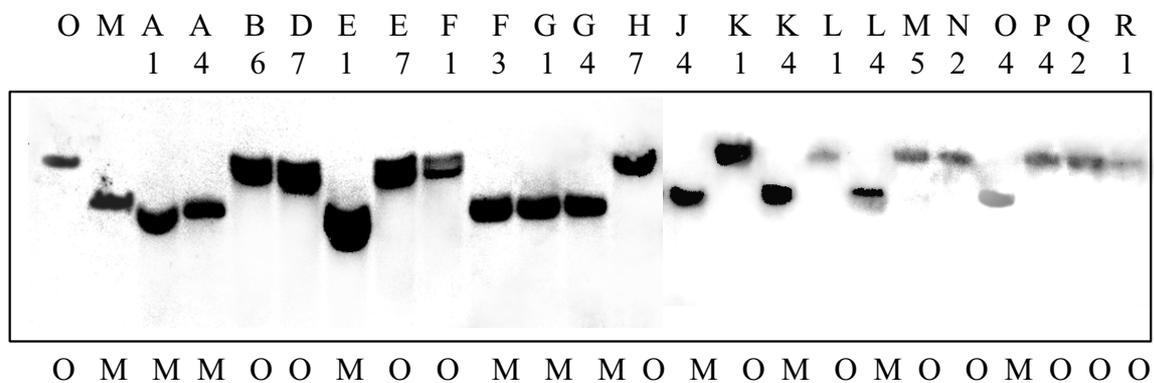


Abbildung 14: RFLP-Untersuchung der Kartierungspopulation. Die genomische DNA wurde mit *Eco*RV restringiert und zur Southern Blot Analyse mit der aus dem Plasmid CpBlueskript erstellten *core II*-Sonde, COBP, hybridisiert. Oberhalb des Blots ist die Bezeichnung des Individuums nach Metzenberg et al. (1984) angegeben, bzw. bezeichnen O und M jeweils einen Elternstamm (Oak Ridge und Mauriceville). Unter dem Blot steht der RFLP-Genotyp, wobei O (Oak Ridge) und M (Mauriceville) die Bezeichnungen der elterlichen Genotypen wiedergeben.

Die Aufspaltung dieses RFLP-Genotyps wurde mit der Aufspaltung von bereits kartierten Genen in der untersuchten Population verglichen (Abb.15). Der Vergleich zeigt, daß der *core II*-RFLP auf der Kopplungsgruppe II in der Umgebung des Telomers ,*Tel III*, und des *hsp*s-1 lokalisiert ist.

Marker	Individuen																						
	A	A	B	D	E	E	F	F	G	G	H	J	K	K	L	L	M	N		O	P	Q	R
	1	4	6	7	1	7	1	3	1	4	7	4	1	4	1	4	5	2		4	4	2	1
<i>Tel III</i>	M	M	O	O	M	-	O	M	M	O	O	M	O	M	O	M	O	O	M	O	O	O	9,0 %
<i>Core II</i>	M	M	O	O	M	O	O	M	M	M	O	M	O	M	O	M	O	O	M	O	O	O	
<i>hsps-1</i>	M	M	O	O	M	O	O	M	M	O	O	M	O	M	O	M	O	O	M	O	O	O	4,5 %
<i>00008</i>	-	-	O	O	M	O	O	O	M	O	O	M	O	M	O	M	M	O	O	O	M	O	25,0 %
<i>pSK2-1A</i>	O	M	O	O	M	O	O	O	M	O	O	M	O	M	O	M	M	O	M	O	M	O	22,7 %
<i>3:9A</i>	O	M	O	O	M	O	O	O	M	O	M	M	O	M	O	-	M	O	M	O	M	O	28,6 %
<i>Fsr-52</i>	O	M	O	O	M	O	O	O	M	M	M	O	M	O	M	M	O	M	O	M	O	M	22,7 %

Abbildung 15: RFLP-Kartierung des *core II* Polymorphismus mit Hilfe der Kartierungspopulation von Metzberg et al. (1984, 1995). Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der Kopplungsgruppe II mit dem kartierten molekularen Marker *core II* und benachbarten molekularen Markern. Die %-Zahlen geben den Austauschwert zum molekularen Marker *core II* an (Zahl der Austausche/Zahl der untersuchten Stämme).

2.3 *In vitro* Mutagenese der *core II*-cDNA von *Neurospora crassa* – Konstruktion einer chimären cDNA aus *core II* und α -mpp

Alpha-MPP-Sequenzen besitzen, wie bereits einleitend beschrieben, ein hochkonserviertes hydrophobes 20 Aminosäurereste langes Sequenzmotiv im C-terminalen Bereich (Brunner et al., 1994; Braun und Schmitz, 1995b). Um die Bedeutung dieser hydrophoben Domäne zu überprüfen, wurde ein chimärer Klon aus dem *core II* von *Neurospora crassa* und einem Sequenzabschnitt des α -mpp-Gens aus *Solanum tuberosum*, der für die hochkonservierte hydrophobe Domäne kodiert, erzeugt. Damit sollte eine Veränderung in das Core II eingeführt werden, die es möglicherweise befähigt, die Funktion des α -MPP bei der Prozessierung von Vorläuferproteinen teilweise oder vollständig zu übernehmen. Ziel war die Rekonstitution der Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase von *Neurospora crassa*.

Es mußte an dieser Stelle auf das α -mpp von *Solanum tuberosum* zurückgegriffen werden, da das α -mpp von *Neurospora crassa* zu diesem Zeitpunkt nicht verfügbar war.

Der Bereich für den Sequenzaustausch wurde mit Hilfe eines multiplen Alignments von Core II- und α -MPP-Sequenzen festgelegt (Abb. 16).

Auf der Basis dieses Sequenzvergleichs wurde ein 91 bp langes Fragment mit den Restriktionsenzymem *PshAI* und *NarI* aus dem Plasmid CpBluescript ausgeschnitten. Der für den hydrophoben Sequenzabschnitt des α -MPP von *S. tuberosum* kodierende Bereich wurde unter Einführung der Restriktionsschnittstellen *PshAI* und *NarI* mittels PCR aus der α -mpp-cDNA amplifiziert. Das Amplifikat wurde gerichtet anstelle des ausgeschnittenen 91 bp Fragments inkloniert (Abb. 17), wobei das Plasmid MpBluescript entstand.

```

aMPP Nc : SDDDIYALATLQTLGGGGFSFAGGPGKGMYSRLYTNVLNQHWVESVA : 418
aMPP Sc : DHPDIYALATLQTLGGGGFSFAGGPGKGMYSRLYTHVLNQYYFVENCVA : 318
aMpp Hs : LEEDFIPFAVLNMMMGGGGFSFAGGPGKGMFSRLYLNVLNRHHWMYNATS : 382
aMPP Rn : LEEDFIPFAVLNMMMGGGGFSFAGGPGKGMFSRLYLNVLNRHHWMYNATS : 378
aMPP St : SEKESMTLTVLQMLMGGGGFSFAGGPGKGMYSRLYLRVLNQYPIHAFSA : 368
Core2 Hs : GSAEANAFSVLQHVLGAGPHVKRGS---NTTSHLHQAVAKATQQPFVDSA : 325
Core2 Bpt : GSAEANAFSVLQHVLGAGPHVKRGS---NATSSLYQAVAKGVHQPFVDSA : 325
Core2 Rn : GNAEANAFSVLQHLLGAGPHIKRGN---NTTSLLSQSVAKGSQQPFVDSA : 324
Core2 Nc : PHP---ETSVLVGLLGGVSNIKWSP-----GFSLLAKATAANPGAEAF : 322
    
```

Abbildung 16: Ausschnitt aus einem multiplen Alignment von Core II- und α -MPP-Sequenzen. Die Pfeile schließen den Bereich ein, der für den Sequenzaustausch vorgesehen war. aMPP, α -MPP; Core2, Core II; Nc, *Neurospora crassa*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; Hs, *Homo sapiens*; Bpt, *Bos prigenius taurus*; St, *Solanum tuberosum*. Aminosäurepositionen, die in mindestens fünf der aufgeführten Eiweiße konserviert sind, sind grau unterlegt.

Im Resultat wurde ein Sequenzabschnitt von 84 bp aus der *core II*-cDNA durch einen Sequenzabschnitt von 102 bp der *α -mpp*-cDNA substituiert. Die aus dem offenen Leserahmen der chimären cDNA abgeleitete Aminosäuresequenz ist damit um 6 Aminosäurereste länger als die Aminosäuresequenz des Core II.

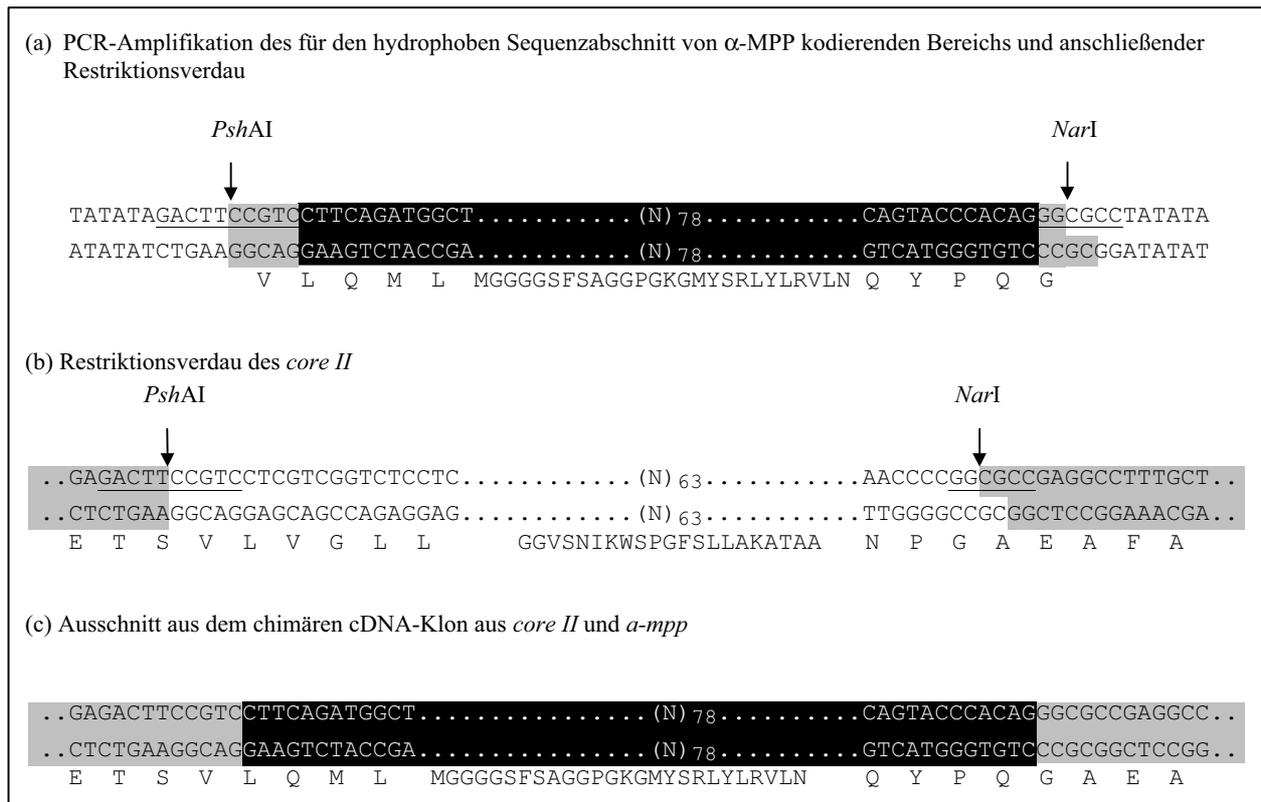


Abbildung 17: Strategie zur Einführung der hochkonservierten hydrophoben Domäne des α -MPPs aus *Solanum tuberosum* in das Core II von *Neurospora crassa*. Grau unterlegt sind Nukleotidsequenzen, die ursprünglich vom *core II* aus *N. crassa* stammen. Schwarz unterlegt sind Nukleotidsequenzen, die ursprünglich vom *α -mpp* aus *S. tuberosum* stammen. Die Pfeile weisen auf die zur Klonierung genutzten Restriktionschnittstellen.

Das kalkulierte Molekulargewicht des so veränderten Core II ist mit 47792 Da um 853 Da höher als das des ursprünglichen Proteins. Der berechnete isoelektrische Punkt des reifen veränderten Proteins liegt bei pH 7,33 etwas höher als der des authentischen Core II.

Berechnet man einen Stammbaum aus den Aminosäuresequenzen ausgewählter Core II-Proteine, des veränderten Core II-Proteins und ausgewählter α -MPPs, so wird das gezielt veränderte Core II dem Ast der α -MPPs zugeordnet (Abb. 18).

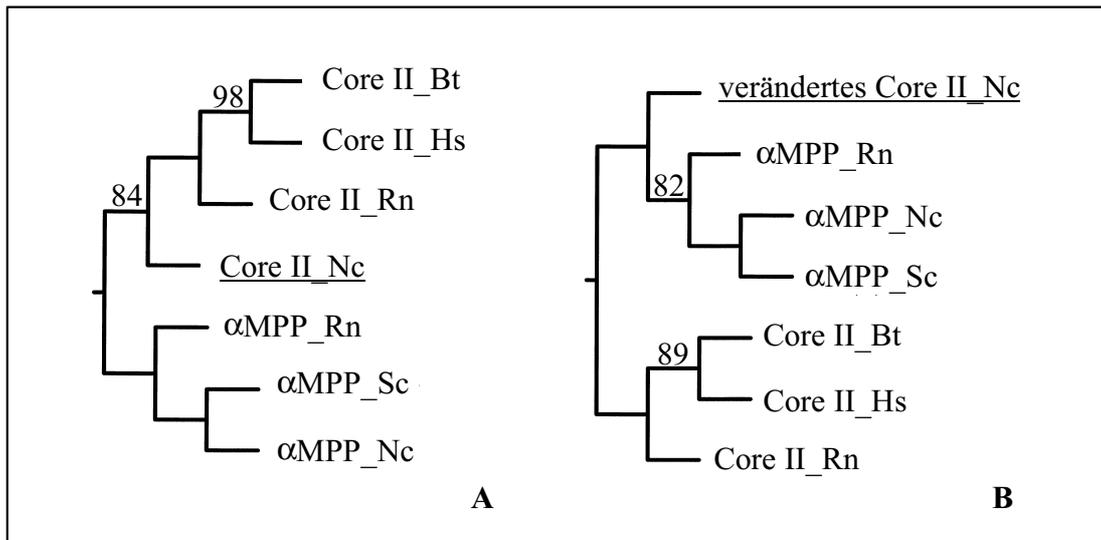


Abbildung 18: Stammbäume für α MPP- und Core II-Proteine aus verschiedenen Organismen mit authentischem Core II von *Neurospora crassa* (A) bzw. verändertem Core II von *Neurospora crassa* (B). *Neurospora crassa* (Nc), *Bos taurus* (Bt), *Homo sapiens* (Hs), *Rattus norvegicus* (Rn), *Saccharomyces cerevisiae* (Sc). Die zur Stammbaumberechnung genutzten multiplen Alignments (nicht gezeigt) wurden mit dem Programm PILEUP des GCG-Softwarepaketes (gap creation penalty: 6; Gap extension penalty 3) erstellt. Die Stammbäume wurden wie im Methodenteil beschrieben mit Programmen der Phylip-Software berechnet. Die Nummern im Stammbaum geben die Häufigkeit an, mit der die Verzweigung in 100 analysierten Stammbäumen errechnet wurde. Verzweigungen ohne Nummerierung sind in 100 von 100 Fällen errechnet worden.

2.4 Erzeugung von *N. crassa* Transformanten mit einer chimären cDNA aus *core II* und *α -mpp* und Analyse der Cytochrom c Reduktasen transformierter Stämme hinsichtlich einer rekonstituierten Prozessierungsaktivität

Core I und Core II besitzen, wie aus Deletionsversuchen bekannt ist, für die Assemblierung des Cytochrom c Reduktase-Komplexes von *Saccharomyces cerevisiae* eine essentielle Funktion (Tzagoloff et al., 1986; Oudshoorn et al., 1987; Gatti & Tzagoloff, 1990). Vermutlich sind die Core-Untereinheiten für *Neurospora crassa* essentiell. Eine Gendisruption des

core II mit nachfolgender Komplementation durch das veränderte *core II* konnte aus diesem Grund nicht durchgeführt werden.

Im wesentlichen standen zur Erzeugung von *N. crassa*-Stämmen mit in das Genom integriertem veränderten *core II* zwei Möglichkeiten zur Verfügung.

Eine Möglichkeit bestand in der Erzeugung von homokaryotischen Transformanten, welche das veränderte *core II* zusätzlich zum originalen *core II* ektopisch in das Genom integriert haben. Dies hätte im Fall, daß das veränderte Core II das originale Core II komplementieren kann zur Folge, daß aus einer Transformante Cytochrom c Reduktasen mit sowohl verändertem als auch authentischem Core II isoliert werden können. Untersuchungen zur Rekonstitution der Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase können somit zu aussagekräftigen Ergebnissen führen.

Eine zweite Möglichkeit besteht in der Anwendung einer von Metzenberg und Grotelueschen (1992) beschriebenen Methode. Dabei werden speziell zur Analyse von Letalallelen erstellte Stämme transformiert und danach Ascosporen, die sowohl eine normale Kopie als auch eine durch das sogenannte RIP-Phänomen (Repeat-Induced Point Mutation) disruptierte Kopie des entsprechenden Genes enthalten, hergestellt (Selker, 1990). Realisiert wird dies durch einen Meiosedefekt (*mei-2*) der Stämme, welcher zur Erzeugung von disomischen Zellkernen ausgenutzt wird. Diese besitzen das Chromosom, auf dem das Zielgen lokalisiert ist, zweimal (Schroeder & Raju, 1991). Nach einer Transformation der disomischen Stämme mit entsprechenden Plasmiden und der Komplementation des Zielgens über ektopischen Einbau kann das Chromosom mit der normalen Kopie unter bestimmten Selektionsbedingungen verloren gehen. Mit der Kartierung des *core II*-Gens im Genom von *N. crassa* ist bereits eine wichtige Voraussetzung zur Anwendung dieser Methode erfüllt. Zunächst wurde sie jedoch zurückgestellt.

Erzeugung homokaryotischer Transformanten

Zur Einklonierung des veränderten und als Kontrolle des nicht veränderten *core II* wurde der Expressionsvektor pBARMTE1 gewählt (Pall, 1993; Pall & Brunelli, 1993). Der Vektor enthält das bakterielle Basta-Resistenzgen (*bar*) und vermittelt Resistenz der *N. crassa*-Transformanten gegen Basta und Bialophos bzw. Phosphinothricin (Avalos et al., 1989; Straubinger et al., 1992). Zur einfacheren Handhabung in *E. coli*-Stämmen verfügt er über ein Ampicillin-Resistenzgen (*amp^r*). Er erlaubt die konstitutive Expression von Genen und cDNAs in *N. crassa* unter der Kontrolle des *mtr* (Methyltryptophan-Resistenz) Promotors von *N. crassa*

ausgehend von ihren eigenen Initiationscodons (Koo & Stuart, 1991). Die cDNAs des *core II* und des veränderten *core II* wurden unter Nutzung der *Bam*HI- und *Eco*RI-Restriktionsschnittstellen aus den Plasmiden CpBluescript und MpBluescript ausgeschnitten und gerichtet in die *Bam*HI- und *Eco*RI-Schnittstellen des pBARMTE1 inkloniert. Die beiden neu entstandenen Vektoren wurden mit CpBARMTE1 und MpBARMTE1 bezeichnet. Das Plasmid MpBARMTE1 sowie die Plasmide CpBARMTE1 und pBARMTE1 als Kontrollen wurden ungeschnitten zur Transformation von *N. crassa* eingesetzt.

Für die Transformation von *N. crassa* werden aus Konidien generierte Sphäroplasten eingesetzt. Diese können ein- bis neun-kernig sein, wobei sie in der Mehrzahl zwei bis dreikernig sind (Tateson, 1972). Da bei der Transformation nicht alle Kerne DNA aufnehmen und die transformierte DNA in jeden Kern individuell integriert wird, wachsen transformierte Sphäroplasten in der Regel zu Heterokaryen aus. Um nicht mit undefinierten Heterokaryen sondern mit genetisch homogenen Stämmen zu arbeiten, wurden über einkernige Mikrokonidien homokaryotische Nachkommen isoliert. Gleichzeitig wurde damit die Wahrscheinlichkeit für den Einbau der veränderten Core II-Untereinheit in den Cytochrom c Reduktase-Komplex bei den mit dem Plasmid MpBARMTE1 transformierten Stämmen erhöht. Aus den insgesamt 30 potentiell heterokaryotischen Originaltransformanten wurden 16 homokaryotische Transformanten erzeugt, welche die Selektionsmarke der Vektoren stabil integriert hatten. Acht homokaryotische Stämme (M1-M8) wurden aus den mit MpBARMTE1 transformierten Originaltransformanten, fünf homokaryotische Transformanten (C1-C5) wurden aus den mit CpBARMTE1 transformierten Originaltransformanten und 3 homokaryotische Transformanten (O1-O3) wurden aus den mit pBARMTE1 transformierten Originaltransformanten isoliert. Alle weiteren Untersuchungen wurden an den homokaryotischen Transformanten durchgeführt.

Der Phänotyp der Transformanten

Durch die Eintransformation des *core II* und des veränderten *core II* ist, kein zusätzlicher zum erwünschten Effekt auf den Phänotyp zu erwarten. Da in *N. crassa* eintransformierten Sequenzen aber vorwiegend ektopisch in das Genom integriert werden, können durch die zufällige Integration andere Gene zerstört werden. Sind davon essentielle Gene betroffen, können aus den betroffenen letalen Kernen keine homokaryotischen Transformanten regeneriert werden. Im Fall das nicht essentielle Gene betroffen sind, kann es zur Ausbildung veränderter Phänotypen kommen. Ebenfalls nicht auszuschließen ist, daß die eintransformierte Vektor-

DNA den Phänotyp beeinflusst. Um mit vitalen, phänotypisch unauffälligen Stämmen weiter arbeiten zu können, wurden die Stämme auf phänotypische Auffälligkeiten untersucht. Dazu wurde das Wachstum der Transformanten auf Minimalmedium nach Vogels (1964) mit dem des Wildtyps nach Inokulation auf Platten für ca. 24 Stunden beobachtet. Alle Transformanten zeigten einen unauffälligen Phänotyp (nicht gezeigt).

Überprüfung der Transformanten auf Häufigkeit des Einbaus und auf vollständigen Einbau der Expressionskassetten des core II und des veränderten core II

Die Häufigkeit des Einbaus und der vollständige Einbau der transformierten Expressionskassetten (Abb. 19), das heißt der cDNA des *core II* bzw. des veränderten *core II* sowie des *mtr* Promotors und *trpC* Terminators in das Genom der Transformanten wurde durch Southern Blot Analyse überprüft. Als Sonde wurde die bereits zur Kartierung von *core II* eingesetzte Sonde COBP verwendet, welche das *core II* und das veränderte *core II* gleichermaßen gut detektiert.

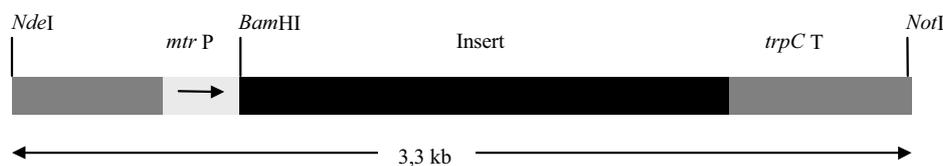


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Expressionskassetten von MpBARMTE1 und CpBARMTE1 einschließlich der angrenzenden Sequenzbereiche. Insert des Vektors MpBARMTE1 ist die cDNA des veränderten *core II*. Insert des Vektors CpBARMTE1 ist die *core II*-cDNA. T, Terminatorsequenz; P, Promotorsequenz.

Bei der mit *Bam*HI restringierten DNA zeigte sich im Southern Blot bei allen Transformanten mindestens eine zusätzliche Bande zur nativen *core II*-Bande (Abb. 20). *Bam*HI schneidet nur einmal in den transformierten Konstrukten. Die zweite Schnittstelle ist vom Einbauort abhängig, was dazu führt, daß verschieden große zusätzliche Banden detektiert werden. Die Zahl der zusätzlichen Signale korreliert deshalb mit der Häufigkeit des Einbaus von Sequenzabschnitten der transformierten DNA, die mit der COBP-Sonde detektierbar sind. Demnach wurde in allen untersuchten Transformanten mindestens ein mit der COBP-Sonde detektierbarer Sequenzabschnitt in das Genom integriert.

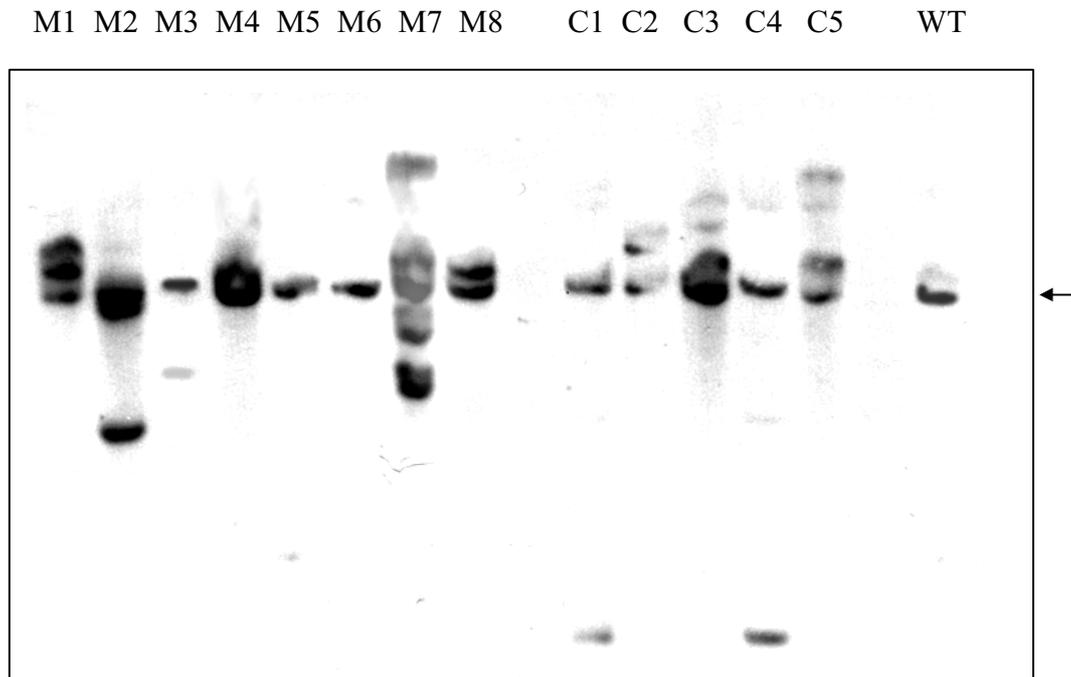


Abbildung 20: Southern Blot Analyse von *Bam*HI restringierter genomischer DNA, isoliert aus den Stämmen M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, C1, C2, C3, C4, C5 und aus dem Wildtyp (WT). *Bam*HI schneidet innerhalb der transformierten Konstrukte nur einmal. Der Pfeil weist auf die durch das native *core II* bedingte Bande. Die eingesetzte *core II*-Sonde COBP wurde ‚random primed‘ markiert.

Nach Restriktion der Plasmide MpBARMTE1 und CpBARMTE1 mit *Nde*I und *Not*I wurden ca. 3,3 kbp große Fragmente im Southern Blot detektiert (Abb. 21). Da die Restriktionsschnittstellen für *Nde*I und *Not*I nur einmal in den Plasmiden vorkommen und die vollständigen Expressionskassetten flankieren, können diese Banden als Marker für den vollständigen Einbau der Expressionskassetten in das Genom der Transformanten dienen. Auf Höhe der Banden wurden bei der mit *Nde*I und *Not*I restringierten genomischen DNA der Stämme M1, M2, M7, M8, C1 und C4 Hybridisierungssignale detektiert (Abb. 21).

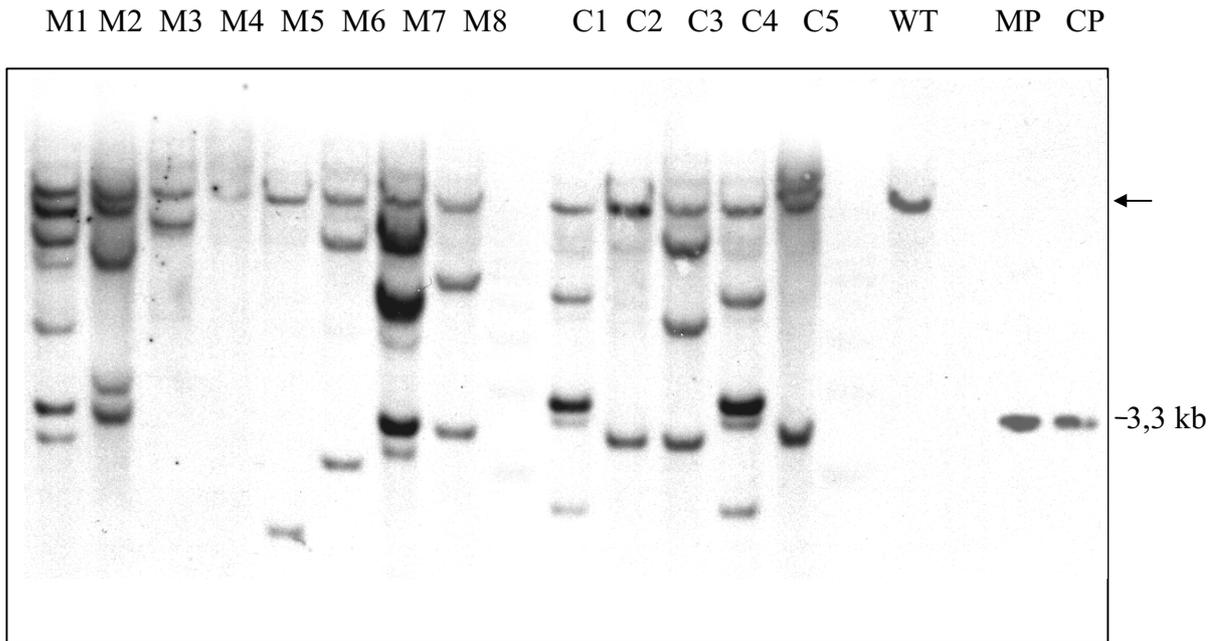


Abbildung 21: Southern Blot Analyse von *NdeI* und *NotI* restringierten Plasmiden MpBARMTE1 (MP) und CpBARMTE1 (CP) und *NdeI* und *NotI* restringierter genomischer DNA, isoliert aus den Stämmen M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, C1, C2, C3, C4, C5 und aus dem Wildtyp (WT). Der Pfeil weist auf die durch das native *core II* bedingte Bande. Die *NdeI* und *NotI* Schnittstellen flankieren die vollständigen Expressionskassetten der Vektoren. Rechts neben dem Blot ist die Größe der durch die *NdeI* und *NotI* Fragmente der Expressionsvektoren bedingten Banden angegeben.

Expression des veränderten core II

Der Nachweis von Transkripten des veränderten *core II* erfolgte über Northern Blot Analyse von Gesamt-RNA. Hierfür wurde eine spezifisch gegen das 102 bp Fragment aus dem α -*mpp* von *Solanum tuberosum* gerichtete Sonde (MCTR) eingesetzt. Die Sonde wurde über zwei PCR-Amplifikationen gewonnen. Dabei wurde das Fragment zunächst mit den Primern PB3 und PB4 amplifiziert. Anschließend erfolgte eine lineare PCR-Amplifikation des nicht codogenen Stranges des ersten Amplifikates mit dem Primer PB4 in Gegenwart von α [³²P]dCTP. Für die Stämme mit der kompletten Expressionskassette des veränderten *core II* (M1, M2, M7 M8) wurden Transkripte nachgewiesen. Durch Vergleich der Position der Banden mit der Lage der ribosomalen RNA konnte die Größe der Transkripte grob geschätzt werden. Bei allen vier Stämmen wurden Transkripte mit einer Größe von 1,3 bis 1,4 kb (Abb. 22) nachgewiesen. Dies entspricht der erwarteten Größe für die mRNA des veränderten *core II*. Bei den Stämmen M1, M2 und M8 wurden zwei nahe beieinander gelegene Banden in diesem Bereich detektiert. Im Stamm M7 wurde ein zusätzliches Transkript mit einer Länge von ca. 1,1 kb

nachgewiesen. Möglicherweise handelt es sich bei den zusätzlichen Banden um Transkripte von unvollständig in das Genom integrierten Expressionskassetten. Erwartungsgemäß ergab die Gesamt-RNA der Stämme C1, C2, C3, C4 und C5 sowie des Wildtyps, welche als Kontrollstämme eingesetzt wurden, keine Hybridisierungssignale. Für die Stämme ohne vollständige Expressionskassette M3, M4, M5 und M6 wurden keine Transkripte mit der MCTR-Sonde nachgewiesen. Als interne Kontrolle wurde der selbe Northern Blot nach einer Regeneration mit der *core II*-Sonde COBP hybridisiert. Dies führte bei allen getesteten Stämmen zum Nachweis von Hybridisierungssignalen, die auf Transkripte mit einer Länge von 1,3 bis 1,4 kb zurückzuführen sind. Das Ergebnis entspricht den Erwartungen, da das *core II* ein konstitutiv exprimiertes Gen sein sollte und die Länge der mRNA ca. 1,4 kb beträgt.

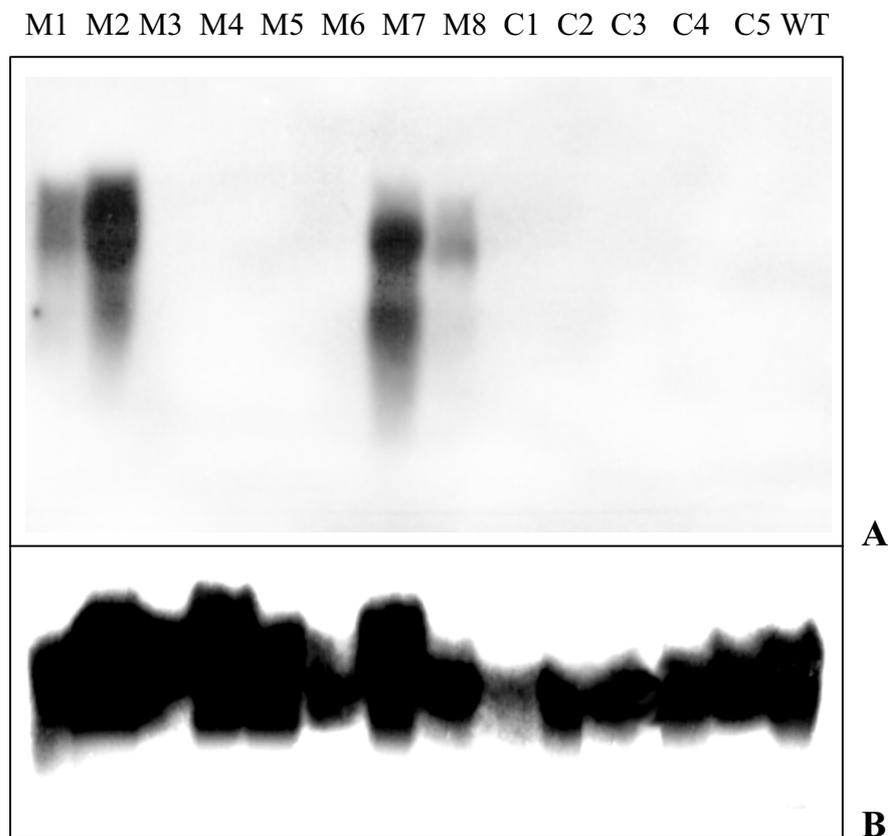


Abbildung 22: Northern Blot Analyse mit Gesamt-RNA der Transformanten M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, C1, C2, C3, C4, C5 und des Wildtyps. (A) Der Filter wurde mit einer spezifischen Sonde (MCTR), die gegen das in die *core II*-cDNA einklonierte 102 bp Fragment aus dem α -mpp von *Solanum tuberosum* gerichtet ist, hybridisiert. Für die Stämme mit der kompletten Expressionskassette des veränderten *core II* M1, M2 und M8 wurden jeweils 2 Transkripte mit einer Länge von 1,3 bis 1,4 kb nachgewiesen. In der Gesamt RNA des Stammes M7 wurde ein Transkript mit einer Länge von ca. 1,4 kb und ein weiteres mit einer Länge von 1,1 kb detektiert. (B) Nach Regeneration des Filters erfolgte als interne Kontrolle eine Hybridisierung mit der *core II* spezifischen Sonde COBP.

Eine Western Blot Analyse mit mitochondrialem Protein der Transformanten unter Verwendung eines gegen das Core II von *N. crassa* gerichteten Antikörper gab keinen Aufschluß darüber, ob das veränderte Core II gebildet wird. Nach Auftrennung des mitochondrialen Gesamtproteins der Stämme M1, M2, M7 und M8 in Tricin-SDS-Gelen wurden auf den entsprechenden Blots keine zur Core II-Bande zusätzlichen Kreuzreaktionen des Antikörpers nachgewiesen (nicht gezeigt). Dies muß jedoch nicht bedeuten, daß das veränderte Core II tatsächlich nicht gebildet oder nicht in die Mitochondrien importiert wird. Denkbar ist vor allem, daß es mit dem Core II auf gleicher Höhe im Tricin-SDS-Gel läuft.

Aufreinigung der Cytochrom c Reduktasen aus den Transformanten M2, M7 und aus dem Wildtyp

Zur Aufreinigung der Cytochrom c Reduktase wurden die Transformanten M2 und M7 ausgewählt, da sie die Expressionskassette für das veränderte *core II* mehrfach und mindestens einmal vollständig in das Genom integriert haben und Transkripte des veränderten *core II* in entsprechend hoher Quantität bilden. Im Gegensatz zur üblichen Praxis genetischer Untersuchungen, bei der möglichst der Effekt eines einzigen Mutationsereignisses im ansonsten unveränderten Genom untersucht wird, war in diesem Fall die mehrfache, vollständige Integration der Expressionskassette für das veränderte *core II* erwünscht. Die Wahrscheinlichkeit für den Einbau des veränderten Core II anstelle des originalen Core II in den Cytochrom c Reduktase-Komplex sollte damit erhöht werden.

Die Cytochrom c Reduktase von *N. crassa* läßt sich in nativen Proteingelen nicht als Komplex auftrennen (Daten nicht gezeigt). Deshalb war die Elektroelution der Cytochrom c Reduktasen aus Blau-Nativen Gelen nicht möglich. Zur Anwendung kam das von Weiss und Kolb (1979) entwickelte Verfahren zur Aufreinigung der Cytochrom c Reduktase aus *N. crassa* über Affinitätschromatographie in Kombination mit einer Gelfiltrationschromatographie.

Der erste Reinigungsschritt war die von Weiss und Juchs (1978) etablierte Cytochrom c-Affinitätschromatographie, die auf der spezifischen Bindung des Proteinkomplexes an Cytochrom c basiert. Die Fraktionen der Affinitätsäulen wurden gelelektrophoretisch analysiert (nicht gezeigt). Durch Vergleich des Bandenmusters der Fraktionen und anhand der rötlichen Färbung konnten die Cytochrom c Reduktase-haltigen Fraktionen identifiziert und gepoolt werden. Die gepoolten Fraktionen ergaben ein Volumen von ca. 10 ml mit einer Proteinkonzentration von 1-2 µg/µl, wobei für die Cytochrom c Reduktasen etwa die Hälfte bis zwei Drittel

der Gesamtproteinkonzentration geschätzt wurde. Über eine Druckfiltration wurden die gepoolten Fraktionen auf ein Volumen von 0,5 ml eingengt. Das Konzentrat der angereinigten Cytochrom c Reduktasen wurde über eine AcA34 Gelfiltrationssäule weiter aufgereinigt. Es erfolgte wiederum eine Analyse der eluierten Proteine über Tricin-SDS-PAGE und die Identifizierung der Cytochrom c Reduktasen anhand ihrer Untereinheitenkomposition.

Die Cytochrom c Reduktase des Wildtyps wurde mit einer Proteinkonzentration von 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ in der Peakfraktion eluiert. Im Coomassie gefärbten Gel ist, zusätzlich zu den 9 Banden der Cytochrom c Reduktase-Untereinheiten eine schwache Bande in Höhe der beiden Core-Protein-Banden zu sehen (Abb. 23C).

Etwas stärkere Verunreinigungen sind bei den Cytochrom c Reduktasen der Transformanten M2 und M7 in Coomassie gefärbten Gelen sichtbar (Abb. 23A/B). In den Peakfraktionen der Eluate wurde für die Cytochrom c Reduktase von M2 eine Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ und für die Cytochrom c Reduktase von M7 eine Konzentration von 1,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ bestimmt.

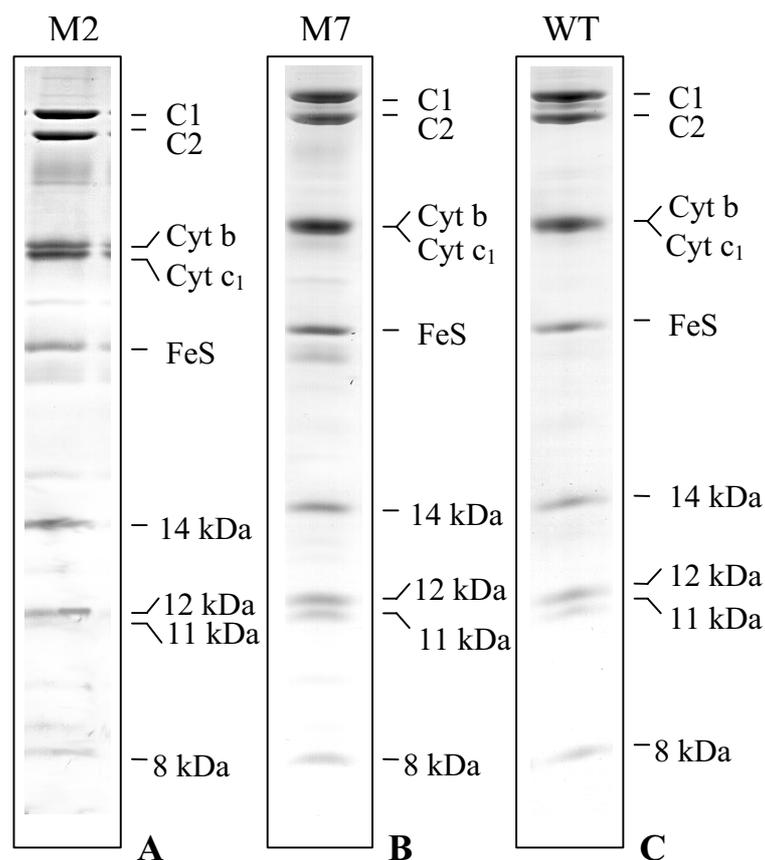


Abbildung 23: Über Affinitätschromatographie, Druckfiltration und anschließende Gelfiltrationschromatographie aufgereinigte Cytochrom c Reduktasen (A) aus dem Transformantenstamm M2; (B) aus dem Transformantenstamm M7; (C) aus dem Wildtyp. C1, Core I; C2, Core II; Cyt b, Cytochrom b; Cyt c₁, Cytochrom c₁. Die angegebenen Molekulargewichte weisen auf die entsprechenden kleinen Untereinheiten. Nicht beschriftet sind Banden, die auf noch bestehende Verunreinigungen der Cytochrom c Reduktasen zurückzuführen sind.

Prozessierungsaktivität der aufgereinigten Cytochrom c Reduktase Fraktionen

In vitro Prozessierungsenzymtests sollten darüber Aufschluß geben, ob es gelungen war, die Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktasen in den *N. crassa* Transformanten M2 und M7 zu rekonstituieren. Überprüft wurde die Prozessierungsaktivität der aufgereinigten Cytochrom c Reduktasen der Transformanten M2 und M7 sowie des Wildtyps als Kontrolle. Als weitere Kontrollen wurden die mitochondrialen Matrixfraktionen sowie die in Kombination eingesetzten, aufgereinigten Untereinheiten der Prozessierungsprotease von *N. crassa* verwendet. Die aufgereinigten Untereinheiten der Prozessierungsprotease von *N. crassa* wurden freundlicherweise von Prof. Kaulousek und Dr. Adamec (Yale School of Medicine, New Haven) zur Verfügung gestellt. Als Substrate dienten zunächst die mitochondrialen Vorläuferproteine der β -Untereinheit des ATP-Synthase-Komplex von *Nicotiana tabacum* und das FeS-Protein von *Solanum tuberosum*, die über ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert wurden. Keine der getesteten mitochondrialen *N. crassa*-Fraktionen, einschließlich der in Kombination eingesetzten aufgereinigten Untereinheiten der Prozessierungsprotease, waren in der Lage, die beiden Vorläuferproteine effizient in ihre reifen Formen umzusetzen (Daten nicht gezeigt).

In weiteren Prozessierungsenzymtests wurde geprüft, ob das Vorläuferprotein der β -Untereinheit des ATP-Synthase-Komplex von *Saccharomyces cerevisiae* von der mitochondrialen Prozessierungsprotease aus *N. crassa* sowie den Cytochrom c Reduktasen aus den Transformanten-Stämmen und aus dem Wildtyp in das reife Protein umgesetzt wird. Für die getesteten Fraktionen wurde eine deutliche Prozessierungsaktivität gegenüber dem Vorläuferprotein, die durch Zusatz des Metall-Chelators EDTA hemmbar ist, nachgewiesen (nicht gezeigt).

Die Versuche zeigen, daß die Prozessierungsprotease von *N. crassa* offensichtlich eine höhere Substratspezifität besitzt als bisher vermutet wurde und nicht alle mitochondrialen Vorläuferproteine aus heterologen Systemen als Substrate erkennt.

Unerwartet war die Prozessierungsaktivität der getesteten Cytochrom c Reduktase-Fraktion des Wildtyps. Die Ursachen dafür wurden nicht aufgeklärt. Deshalb bleibt zunächst offen, ob es gelungen ist, die Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase von *N. crassa* durch die vorgenommene Transformation zu rekonstituieren.

2.5 *In vitro* Studien am überexprimierten chimären Protein aus Core II und α -MPP

In Detergenz-Lösung ist der Cytochrom c Reduktase-Komplex von *N. crassa* fragil und dissoziiert bei hohen Salzkonzentrationen in drei Teile. Diese drei Teile sind der bc_1 -Subkomplex, bestehend aus Cytochrom b, Cytochrom c_1 und den vier kleinen Untereinheiten; der Core-Subkomplex, bestehend aus den Untereinheiten I und II sowie das Eisen-Schwefel-Protein. Die beiden Subkomplexe und das Eisen-Schwefel-Protein können leicht über biochemische Methoden voneinander getrennt bzw. aufgereinigt werden und unter bestimmten Bedingungen *in vitro* wieder zu einem aktiven Komplex assemblieren (Linke & Weiss, 1986). Ein in *E. coli* überexprimierter und aufgereinigter Komplex aus den reifen Formen des Core I (β -MPP) und des veränderten Core II sollte gemeinsam mit dem biochemisch aufgereinigten bc_1 -Subkomplex und dem Eisen-Schwefel-Protein zur Assemblierung der Cytochrom c Reduktase genutzt werden können. Damit stünde ein geeignetes *in vitro* System zur Analyse des Einflusses des veränderten Core II auf die Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase zur Verfügung. Eine Kontamination des Testsystems mit dem α -MPP könnte dabei weitgehend ausgeschlossen werden.

Der aufgereinigte Komplex aus dem Core I (β -MPP) und dem veränderten Core II sowie das aufgereinigte veränderte Core II können außerdem *in vitro* auf ihre funktionellen Eigenschaften hin, z.B. Substratbindung, untersucht werden.

Überexpression und Aufreinigung des veränderten Core II

Für die Überexpression des veränderten *core II* wurde der Expressionsvektor pET-28a ausgewählt, der die Selektion von Transformanten auf Kanamycinresistenz erlaubt. Zur Einklonierung in den Vektor wurde aus der cDNA des veränderten *core II* mit den spezifischen Primern HC1 und RCHIM (unter Material und Methoden beschrieben) ein DNA-Fragment, was für die reife Form des veränderten Core II kodiert, amplifiziert. Das DNA-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *BamHI* in den Vektor inkloniert. Aus dem so konstruierten Vektor, MpET28, kann ein Transkript abgelesen werden, welches für ein verändertes CORE II mit sechs N-terminalen Histidinresten kodiert. Das Plasmid MpET28 wurde in den Expressionsstamm BL21 transformiert, der unter Induktionsbedingungen das rekombinante Protein in sehr geringen Mengen bildet. Dieses wurde aus dem Zellsat unter Ausnutzung der Affinität der N-terminalen Histidinreste zu divalenten Kationen über eine Nickel-Affinitätsäulenchromatographie nativ aufgereinigt (Abb. 24). In

gleicher Weise wurde zur Kontrolle das unveränderte Core II exprimiert und aufgereinigt (nicht gezeigt).

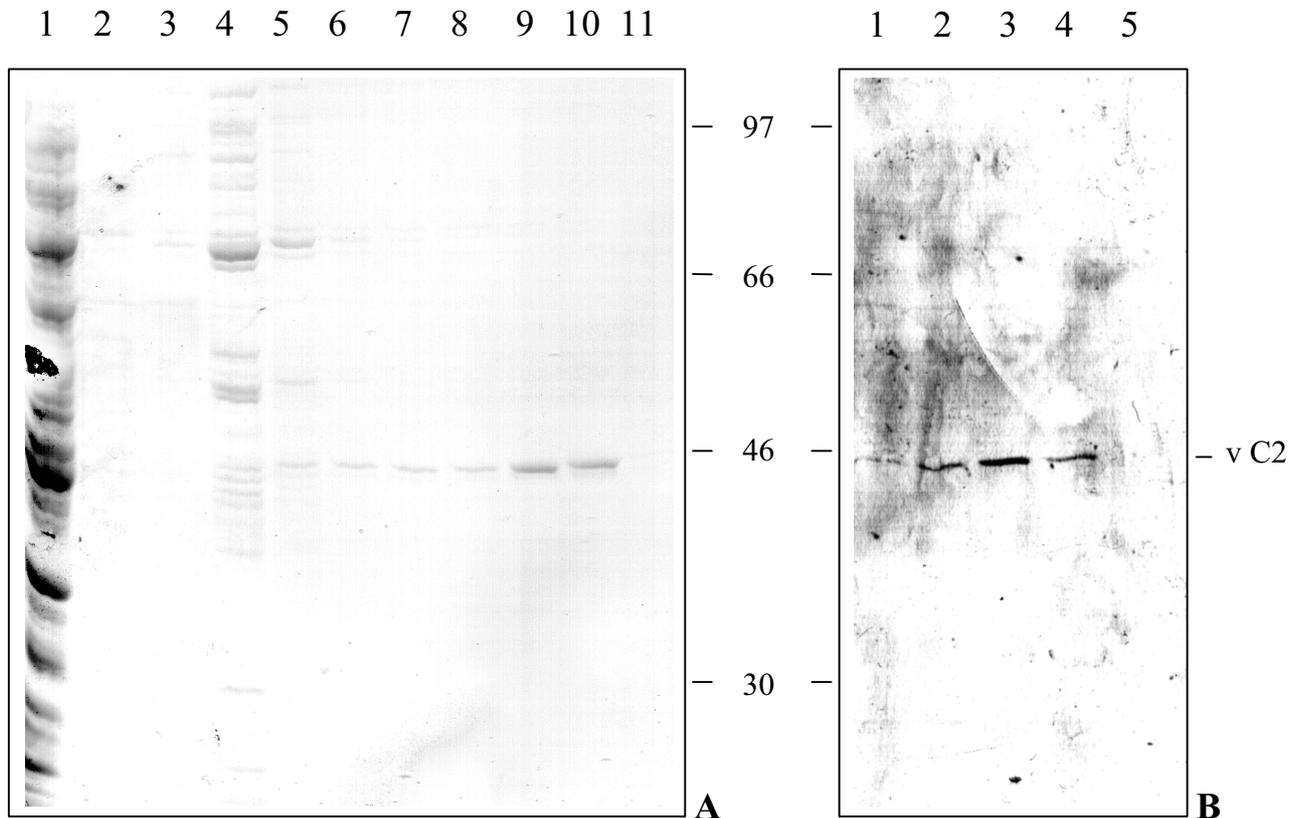


Abbildung 24: Gelelektrophoretische Analyse von Fraktionen der Ni-Affinitätssäule zur Aufreinigung des veränderten Core II. (A) Coomassie gefärbtes Gel. Spur 1: ‚Flow-through‘; Spur 2: Waschen der Säule mit Bindungspuffer (siehe Material und Methoden); Spuren 3-8: Waschen der Säule mit Waschpuffer (siehe Material und Methoden); 9-11: Elution des rekombinanten Proteins. (B) Immunoblot mit einem Antikörper der spezifisch gegen das Core II von *N. crassa* gerichtet ist. Die Spuren 1-5 entsprechen in der genannten Reihenfolge den Spuren 7-11 im Coomassie gefärbten Gel. v C2, verändertes Core II. In der Mitte sind die Molekulargewichte von Standardproteinen angegeben.

β-MPP und das veränderte Core II bilden einen dimeren Komplex

Das veränderte Core II konnte über seine sechs N-terminale Histidinreste gemeinsam mit dem β -MPP an eine Matrix mit immobilisierten Ni-Ionen gebunden werden und wieder mit β -MPP coeluiert werden.

Dazu wurde das für die reife Form kodierende β -mpp-Fragment von *N. crassa* über die mittels PCR eingeführten Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *BamHI* in den Expressionsvektor pET11d inkloniert. Dieser erlaubt im Gegensatz zum pET28a die Selektion der Transformanten auf Ampicillinresistenz. Das entstandene Plasmid BpET11 wurde gemeinsam mit dem Plasmid MpET28 in den *E. coli* Expressionsstamm BL21 transformiert. Doppelt transformierte *E. coli* zeichneten sich durch ihre Resistenz gegenüber Ampicillin und Kanamycin aus. Durch Immunfärbung mit spezifischen gegen die beiden Proteine gerichteten Antikörpern wurde unter Induktionsbedingungen sowohl das veränderte Core II als auch β -MPP im Zelllysate transformierter Bakterien nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Das Zelllysate eines induzierten *E. coli*-Stammes wurde unter nativen Bedingungen in einer Ni-Affinitätschromatographie eingesetzt. Die Fraktionen der Säule wurden gelelektrophoretisch analysiert. Durch Immunfärbung wurde gezeigt, daß das veränderte Core II und β -MPP bei einem 1 M Imidazol, 0,5 M NaCl, 20 mM Tris-HCl enthaltenden Puffer ohne sichtbare Verunreinigungen coeluierten. Die apparenten Molekulargewichte der detektierten Proteine von ca. 46 kDa und 52 kDa entsprechen den erwarteten (Hawlitschek et al., 1988). Im Coomassie gefärbten Gel war allerdings nur das veränderte Core II in Form einer Proteinbande sichtbar. Die Coelution beider Proteine verdeutlicht ihre hohe Affinität zueinander. Wenngleich beide Proteine nicht in einem Verhältnis von 1:1 gemeinsam von der Säule eluieren, liegt die Vermutung nahe, daß sie im Zelllysate als Dimere vorliegen. Luciano et al. (1997) und auch Shimokata et al. (1998) interpretieren die Coelution rekombinanter, überexprimierter und zum Teil mutierter MPP-Untereinheiten, von denen jeweils eine über sechs bis zehn N- bzw. C-terminale Histidinreste verfügt, als Indiz für eine nichtkovalente Bindung beider Untereinheiten. Erklärt werden kann das vom Verhältnis 1:1 abweichende Verhältnis möglicherweise dadurch, daß die Bindung zwischen den beiden Proteinen labiler ist als die Bindung des veränderten Core II an die Säule. Ein Teil der Bindungen zwischen β -MPP und dem veränderten Core II könnte deshalb bereits vor dem Elutionsschritt destabilisiert worden sein.

Das unveränderte Core II wurde zur Kontrolle in gleicher Weise mit dem β -MPP coexprimiert und von einer Ni-Säule coeluiert. Die beiden Proteine eluieren unter identischen Bedingungen wie das veränderte Core II mit dem β -MPP gemeinsam von einer Ni-Säule (nicht gezeigt).

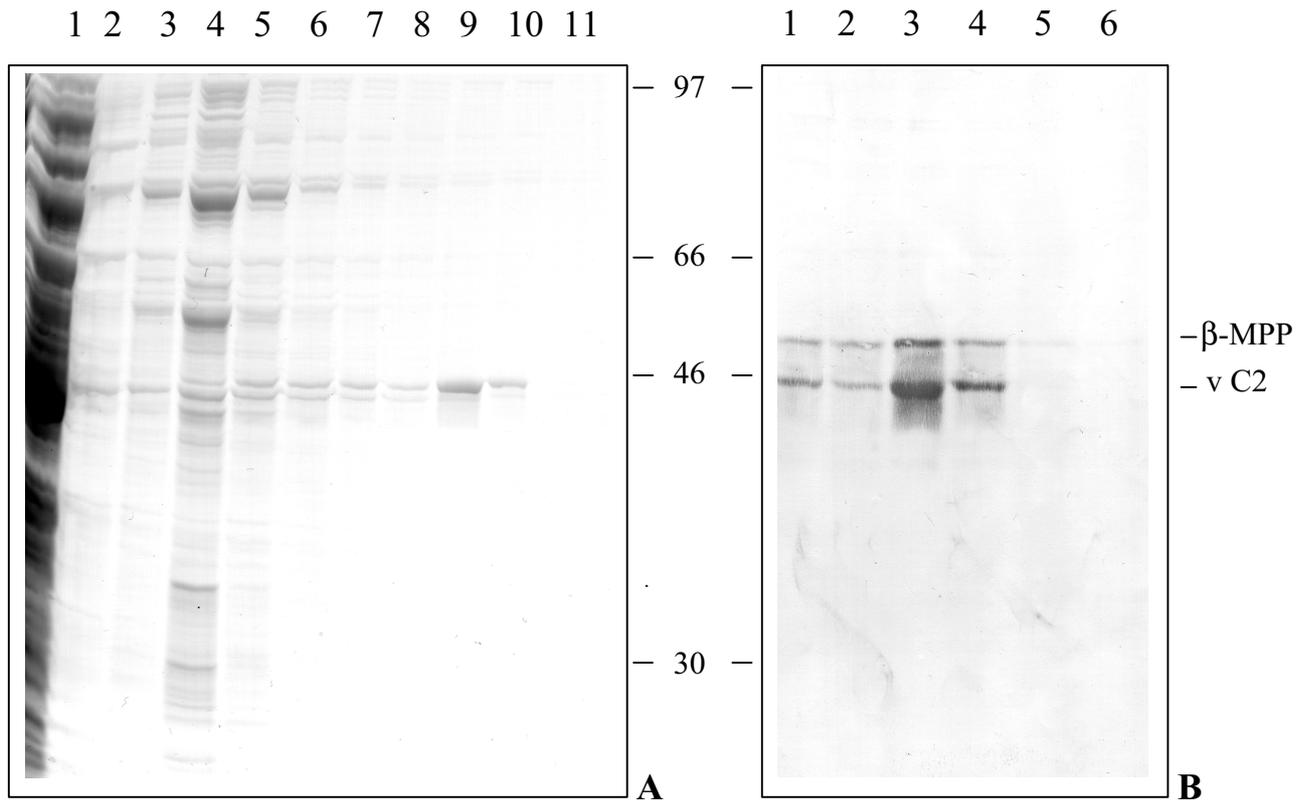


Abbildung 25: Gelelektrophoretische Analyse von Fraktionen der Ni-Affinitätsäule zur Aufreinigung des veränderten Core II gemeinsam mit β -MPP. (A) Coomassie gefärbtes Gel. Spur 1: „Flow-through“; Spur 2: Waschen der Säule mit Bindungspuffer (siehe Material und Methoden); Spuren 3-8: Waschen der Säule mit Waschpuffer (siehe Material und Methoden); 9-11: Coelution von β -MPP mit dem veränderten Core II. (B) Immunoblot mit Antikörpern die spezifisch gegen das Core II und β -MPP von *N. crassa* gerichtet sind. Die Spuren 1-5 entsprechen in der genannten Reihenfolge den Spuren 7-11 im Coomassie gefärbten Gel. Spur 6 repräsentiert eine weitere Waschfraktion. In der Mitte sind die Molekulargewichte von Standardproteinen angegeben. Rechts sind die Identitäten der Banden mit v C2, verändertes Core II und β -MPP angegeben.

3. Identifizierung einer MPP-artigen Protease aus *Rhodobacter sphaeroides*

Zu Beginn der Untersuchungen für die vorliegende Dissertation waren nur zwei eubakterielle Sequenzen bekannt, die der Unterfamilie der MPP-artigen Mitglieder der Pitrilysinfamilie zugeordnet werden konnten (Chen et al., 1993). Bis heute ist kein Protein aus dieser Unterfamilie isoliert und funktionell charakterisiert worden.

Phylogenetische Untersuchungen der letzten Jahre belegen, daß Mitochondrien und rezente α -Proteobakterien einen gemeinsamen α -proteobakteriellen Vorfahren besaßen (Gupta, 1995; Gray, 1998; Muller & Martin, 1999). Für das Verständnis der Evolution von MPP ist deshalb

die Charakterisierung einer MPP-artigen Protease aus einem α -Proteobakterium besonders interessant.

3.1 Erstellung einer repräsentativen genomischen DNA-Bank von *Rhodobacter sphaeroides*

In einer repräsentativen DNA-Bank sollte jedes Fragment mit einer akzeptablen Wahrscheinlichkeit vertreten sein. Die Wahrscheinlichkeit, P , mit der ein unabhängiger Klon in einer DNA-Bank vertreten ist läßt sich aus der Zahl der unabhängigen Klone, N , und dem Verhältnis der Größe der Inserts zur Größe des Gesamtgenoms, f , mit $N = \ln(1-P) / \ln(1-f)$ berechnen. *Rhodobacter sphaeroides* hat eine Genomgröße von ca. 4400 kbp (Suwato & Kaplan, 1989). Die erstellte genomische DNA-Bank enthält DNA-Fragmente mit einer durchschnittlichen Größe von 3 kbp. Das heißt, jeder Klon enthält 1/1466 des Gesamtgenoms. Daraus ergibt sich für eine Wahrscheinlichkeit von 99 % eine Größe der DNA-Bank von 6750 Klonen. Die erstellte, nicht amplifizierte genomische DNA-Bank enthält ca. 132500 unabhängige Klone und umfaßt damit 90 mal das Gesamtgenom von *Rhodobacter sphaeroides*.

3.2 Isolation eines Gens für eine MPP-artige Protease

Im und um den Bereich der inversen Zinkbindedomäne weisen die Aminosäuresequenzen der Vertreter der Pitrilysinfamilie einen hohen Konservierungsgrad auf. Für die β -MPP-Sequenzen ergibt sich in diesem Bereich eine Konsensussequenz von HFLEHXXFK. Die von einem offenen Leserahmen abgeleitete Aminosäuresequenz einer putativen MPP-artigen Protease aus *Rickettsia prowazekii*, die während der Durchführung der vorliegenden Dissertation veröffentlicht wurde (Andersson et al., 1998), stimmt im entsprechenden Sequenzabschnitt mit der Konsensussequenz überein. Der Sequenzabschnitt weist eine Aminosäuresequenz von HFLEHMAFK auf. Da sowohl *Rhodobacter sphaeroides* als auch *Rickettsia prowazekii* zu den α -Proteobakterien gehören, wurde diese Sequenz genutzt, um zwei degenerierte Oligonukleotide zum Screening der genomischen DNA-Bank abzuleiten. Dazu wurde das Programm PROBE des PC-Gene Softwarepaketes verwendet. Das kurze Oligonukleotid deckt die Sequenz HFLEHM ab. Zusätzlich wurde ein längeres Oligonukleotid von der Sequenz HFLEHMAFK abgeleitet.

Das Screening mit dem längeren degenerierten Oligonukleotid führte zur Isolation von 6 positiven Klonen. Die Inserts wurden mit den Restriktionsenzymen *SalI* und *EcoRI* aus dem

pBK-CMV-Phagemidvektor ausgeschnitten. Ihre Größen wurden durch gelelektrophoretische Auftrennung bestimmt und lagen zwischen 2 und 3,5 kbp. Die Sequenzierung der Inserts ausgehend vom T3-Promotor des Plasmids verdeutlichte, daß die Sequenzen in diesem Bereich identisch waren. Deshalb wurde nur ein Klon zur weiteren Sequenzierung verwendet. Durch ‚Primer-Walking‘ wurde ein Sequenzabschnitt von 2330 bp des ca. 3 kbp großen Inserts sequenziert. Der Sequenzabschnitt enthält einen vollständigen offenen Leserahmen von 1254 bp Länge, der für eine putative MPP-artige Protease kodiert und im nachfolgenden als *rsp* bezeichnet wird (Abb. 26).

```

AGGCCCGGCTGAAGCACATGTTCAACGACTTCGCCTTCCGCGATGCCGGTGGGGCTGGCT 60
GGCGTCAATTCGATCAACTGGGCGCGGGTGCTGGCGCAGGTCGTCTATTACTTCACCTCG 120
GCCGTGGCGCTCGGCGCGCCGCACCGCGAGGTGAGCTTCACGGTGCCCACCGGCAATTC 180
GGCGACATCTTCGCGGGCTACATGGCGCGGCGCATGGGGCTGCCCATCGCCCGCCTCGTG 240
GTGGCCACCAACCAGAACGACATCCTGCACCGTGCCTCTCGACGGGCGCCTACGAGACC 300
GAGGGCGTCACGCCGTCGATCAGCCCCTCGATGGACATCCAGGTCTCTCGAACTTCGAG 360
CGGGCCTTGTTTCGATGCCTATGGCCGCGACGGGCGGCCGTGGCAGCCCTCATGGCCGAGC 420
TGAAGGAGGGCGGCTTCCGCATCTCCGAAAATGCGCTGGGGACTGCGCGCGACCTTCGCC 480
TCGGGCCGCGCCTCCGAGGAAGAGACGCTGGCCACGATCCGCGCCACCCATGCGGGCAGC 540
GGCGAGCTTCTCTGCCCCATTCGGCCGTGGGCGTGAAGGTGGCCGAGGAGGCGCTCGGC 600
CCCGAGCCGATGATCACGCTCGCCACCGCCCATCCGGCCAAGTCCCCGATGCGGTTCGAG 660
GCGGCCACTGGCCTGCGCCCCGCGCTGCCTGCCCCGCATGGCCGATCTCTTCGACCGACCC 720
GAGCGGGTGACGCGCGTTCCCAACGACCTGTCCGCCCTCGAAACCCTCATCCGCGAAAGG 780
ACCGGGCGTTGACCGTTCTCCTCGACACCCTGCCGAACGGCTTCCGCATCGTACCGAGC 840
      L T V L L D T L P N G F R I V T E H 18
ACATGCCCCGGGCTGCATTCGGCCTCGATCGGGATCTGGATCGCGGCGGGCGGTTCGCCACG 900
      M P G L H S A S I G I W I A A G G R H E 38
AGCGGCCCGAACAGAACGGGATCGCCATTTCTCGAGCACATGGCCTTCAAGGGCACGA 960
      R P E Q N G I A H F L E H M A F K G T K 58
AGACCCGCAGCGCGCTGCGCATCGCCGAGGAGATCGAGGATGTGGGCGGCTACATCAACG 1020
      T R S A L R I A E E I E D V G G Y I N A 78
CCTACACCTCGCGCGAGATGACGGCCTATTACGCCCCGGTGCTCGAGGCCGACACCGGGC 1080
      Y T S R E M T A Y Y A R V L E A D T G L 98
TCGCGCTGGACGTGATCGCCGACATCGTTCTGAACCCGTCTTCGACCCGAAGGAGATCGA 1140
      A L D V I A D I V L N P S S T R R R S R 118
GATCGAGCGGCACGTCATCCTGCAGGAGATCGGCCAGGCGCTCGACACGCCCGACGACAT 1200
      S S G T S S C R R S A R R S T R P T T S 138

```

```

CATCTTCGACTGGCTGCAGGAGGCCTCCTACCCCGGTCAGCTTCGGCCGACCATCCTCG 1260
  S S T G C R R P P T P V S F G R T I L G 158

GCCCCGAGGAGCGGGTCTCGACCTTCGGGCGCGCCGATCTCACGCGCTTCGTGGGCGAGC 1320
  P E E R V S T F G R A D L T R F V G E H 178

ATTACGGCCCCGACCACATGATCCTCGCCGCTGCGGGGGGCGTCGATCACGGCAGGATCG 1380
  Y G P D H M I L A A A G G V D H G R I V 198

TCGCGCAGGCGCAGGCGCTGTTTCGGTCATCTGAAGCCGGTGGGCCAGCGCCCGATGCAGC 1440
  A Q A Q A L F G H L K P V G Q R P M Q P 218

CCGCGGACTTCCTCGGCGGCGAGCGGCGGAGCTGAAGTCGCTGGAGCAGGTCCATTTTCG 1500
  A D F L G G E R R E L K S L E Q V H F A 238

CCATGGCATTTCGAGGCGCCGAACCTACCGGGCGCCCGACGTCTATGCGGCGCAGGTCTATG 1560
  M A F E A P N Y R A P D V Y A A Q V Y A 258

CCATGGCGCTCGGGGGCGGCATGTCTCCTCGCGGCTCTTCCAGAAGGTGCGCGAGGAGCGCG 1620
  M A L G G G M S S R L F Q K V R E E R G 278

GCCTCTGCTATTCGATCTTCGCCCAGTCGGGCGCCTACGAGGATACCGGGCAGATCACGA 1680
  L C Y S I F A Q S G A Y E D T G Q I T I 298

TCTATGCCGGCACCTCGGGCGAGGAGGTGGCCGATCTCGCGGGGCTTACGGTGGACGAGC 1740
  Y A G T S G E E V A D L A G L T V D E L 318

TGAAGCGCGCCACCGAGGACATGTCCGAGGCCGAGGTCGCTCGCGCCCGCGCGCAGCTCA 1800
  K R A T E D M S E A E V A R A R A Q L K 338

AGGCCGGGCTCCTGATGGGGCTCGAAAGCCCTCGAACCGGGCCGAGCGGCTGGCGCGGC 1860
  A G L L M G L E S P S N R A E R L A R L 358

TTCTGGCCATCTGGGGCAGGGTGCCGGGCGTGGACGAGGCGGTGGAGAAGATCGACGCGG 1920
  L A I W G R V P G V D E A V E K I D A V 378

TGACGGTCGGGGCGGTGCGCGACTATGCAGAGCGCATGGCGCAGGCCCGCTCGGCGCTCG 1980
  T V G A V R D Y A E R M A Q A R S A L A 398

CGCTCTACGGCCCGACCGAGGCGGCTCCTGCCCTCGCACAGATCCGCGAGCGGCTGGCCG 2040
  L Y G P T E A A P A L A Q I R E R L A A 418

CCTGATGCTCGGACTGCGGCGGAAGGTTTCGCATCGAGACGGAGCGGATGACGCTGCGCCT 2100
  *

GCCGGCCATTCCGACTGGCGCGACTGGGCCGCCCTGCGCGCCGAGAGCGCGACCTTCCT 2160

CACGCCGTGGGAGCCCGTCTGGTCCTCGGACCATCTCTCGCGCAAGGCCTTCACCAACCG 2220

CGTCTACTGGGCCGCCCGCGCCGAGAGCCAGGGCACCGCGCTGCCGGTTCTGCTGATCCG 2280

GCGCGAGGATCAGCGCGCTGCTGGGCGCCTATCACGCTCGACAAACATCC 2330

```

Abbildung 26 (diese und vorherige Seite): Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons 12 mit einem vollständigen offenen Leserahmen für eine putative MPP-artige Protease (Seq1_Rsp).

Die abgeleitete 418 Aminosäurereste lange Aminosäuresequenz besitzt 38 % Sequenzidentität zur Aminosäuresequenz einer putativen MPP-artigen Protease aus *Rickettsia prowazekii* und

hohe Sequenzidentität zu β -Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsproteasen von *Solanum tuberosum* sowie einer putativen Protease aus *Bacillus subtilis* (Abb. 27).

Seq1_Rhs	:	-----*-----20-----*-----40-----*-----60-----	:	-
bMPP_St	:	MATRHLNLTTRRRSRITPFTVLPPCITFSSRSSTSITNPSQSSSLPSPPPPDAMIYDRLAE	:	61
Seq1_Rip	:	-----	:	-
PP_Bs	:	-----	:	-
Seq1_Rhs	:	-----*-----80-----*-----100-----*-----120-----	:	26
bMPP_St	:	QVKSIIKRLLEDPNQRFRLRYNSPDPTVADHTSILSAPETKVTLENGLRRIATESNLSSQTAT	:	122
Seq1_Rip	:	-----MKENFNVSKLKNGLTILTYNMPYVHSVA	:	28
PP_Bs	:	-----MIKRYTCENGVRIVLENNPTVRSVA	:	25
Seq1_Rhs	:	-----*-----140-----*-----160-----*-----180-----	:	87
bMPP_St	:	IGIWIAGGRHERPEQNGIAHFLEHMAFKGTKTRSALRIAEEIEDVGGYINAYTSREMTAY	:	183
Seq1_Rip	:	INLIAKVGARYENEEEGTSHFLEHMAFKGTKRTRAQQIAEEFDSI GGYFNAYTGHEENTVY	:	89
PP_Bs	:	IGVWIGTGSRETEPEINGISHFLEHMFVKGTSTKSAREIAESFDRI GGVQVNAFTSKEYTCY	:	86
Seq1_Rhs	:	-----*-----200-----*-----220-----*-----240-----	:	148
bMPP_St	:	YARVLEADTGLALDVIADIVLNPSSSTRRRRSRSGTSSCRSARRSTRPTTSSSTGCRPPT	:	244
Seq1_Rip	:	YARVLESENCHKALNILADIIQNSIFADEEIAKEYQIIMQEIATHHNDPDDL IYETFYNTVY	:	150
PP_Bs	:	YAKVLEDEHANYALDVLADMMFFHSTFDENELKKEKNVVEELKMYEDAPDDIVHDLISKATY	:	147
Seq1_Rhs	:	-----*-----260-----*-----280-----*-----300-----	:	208
bMPP_St	:	PVS-FGRITILGPEERVSIFGRADLTRFVGEHYGPDHMLAAAGGVDHGRIVAQAQALFGHL	:	305
Seq1_Rip	:	QYTPLGRITILGFAQNIKEMTRAHIQDYISTHYGAHRMVISAAAGAVKHEEVVELVKKHFTKL	:	211
PP_Bs	:	KGQPLGKSIILGTTKTLVFTTKEHFLNFIGKHYNANLYLSIAGNIEHNKIVMIAEELFASL	:	208
Seq1_Rhs	:	-----*-----320-----*-----340-----*-----360-----	:	261
bMPP_St	:	GNHSLGYPILGTEETLASEFNGDSLQRYMHDYITPDRVVISVAGNISDSFIKDVKEKWFSGSYE	:	365
Seq1_Rip	:	KP-----VGQRPMQPADFLGGERRELKS-LEQVHFAMAFAPNYR-APDVYAAQVYAMAL	:	265
PP_Bs	:	SSNPIITTSQLVSEEPALIEFTGSEIRIIDDLDPLAQFAVAFSGASWT-DEDSIALMVMQQML	:	265
Seq1_Rhs	:	-----*-----380-----*-----400-----*-----420-----	:	313
bMPP_St	:	KGQ-----VKSSFIPAKYIGGKGFHKE-LEQTSLVIGFECTSYINLGQLYQTYLLSIIF	:	317
Seq1_Rip	:	AKG-----KATGLEKPEEHTEKLTRKKE-TEQAHLCLGFKLELVG-HERIYDLDIVLNNVL	:	313
PP_Bs	:	G-----GG--MSSRLEQKVRERERGLCYSIFAQSGAYEDTGCQIITIIYAGTSGEEVADLAGL	:	425
Seq1_Rhs	:	G-----GG--MSSRLEQKVRERERGLCYSIFAQSGAYEDTGCQIITIIYAGTSGEEVADLAGL	:	425
Seq1_Rip	:	G-----GG--MSSRLEQKVRERERGLCYSIFAQSGAYEDTGCQIITIIYAGTSGEEVADLAGL	:	317
PP_Bs	:	G-----GG--MSSRLEQKVRERERGLCYSIFAQSGAYEDTGCQIITIIYAGTSGEEVADLAGL	:	313
Seq1_Rhs	:	-----*-----440-----*-----460-----*-----480-----	:	373
bMPP_St	:	TVDELKRAT-EDMSEAEVARARAOLKAGLLMGLESPSNRARERLARLLAIWGRVPGVDEAVE	:	485
Seq1_Rip	:	IMNGICKLS-YKVSADADVVRARNOLKSSLMIHIDGSGPTAEDIGRQLITYGRRIPYAEELFS	:	377
PP_Bs	:	IKNEIIKIT-ETVSTEEIIRAKMQLRSNLQMAQEQNTYKSEFEGKNYSVFGKYILPEETIE	:	374
Seq1_Rhs	:	-----*-----500-----*-----520-----*-----	:	418
bMPP_St	:	IQETLATIKRDGITSKELENSKEQMKGSLMISLESTNSKMSRNGKNELLGKHKTLDEIIN	:	534
Seq1_Rip	:	KIDAVTVGAVRDYAEERMAQAR-SALALYGPTEAAPALAQIRERLAA---	:	412
PP_Bs	:	RIDSVDTGTIKRVNRNFIFDDEVAISARGPIQDLPDYNWFRRTYWLRY	:	409
Seq1_Rip	:	IITNIRADDIINTANKIFSGT-TTLAIIGPNDLNGF-----	:	412
PP_Bs	:	ELNAVNLERVNGLARQLEFTEYALALISPSGNMPS-----	:	409

Abbildung 27: Aminosäuresequenzvergleich der putativen MPP-artigen Protease aus *Rhodobacter sphaeroides*, Seq1_Rsp, mit putativen Proteasen aus *Rickettsia prowazekii* (C71733), Seq1_Rip, und *Bacillus subtilis* (Q04805), PP_Bs, sowie mit dem β -MPP aus *Solanum tuberosum* (X80237), bMPP_St. Aminosäuren, die zwischen allen Sequenzen konserviert sind, wurden schwarz unterlegt. Aminosäuren, die in mindestens zwei der vier Sequenzen konserviert sind, wurden grau unterlegt.

Das kalkulierte Molekulargewicht für das abgeleitete Protein beträgt 45286 Da. Ein nach Kyte & Doolittle (1982) berechnetes Hydrophobizitätsprofil weist das putative Protein aus *Rhodobacter sphaeroides* als insgesamt hydrophil aus (Daten nicht gezeigt).

Ungewöhnlich ist das Fehlen des Startcodons ATG am Translationsstart. Aus Sequenzvergleichen mit anderen MPP-artigen Sequenzen kann der Translationsstart jedoch auf einen sehr kleinen Bereich eingengt werden. In diesem Bereich liegt das Codon TTG, welches in seltenen Fällen, 2 %, als Initiationscodon fungiert. Stromaufwärts von diesem möglichen Startcodon existiert im Leserahmen der putativen Protease kein Stopcodon im sequenzierten Abschnitt des DNA-Fragments. Die Sequenzidentität zu Mitgliedern der Pitrylsinfamilie bricht jedoch stromaufwärts des möglichen Startcodons ab. Dies ist ein weiteres Argument für den festgelegten Translationsstart.

3.3 Überexpression des Gens für die MPP-artige Protease und Aufreinigung des rekombinanten Proteins

Als Voraussetzung zur Isolation der putativen Protease aus *Rhodobacter sphaeroides* wurde ein spezifisches Antiserum hergestellt, welches in einer Immuno-Affinitätschromatographie eingesetzt werden sollte. Dazu mußte zunächst das Gen in *E. coli* überexprimiert und das rekombinante Protein aufgereinigt werden. Zur Überexpression des offenen Leserahmens *rsp* wurde dieser unter Einführung der Restriktionsschnittstellen für *NdeI* und *NotI* mit den Primern RHH und RHR2 durch PCR amplifiziert. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* in den Expressionsvektor pET-21b inkloniert. Der neu entstandene Vektor, RpET21, erlaubt unter Induktionsbedingungen im Expressionsstamm BL21 die Synthese eines rekombinanten Proteins mit sechs C-terminalen Histidinresten. Dieses konnte allerdings nur in sehr geringen Mengen in der löslichen Fraktion der Zellen nachgewiesen werden. Ein großer Anteil des rekombinanten Proteins lag in Form von ‚inclusion bodies‘ vor und wurde über eine Ni-Affinitätschromatographie unter denaturierenden Bedingungen aufgereinigt und zur Synthese eines spezifischen Antiserums durch das Unternehmen Eurogentec (Belgien) genutzt. Die Spezifität des hergestellten Antiserums wurde in einem Kontrollexperiment überprüft. Dazu wurden jeweils ca. 15 µg Gesamtprotein aus *Rhodobacter sphaeroides* über Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt und auf Nitrozellulosemembranen geblottet. Die Nitrozellulosemembranen wurden während der Immun-

färbung entweder mit dem hergestellten Antiserum oder mit dem Präimmunerum inkubiert. Das Antiserum detektiert im Gegensatz zum Präimmunerum eine Bande bei ca. 45 kDa (Daten nicht gezeigt).

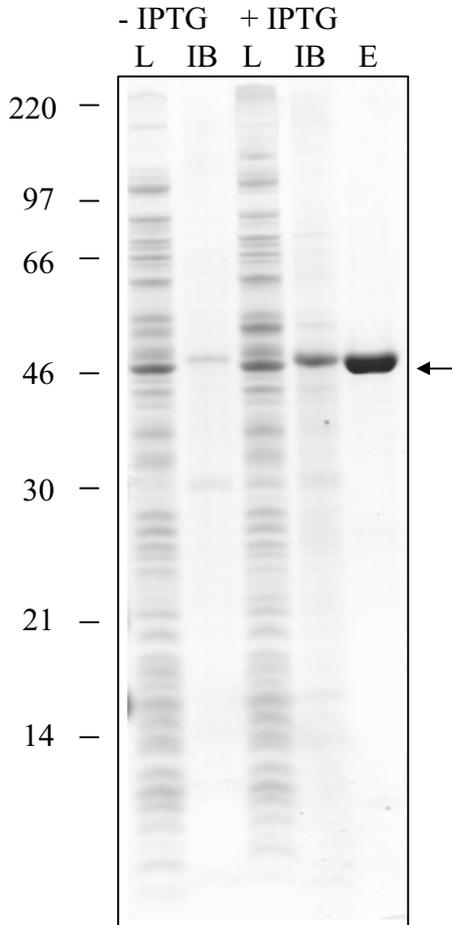


Abbildung 28: Aufreinigung der rekombinanten putativen Protease von *Rhodobacter sphaeroides* aus dem *E. coli* Expressionsstamm BL21. Spur 1: Ultraschall behandeltes Zellysate vor Induktion (-IPTG, L), Spur 2: unlösliche Zellfraktion vor Induktion (-IPTG, IB), Spur 3: Ultraschall behandeltes Zellysate unter Induktionsbedingungen (+IPTG, L), Spur 4: unlösliche Zellfraktion unter Induktionsbedingungen (+IPTG, IB), Spur 5: Eluat der Ni-Affinitätschromatographie. Der Pfeil rechts neben dem Gel weist auf die Bande der überexprimierten putativen Protease. Die Zahlen links neben dem Gel geben die molekularen Größen eines Proteinstandards an.

Unter nativen Bedingungen konnte keine ausreichende Menge des rekombinanten Proteins aufgereinigt werden, so daß auf erste Versuche zur funktionellen Charakterisierung der putativen Protease mit dem überexprimierten Protein verzichtet wurde.

3.4 Immunologische Identifizierung der MPP-artigen Protease nach BN-PAGE von bakteriellem Gesamtprotein

Blau-Native-PAGE ist eine geeignete Methode zur Auftrennung bakterieller Proteinkomplexe (Schägger & von Jagow, 1991). Sie ist damit auch bedingt als Methode zur Vorhersage der Lokalisation bakterieller Proteine geeignet. An dieser Stelle wurde sie in Kombination mit einer Immunfärbung genutzt, um die bereits auf DNA-Ebene identifizierte MPP-artige Protease von *Rhodobacter sphaeroides* auf Proteinebene nachzuweisen. Gleichzeitig kann

damit eine Aussage über eine mögliche Lokalisation der Protease in Proteinkomplexen getroffen werden bzw. das Gegenteil bewiesen werden.

Abbildung 29 zeigt die Auftrennung von Gesamtprotein aus *Rhodobacter sphaeroides* über BN-PAGE (Abb. 29A) und Tricin-SDS-PAGE (Abb. 29B). Den größten als Bande im BN-Gel sichtbaren Proteinkomplex stellt das GroEL mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 630 kDa dar (Lee et al., 1997). In der zweiten Dimension zerfällt der Komplex in seine Untereinheiten, die im Tricin-SDS-Gel ein apparentes Molekulargewicht von 57 kDa besitzen. Der mit [RC+LHC]₂ bezeichnete Komplex mit einem apparenten Molekulargewicht von 610 kDa stellt das Reaktionszentrum (RC) und den Light-Harvesting-Komplex (LHC) des Photosynthesezentrums dar (Williams et al, 1989; Arnoux et al. 1990). Er wird in der zweiten Dimension in 6 Untereinheiten aufgetrennt. Die F₀F₁-ATP-Synthase besitzt im BN-Gel ein apparentes Molekulargewicht von 490 kDa. Dem Komplex können in der zweiten Dimension zwei Banden bei 57 kDa und 52 kDa (α - und β -Untereinheiten) und drei weitere Banden mit Größen unter 30 kDa zugeordnet werden (Falk et al., 1985). Bei dem mit [RC+LHC]₁ bezeichneten Komplex handelt es sich möglicherweise um eine monomere Form des Komplexes aus Reaktionszentrum (RC) und dem Light-Harvesting-Komplex (LHC). Im BN-Gel ergibt er eine Bande von ca. 380 kDa. Die Bande bei 300 kDa wird durch drei verschiedene Proteinkomplexe, die Ribulosebisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RubisCO), die Phosphoribulokinase (PRK) und den Light-Harvesting-Komplex (LHC), gebildet (Hallenbeck & Kaplan, 1987). Die Identifizierung der Proteinkomplexe erfolgte durch direkte Sequenzierung der Untereinheiten der Komplexe im Rahmen einer Diplomarbeit.

Zur immunologischen Identifizierung der putativen Protease aus *Rhodobacter sphaeroides* wurden wie für das in Abbildung 29A gezeigte BN-Gel ca. 300 μ g Gesamtprotein über BN-PAGE und anschließende Tricin-SDS-PAGE aufgetrennt, auf eine Nitrozellulosemembran geblottet und danach mit dem gegen die putative Protease gerichteten Antiserum analysiert. Das Antiserum erkennt sehr spezifisch zwei Proteine mit einem apparenten Molekulargewicht von ca. 45 kDa und 57 kDa (Abb. 29C). Diese werden in der ersten Blau-Nativen Dimension, nahe der Lauffront aufgetrennt. Die Ergebnisse beweisen, daß beide detektierten Proteine keine Bestandteile von Proteinkomplexen sind, sondern entweder lösliche cytoplasmatische oder periplasmatische Proteine oder singuläre Membranproteine darstellen. Kreuzreaktionen mit weiteren Proteinspots wurden nicht detektiert. Im Bereich der beiden Proteinspots liegen sehr viele Proteine dicht beieinander. Eine genaue Zuordnung der immunologisch detektierten Proteine zu einzelnen Spots im zweidimensional aufgetrennten Proteingel war deshalb nicht möglich.

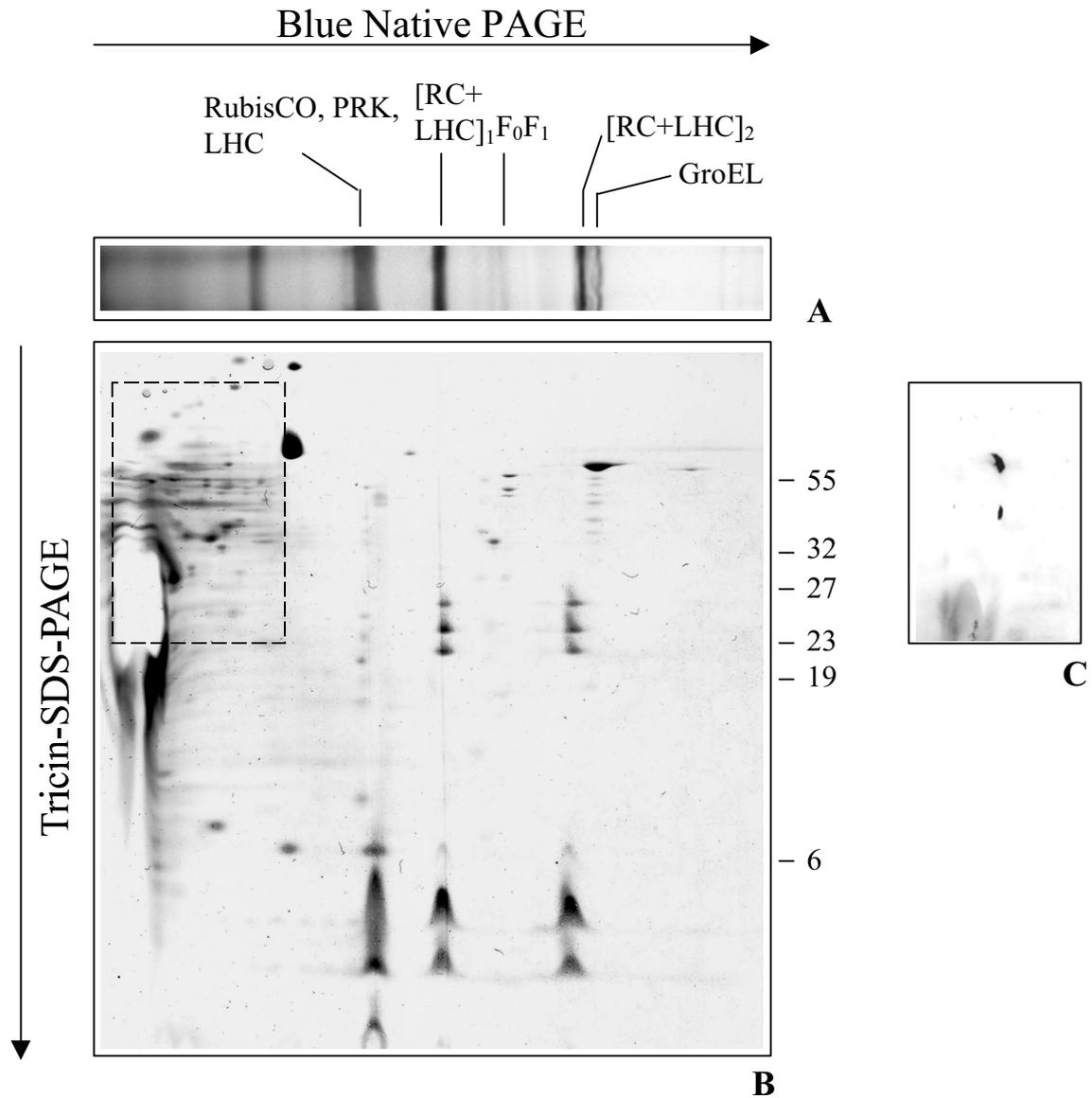


Abbildung 29: Zweidimensionale Auftrennung von ca. 300 µg Gesamtprotein aus *Rhodobacter sphaeroides* durch BN-PAGE und Tricine-SDS-PAGE. A: Coomassie-gefärbte Spur mit Gesamtprotein von *Rhodobacter sphaeroides* nach BN-PAGE. B: Coomassie gefärbtes Gel nach Auftrennung in der zweiten Geldimension. C: Immunoblot einer zweiten Geldimension mit einem gegen die putative Protease gerichteten Antiserum. Der gestrichelte Rahmen in A gibt den Ausschnitt wieder, welcher im Immunoblot unter C dargestellt ist. Über der zweiten Geldimension ist die Identität von Proteinkomplexen angegeben. Die Erklärungen für an dieser Stelle verwendete Abkürzungen können dem Text entnommen werden. Die Zahlen rechts neben der zweiten Geldimension geben die Größen der Untereinheiten der F₀F₁-ATP-Synthase von Kartoffel als Größenstandard an.

4. Phylogenetische Analyse der mitochondrialen Prozessierungsprotease auf der Grundlage von Sequenzvergleichen

Momentan existieren weltweit über 120 Datenbankeinträge für Proteine der Pitrilysinfamilie. Die Vielzahl der zugänglichen Sequenzdaten erlaubt eine detaillierte Analyse der phylogenetischen Beziehungen von Mitgliedern dieser Proteinfamilie. Im folgenden wurden die Sequenzen der in Tabelle 6 aufgelisteten Proteine bzw. aus offenen Leserahmen abgeleiteten Aminosäuresequenzen in unterschiedliche multiple Sequenzalignments einbezogen, aus denen unter Anwendung von Programmen des Phylip-Softwarepaketes Stammbäume berechnet wurden. Die multiplen Alignments wurden mittels ClustalW unter Beibehaltung der Standardparameter (,Gap Extension': 0,05, ,Gap Distances': 0,05) erstellt.

Bezeichnung in Stammbäumen	Erklärung zur Sequenz	Organismus	Accession-Nummer
β-MPP			
βMPP_At	unvollständig, β-MPP, 101 AS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Z35354
βMPP_Be	β-MPP, 465 AS	<i>Blastocladiella emersonii</i>	U41300
βMPP_Ce	β-MPP, 485 AS	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Z68270
βMPP_Ds	unvollständig, β-MPP, 178 AS	<i>Drosophila silvestris</i>	G2618992
βMPP_Eg	β-MPP, 494 AS	<i>Euglena gracilis</i>	JX0300
βMPP_Hs	β-MPP, 489 AS	<i>Homo sapiens</i>	G3342006
βMPP_Le	β-MPP, 466 AS	<i>Lentimula edodes</i>	Jc6525
βMPP_Lm	β-MPP, 494 AS	<i>Leishmania major</i>	T02849
βMPP_Nc	β-MPP, 476 AS	<i>Neurospora crassa</i>	A29881
βMPP_Oc	unvollständig, β-MPP, 282 AS	<i>Ostertagia circumcincta</i>	E321112
βMPP_Rn	β-MPP, 489 AS	<i>Rattus norvegicus</i>	S36390
βMPP_Sc	β-MPP, 462 AS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S00552
βMPP_Sp	β-MPP, 454 AS	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	D89152
βMPP1_St	β-MPP, 530 AS	<i>Solanum tuberosum</i>	X80235
βMPP2_St	β-MPP, 534 AS	<i>Solanum tuberosum</i>	X80237
α-MPP			
αMPP1_At	α-MPP, 503 AS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	G4220446
αMPP2_At	α-MPP, 499 AS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	G2062155
αMPP_Be	α-MPP, 465 AS	<i>Blastocladiella emersonii</i>	G1906032
αMPP_Hs	α-MPP, 528 AS	<i>Homo sapiens</i>	D21064
αMPP_Nc	α-MPP, 577 AS	<i>Neurospora crassa</i>	A36442
αMPP_Os	unvollständig, α-MPP, 122 AS	<i>Oryza sativa</i>	D25241
αMPP_Pf	α-MPP ?, 461 AS	<i>Plasmodium falciparum</i>	X56851
αMPP_Rn	α-MPP, 524 AS	<i>Rattus norvegicus</i>	A36205
αMPP_Sc	α-MPP, 482 AS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S05738
αMPP_Sp	α-MPP, 494 AS	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	O94745
αMPP1_St	α-MPP, 504 AS	<i>Solanum tuberosum</i>	S23558
αMPP2_St	α-MPP, 504 AS	<i>Solanum tuberosum</i>	S51590
Core I			
Core I_Bpt	Core I, 362 AS	<i>Bos prigenius taurus</i>	S16220
Core I_Bt	Core I, 480 AS	<i>Bos taurus</i>	G302
Core I_Ce	Core I, 471 AS	<i>Caenorhabditis elegans</i>	G1945498
Core I_Hs	Core I, 480 AS	<i>Homo sapiens</i>	I52367

Core I_Mm	unvollständig, Core I, 144 AS	<i>Mus musculus</i>	AA172512
Core I_Sc	Core I, 457AS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P07256
Core II			
Core II_Bpt	Core II, 453 AS	<i>Bos prigenius taurus</i>	S16221
Core II_Ce	Core II, 427 AS	<i>Caenorhabditis elegans</i>	G3800907
Core II_Eg	Core II, 475 AS	<i>Euglena gracilis</i>	D16672
Core II_Hii	Core II, 354 AS	<i>Haematobia irritans irritans</i>	G3098295
Core II_Hs	Core II, 453 AS	<i>Homo sapiens</i>	A32629
Core II_Nc	Core II, 454 AS	<i>Neurospora crassa</i>	E286572
Core II_Rn	Core II, 452 AS	<i>Rattus norvegicus</i>	S29510
Core II_Sc	Core II, 368 AS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P07257
Core II_Sp	Core II, 426 AS	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	P78761
SPP			
SPP_At	Stroma-Prozessierungsprotease, 1265 AS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	T03302
SPP_Ps	Stroma-Prozessierungsprotease, 1259 AS	<i>Pisum sativum</i>	U25111
NRDC			
NRDC_Hs	NRD-Konvertase, 1147 As	<i>Homo sapiens</i>	G2897867
NRD1C_Hs	NRD-Konvertase, 1151 AS	<i>Homo sapiens</i>	E1187379
NRD2C_Hs	NRD-Konvertase, 1219 AS	<i>Homo sapiens</i>	E1187381
NRDC_Rn	NRD-Konvertase, 1162 AS	<i>Rattus norvegicus</i>	L27124
NRD2C_Rn	NRD-Konvertase, 1229 AS	<i>Rattus norvegicus</i>	E1187393
IDE			
IDE_Dm	Insulin-Degrading Enzyme, 990 AS	<i>Drosophila melanogaster</i>	A372554
IDE_Hs	Insulin-Degrading Enzyme, 1019 AS	<i>Homo sapiens</i>	A40119
IDE_Rn	Insulin-Degrading Enzyme, 1019 AS	<i>Rattus norvegicus</i>	S29509
andere eukaryotische Proteine			
AXL1_Sc	AXL1-Protein, 1208 AS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S56037
Seq1_At	unbekannte Funktion, 970 AS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	G2335108
Seq1_Ce	unbekannte Funktion, 745 AS	<i>Caenorhabditis elegans</i>	U23180
Seq2_Ce	unbekannte Funktion, 847 AS	<i>Caenorhabditis elegans</i>	U55372
Seq3_Ce	unbekannte Funktion, 845 AS	<i>Caenorhabditis elegans</i>	G1280108
Seq4_Ce	unbekannte Funktion, 980 AS	<i>Caenorhabditis elegans</i>	G1280107
Seq5_Ce	unbekannte Funktion, 1067 AS	<i>Caenorhabditis elegans</i>	G2291181
SDP_Eb	Sporozoite Developmental Protein, 596 AS	<i>Eimeria bovis</i>	P42789
STE23_Sc	STE23-Protein, 988 AS	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	S55945
PP_Sp	putative Protease, 969 AS	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	E1314271
eubakterielle Proteine			
Pit_Ec	Pitrilysin, 962 AS	<i>Escherichia coli</i>	A29093
PP_Aa	putative Protease, 433 AS	<i>Aquifex aeolicus</i>	A70410
PP_Bs	putative Protease, 409 AS	<i>Bacillus subtilis</i>	Q04805
PP_Bb	putative Protease, 933 AS	<i>Borrelia burgdorferi</i>	G70166
PP_Ct	putative Protease, 974 AS	<i>Chlamydia trachomatis</i>	A71466
PP_Cp	putative Protease, 974 AS	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	A72012
PP1_Ec	putative Protease, 714 AS	<i>Escherichia coli</i>	P31828
PP2_Ec	putative Protease, 931 AS	<i>Escherichia coli</i>	A64903
PP1_Hp	putative Protease, 443 AS	<i>Helicobacter pylori</i>	D71935
PP2_Hp	putative Protease, 444 AS	<i>Helicobacter pylori</i>	D64646
PP_Ml	putative Protease, 445 AS	<i>Mycobacterium leprae</i>	E335028
PP_Mt	putative Protease, 438 AS	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	E70883
PP1_Stc	putative Protease, 459 AS	<i>Streptomyces coelicolor</i>	E1315261

PP2_Stc	putative Protease, 450 AS	<i>Streptomyces coelicolor</i>	E1202335
PPh_Bs	Prozessierungsprotease homologes Protein, 415 AS	<i>Bacillus subtilis</i>	G69885
PqqF_Kp	PqqF, 761 AS	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	P27508
PqqF_Kp	PqqF, 829 AS	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	S58241
Seq1_Bs	427 AS	<i>Bacillus subtilis</i>	Z80360
Seq1_Cp	942 AS	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	B72015
Seq1_Ct	956 AS	<i>Chlamydia trachomatis</i>	B71468
Seq1_Hi	926 AS	<i>Haemophilus influenzae</i>	E64171
Seq1_Me	709 AS	<i>Methylobacterium extorquens</i>	L43135
Seq1_Mf	426 AS	<i>Mycobacterium fortuitum</i>	L25634
Seq1_Rc	421 AS	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	RC00241
Seq1_Rhs	512 AS	<i>Rhizobium</i> sp.	G2182690
Seq1_Rip	413 AS	<i>Rickettsia prowazekii</i>	C71733
Seq1_Rsp	419 AS	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	/
Seq1_Sys	428 AS	<i>Synechocystis</i> sp.	D64001
Seq2_Sys	430 AS	<i>Synechocystis</i> sp.	D90908
Seq_Stp	429 AS	<i>Streptococcus pyogenes</i>	G3426365
Seq_Tm	412 AS	<i>Thermotoga maritima</i>	B72264
Proteine von Archae			
Seq1_Ap	403 AS	<i>Aeropyrum pernix</i>	/

Tabelle 6 (Seiten 80-82): Auflistung der in Stammbaumberechnungen einbezogenen Mitglieder der Pitrilysinfamilie

4.1 Phylogenetische Beziehungen zwischen eukaryotischen Vertretern der Pitrilysinfamilie

Die eukaryotischen Vertreter der Pitrilysinfamilie werden in einem Stammbaum (Abb. 30) zwei großen Ästen zugeordnet. Auf dem einen Ast liegen die ‚Insulin Degrading Enzymes‘, die NRD-Konvertasen, das ‚Sporozoite Developmental Protein‘ von *Eimeria Bovis*, sowie die Proteasen AXL1 und Ste23 aus *Saccharomyces cerevisiae* und einige Proteinsequenzen mit bislang unbekannter Funktion. Allen Sequenzen gemeinsam ist eine vollständige inverse Zinkbindedomäne, HXXEH. Genau 77 Aminosäurreste in Richtung C-Terminus vom inversen Zinkbindemotiv entfernt liegt der für die Aktivität essentielle Glutaminsäurerest, der lediglich beim ‚Sporozoite Developmental Protein‘ von *Eimeria Bovis* an Position 75 nach dem Zinkbindemotiv liegt. Diese Sequenz fällt außerdem auf, weil sie mit einer Länge von 596 Aminosäureresten wesentlich kürzer ist als alle anderen Sequenzen auf diesem Ast, welche Längen zwischen 745 und 1208 Aminosäureresten besitzen. Im Bereich der inversen Zinkbindedomäne sind alle Aminosäuresequenzen relativ stark konserviert. Innerhalb funktionell gleicher oder ähnlicher Sequenzen aus verschiedenen Organismen sind zusätzliche Sequenz-

bereiche konserviert, deren Bedeutung bisher aber nicht bekannt ist. Beispielsweise besitzen die NRD-Konvertasen 140 Aminosäurereste vom N-Terminus entfernt eine ungewöhnliche Abfolge von 8 bzw. 9 Glutaminsäureresten im Fall der NRD-Konvertasen von *Homo sapiens* und 19 Glutaminsäureresten im Fall der NRD-Konvertase von *Rattus norvegicus*, die nur durch einen anderen Aminosäurerest unterbrochen wird.

Den zweiten großen Ast bilden die Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsproteasen, die Core-Proteine und die Stroma-Prozessierungsproteasen von *Arabidopsis thaliana* und *Pisum sativum*. Die beiden Sequenzen der Stroma-Prozessierungsproteasen liegen an der Basis dieses Astes. Die Sequenzhomologie zu anderen Proteinen des gesamten Stammbaumes ist relativ gering. Mit einer Sequenzlänge von 1265 und 1259 Aminosäureresten sind die beiden Sequenzen mehr als doppelt so lang wie die Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease und die Core-Proteine. Der C-terminale Bereich der Stroma-Prozessierungsproteasen weist weder signifikante Sequenzhomologie zum C-Terminus der Sequenzen auf dem anderen großen Ast auf, die eine vergleichbare Länge besitzen, noch zu anderen in Datenbanken eingetragenen Sequenzen.

Gemeinsam auf einem zweigeteilten Teilstück liegen die β -MPP-Untereinheiten und Core I-Proteine sowie die α -MPP-Untereinheiten.

Tiefer zweigen die Core II-Proteine in unterschiedlich abgestuften Ähnlichkeiten zu den Core I-Proteinen und MPP-Untereinheiten ab.

Die Signifikanz der Verzweigungen ist insgesamt hoch. Auf Grund der vorliegenden Daten können die Sequenzen dieses Stammbaumes in mindestens drei Unterfamilien eingeteilt werden. Eine Unterfamilie ist die der MPP-artigen Proteine, denen alle Sequenzen mit hoher Identität zu den β -Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsproteasen zugeordnet werden. Die beiden anderen Unterfamilien sind die Familie der Stroma-Prozessierungsproteasen und die Insulinase-Familie, welcher die ‚Insulin Degrading Enzymes‘ und verwandte ‚lange Proteine‘ zugeordnet werden können. Dabei sind offensichtlich die Familie der MPP-artigen Proteine und die Familie der Stroma-Prozessierungsprotease enger miteinander verwandt als eine dieser Unterfamilien mit der Insulinase-Familie.

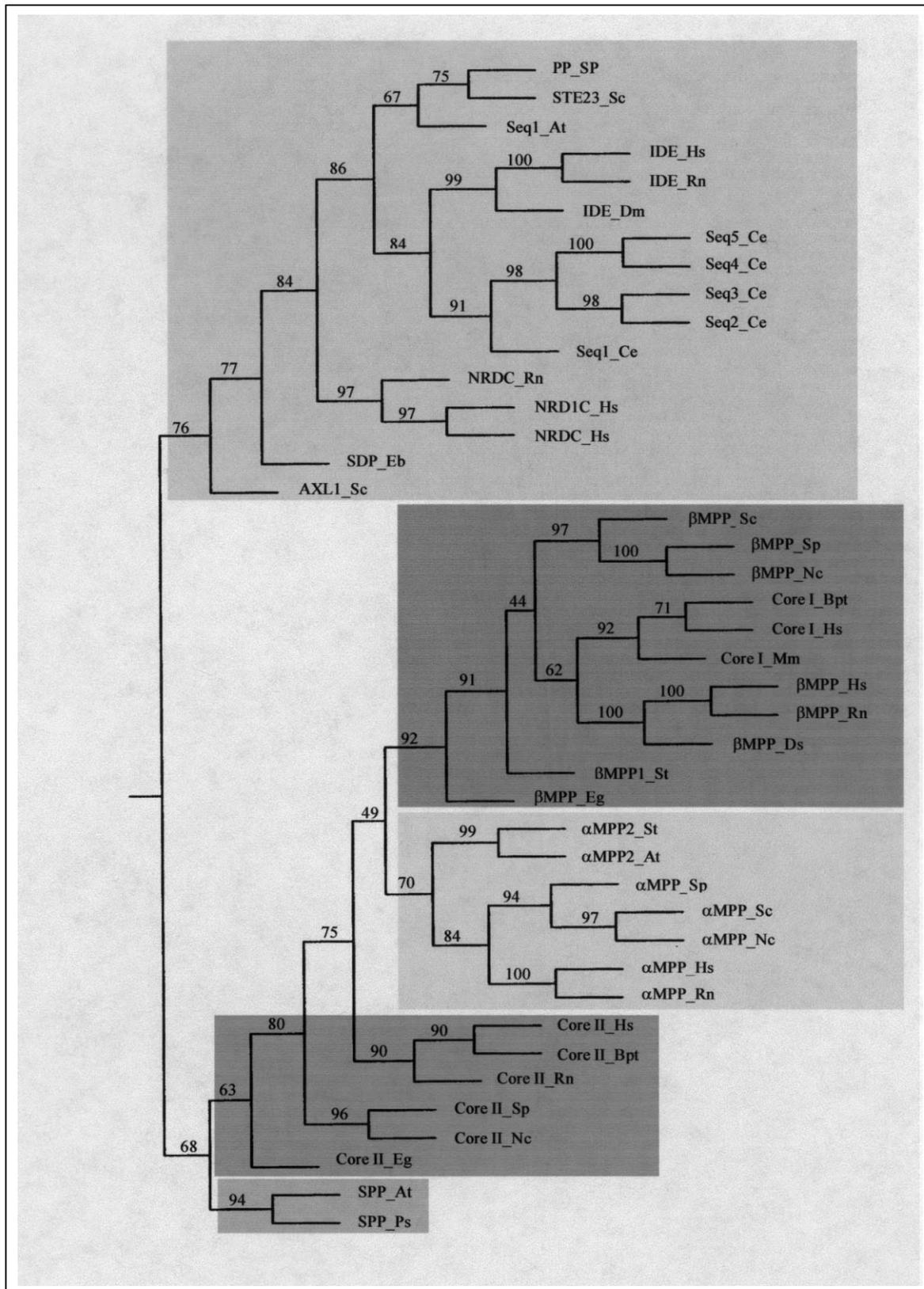


Abbildung 30: Phylogenetische Beziehungen zwischen eukaryotischen Mitgliedern der Pitriylsinfamilie. Die Nummern im Stammbaum geben die Häufigkeiten an, mit der eine Verzweigung in 100 analysierten Stammbäumen errechnet wurde. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erklärt. Teiläste des Stammbaums sind in verschiedenen Graustufen unterlegt.

4.2 Stammbaum eubakterieller Vertreter der Pitrilysinfamilie

Alle in die Stammbaumberechnung eingegangenen bakteriellen Sequenzen besitzen eine vollständige inverse Zinkbindedomäne.

Auf der Grundlage des multiplen Sequenzalignments und dem daraus erstellten Stammbaum können die analysierten eubakteriellen Vertreter der Pitrilysinfamilie im wesentlichen zwei Gruppen zugeordnet werden (Abb. 31), deren Mitglieder sich sehr deutlich in der Länge der Sequenzen unterscheiden. Sequenzen aus der einen Gruppe haben eine Länge von ca. 500 Aminosäureresten, wobei die andere Gruppe Proteine mit Längen zwischen 714 und 962 Aminosäureresten beinhaltet. Die kürzeren Proteine liegen im oberen Bereich des Stammbaums in Abbildung 31. Bei diesen Proteinen ist die Position des essentiellen Glutaminsäurerestes konserviert und liegt 76 Aminosäurereste vom inversen Zinkbindemotiv entfernt. Von den Sequenzen im oberen Bereich des Stammbaumes abgestuft ist eine putative Protease-sequenz von *Streptomyces coelicolor* (PP2_Stc). Bei ihr liegt der essentielle Glutaminsäurerest an Position 78 nach dem inversen Zinkbindemotiv. Die Sequenzen im oberen Stammbaumbereich sind deutlich Teilästen zugeordnet. Sequenzen einer Bakteriengruppe oder der gleichen Art liegen teilweise auf unterschiedlichen Teilästen. Dies betrifft zum Beispiel Proteine der α -Proteobakterien. Andererseits sind den Teilästen jeweils Proteine einer Bakteriengruppe zugeordnet. Offensichtlich existieren in dieser Unterfamilie von Proteinen mit inversen Zinkbindedomänen mehrere Proteingruppen mit möglicherweise ganz unterschiedlichen Funktionen.

Die Proteine der zweiten Gruppe sind mehreren Ästen mit unterschiedlich abgestuften Ähnlichkeiten zu den kürzeren Sequenzen zugeordnet. Auf den Teilästen, denen die ‚längeren‘ Sequenzen zugeordnet sind, liegen ebenfalls die Proteine aus einer Bakteriengruppe. Die Position des essentiellen Glutaminsäurerestes ist bei den Proteinen der einzelnen Teiläste konserviert.

Insgesamt ist die Beurteilung des Stammbaumes problematisch, da der Abstand zwischen rezenten Eubakterien, auf Grund der verkürzten Generationszeit und früheren Abspaltung der Eubakterien voneinander, wesentlich größer ist, als der Abstand zwischen rezenten Eukaryoten (Woese et al., 1990). Hinzu kommt, daß Bakterien aus einer Familie teilweise sehr unterschiedliche ökologische Nischen besetzen und demzufolge einem anderen Selektionsdruck ausgesetzt waren.

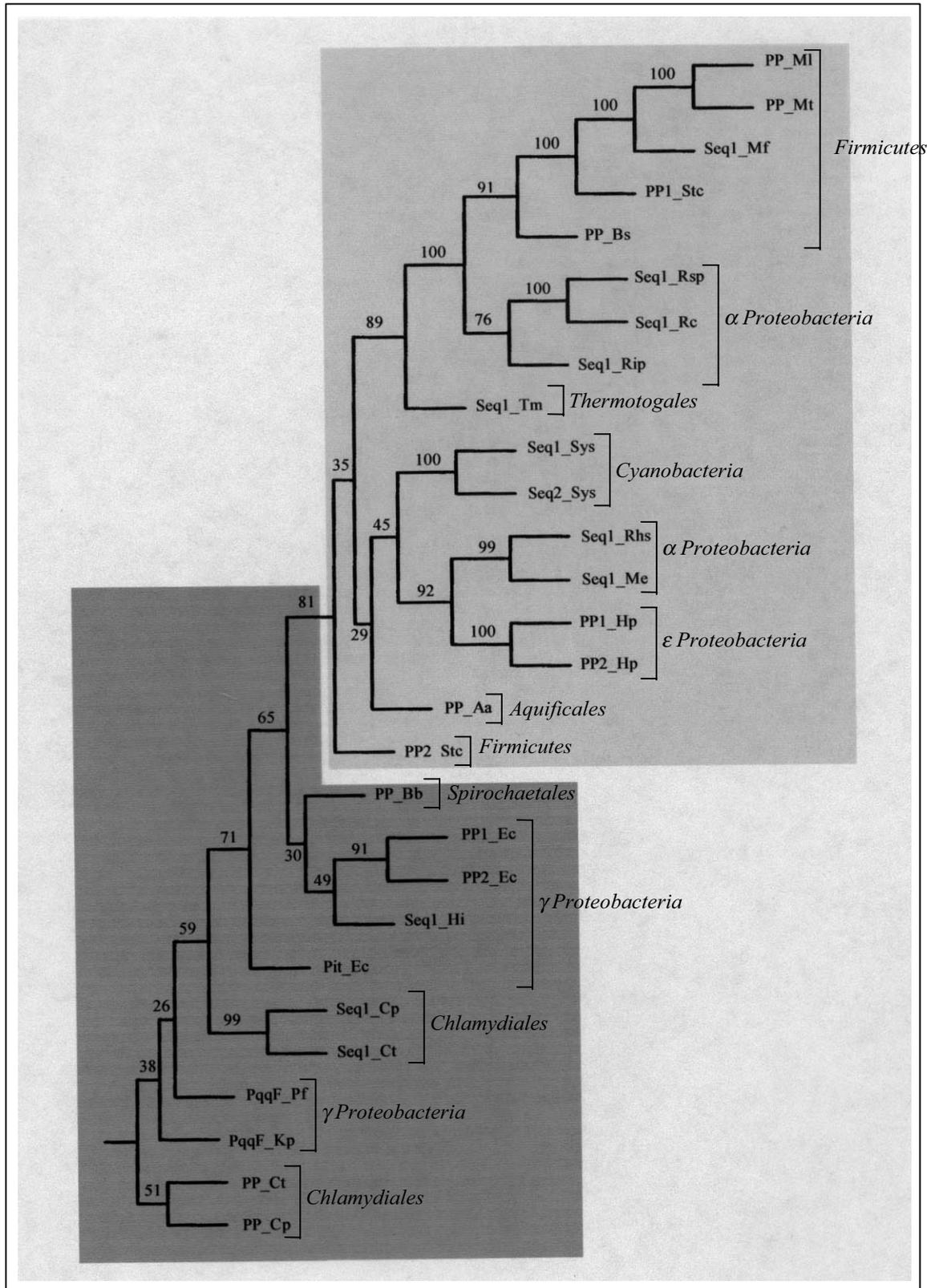


Abbildung 31: Stammbaum mit eubakteriellen Vertretern der Pitrilysinfamilie. Die Gruppe der ‚kürzeren‘ (oben) bzw. ‚längeren‘ (unten) Sequenzen sind in verschiedenen Graustufen unterlegt. Die Nummern im Stammbaum geben die Häufigkeiten an, mit der eine Verzweigung in 100 analysierten Stammbäumen errechnet wurde. Hinter den Teilästen des Stammbaums sind die Namen der Bakteriengruppen angegeben, aus welchen die Sequenzen stammen. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erklärt.

4.3 Phylogenetische Beziehungen von eubakteriellen, eukaryotischen und archae Vertretern der Pitrilysinfamilie

In diesem Kapitel sollen die phylogenetischen Beziehungen zwischen Vertretern der Pitrilysinfamilie der drei Urreiche, Eukarya, Eubacteria und Archaea, näher bestimmt werden. Dazu wurde aus repräsentativen Vertretern der Pitrilysinfamilie von Eubakterien und Eukaryoten sowie einer Sequenz, die aus einem offenen Leserahmen im Genom des Archae, *Aeropyrum pernix* abgeleitet wurde, ein Stammbaum erstellt. Die Sequenz der putativen Protease aus *Aeropyrum pernix* ist bislang die einzige in Datenbanken eingetragene Sequenz aus einem Archaeobakterium mit signifikanter Homologie zu Proteinen der Pitrilysinfamilie. Die Sequenzen eukaryotischen und eubakteriellen Ursprungs wurden auf der Grundlage ihrer Position in den Einzelstammbäumen ausgewählt.

Der Gesamtstammbaum (Abb. 32) spiegelt im wesentlichen das Bild des Stammbaums für die eukaryotischen Vertreter wider. Auf einem Ast liegen die ‚Insulin Degrading Enzymes‘, die NRD-Konvertasen sowie die Proteasen AXL1 und Ste23 aus *Saccharomyces cerevisiae*. Diesem Ast wird nur ein eubakterielles Protein, das Pitrilysin aus *E. coli*, zugeordnet. Bei allen Sequenzen dieses Astes befindet sich der essentielle Glutaminsäurerest 77 Aminosäurereste vom inversen Zinkbindemotiv in Richtung C-Terminus entfernt.

Auf dem zweiten großen Ast liegen die MPP-artigen Proteine, die Stroma-Prozessierungsproteasen sowie weitere eubakterielle Proteine. Zu den MPP-artigen Proteinen diese Astes sind die Untereinheiten der Prozessierungsprotease, die Core-Proteine, die ‚kurzen‘ putativen Proteasen der α -Proteobakterien und Firmicutes, das putative Protein des Archae *Aeropyrum pernix* und drei weitere Aminosäuresequenzen aus Eubakterien zu rechnen. Bei all diesen Sequenzen befindet sich der essentielle Glutaminsäurerest genau 76 Aminosäurereste in Richtung C-Terminus vom inversen Zinkbindemotiv entfernt. Im oberen Bereich teilt sich der Ast in zwei große Nebenäste. Die Untereinheiten der Prozessierungsprotease, die Core-Proteine und die ‚kurzen‘ putativen Proteasen der α -Proteobakterien und Firmicutes (gram-positive Bakterien) bilden einen großen zweigeteilten Ast. Auf einem der Teiläste liegen die Core I-Proteine, β -MPPs und die ‚kurzen‘ putativen Proteasen der α -Proteobakterien und Firmicutes, wobei letztere wiederum gemeinsam auf einem Nebenast liegen.

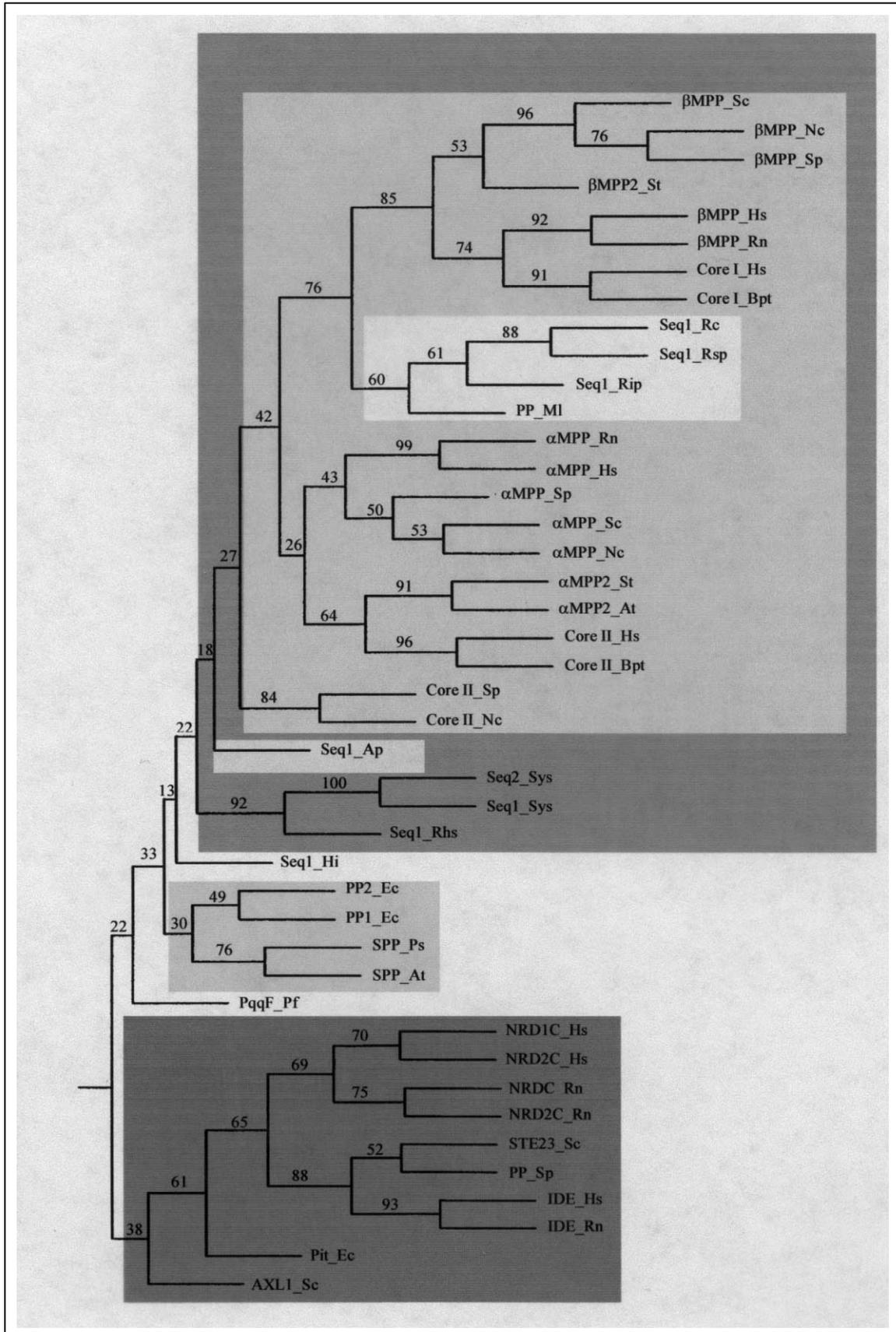


Abbildung 32 (vorherige Seite): Gesamtstammbaum, der die Beziehungen zwischen Vertretern der Pitrilysinfamilie der Eukaryoten, Eubakterien und einem putativen Protein aus *Aeropyrum pernix*, einem Archaeobakterium, aufzeigt. Die Nummern im Stammbaum geben die Häufigkeiten an, mit der eine Verzweigung in 100 analysierten Stammbäumen errechnet wurde. Mit verschiedenen Graustufen sind die Äste der drei Unterfamilien, Familie der MPP-artigen, Familie der Stroma-Prozessierungsproteasen und verwandte Sequenzen, Familie der Insulinasen und verwandte Sequenzen, unterlegt. Zusätzlich sind aus der Familie der MPP-artigen Vertreter nahe verwandte Sequenzen in Graustufen unterlegt. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erklärt.

Die Position einzelner Sequenzen in Stammbäumen kann durch das Hinzufügen oder Weglassen von anderen Sequenzen beeinflusst werden. Bei einem Austausch nur weniger Sequenzen zur Berechnung des Stammbaumes wurde die putative Protease von *Rickettsia prowazekii* gemeinsam mit den Core I-Proteinen und β -MPP-Sequenzen auf einem Teilstast eingeordnet (Abb. 33A) oder beim Austausch weiterer Sequenzen werden die putativen Proteasen von *Rhodobacter capsulatus* und *Rhodobacter sphaeroides* ebenfalls diesem Teilstast zugeordnet (Abb. 33B).

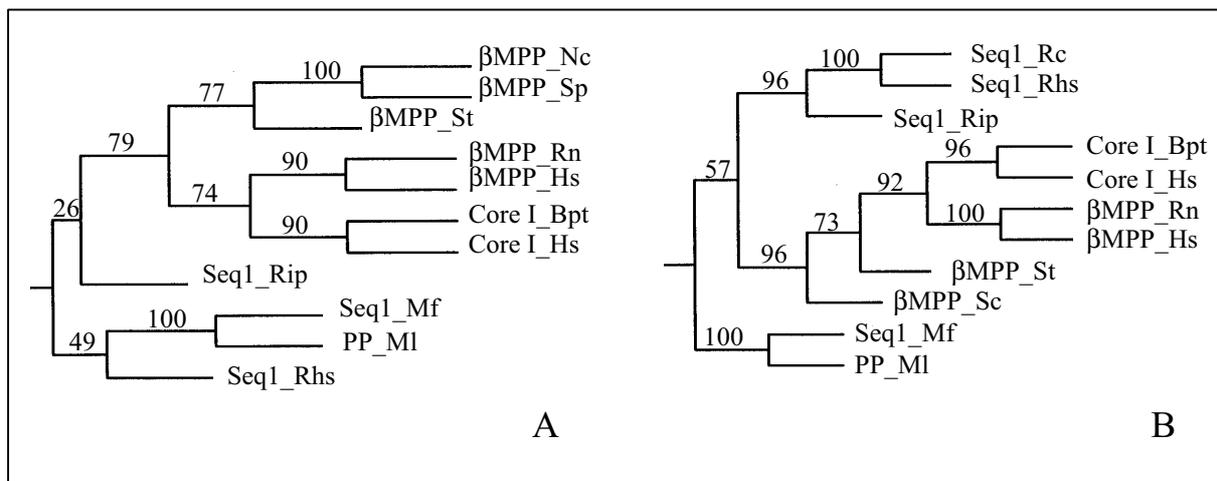


Abbildung 33: Ausschnitte aus Gesamtstammbäumen mit Vertretern der Pitrilysinfamilie aus Eukaryoten, Eubakterien und Archae. Gezeigt sind die Äste von Gesamtstammbäumen, auf welchen β -MPP-Untereinheiten, Core I-Proteinen sowie Sequenzen aus α -Proteobakterien und Firmicutes eingeordnet sind. A: Die putative Protease von *Rickettsia prowazekii* liegt gemeinsam mit den Core I-Proteinen und β -MPP-Untereinheiten auf einem Teilstast. B: Die Sequenzen der α -Proteobakterien sind gemeinsam mit den Core I-Proteinen und β -MPP-Untereinheiten auf einem Teilstast. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erklärt. Die Nummern im Stammbaum geben die Häufigkeiten an, mit der eine Verzweigung in 100 analysierten Stammbäumen errechnet wurde.

Die Core II-Proteine von *Homo sapiens* und *Bos prigenius taurus* liegen gemeinsam mit den α -MPPs auf dem zweiten Teilstast.

Der Teilst der Stroma-Prozessierungsproteasen liegt an der Wurzel des Astes. Auf diesem Teilst liegen zwei Aminosäuresequenzen von putativen Proteasen aus *Escherichia coli*.

Im wesentlichen bestätigt der Gesamtstammbaum die anhand des Stammbaums von eukaryotischen Vertretern getroffene Einteilung der Vertreter der Pitrilysinfamilie in mindestens drei Unterfamilien, wobei offensichtlich die Unterfamilie der MPP-artigen Proteine und die Unterfamilie der Stroma-Prozessierungsproteasen näher miteinander verwandt sind als beide Unterfamilien zu den Insulinasen und verwandten Sequenzen.

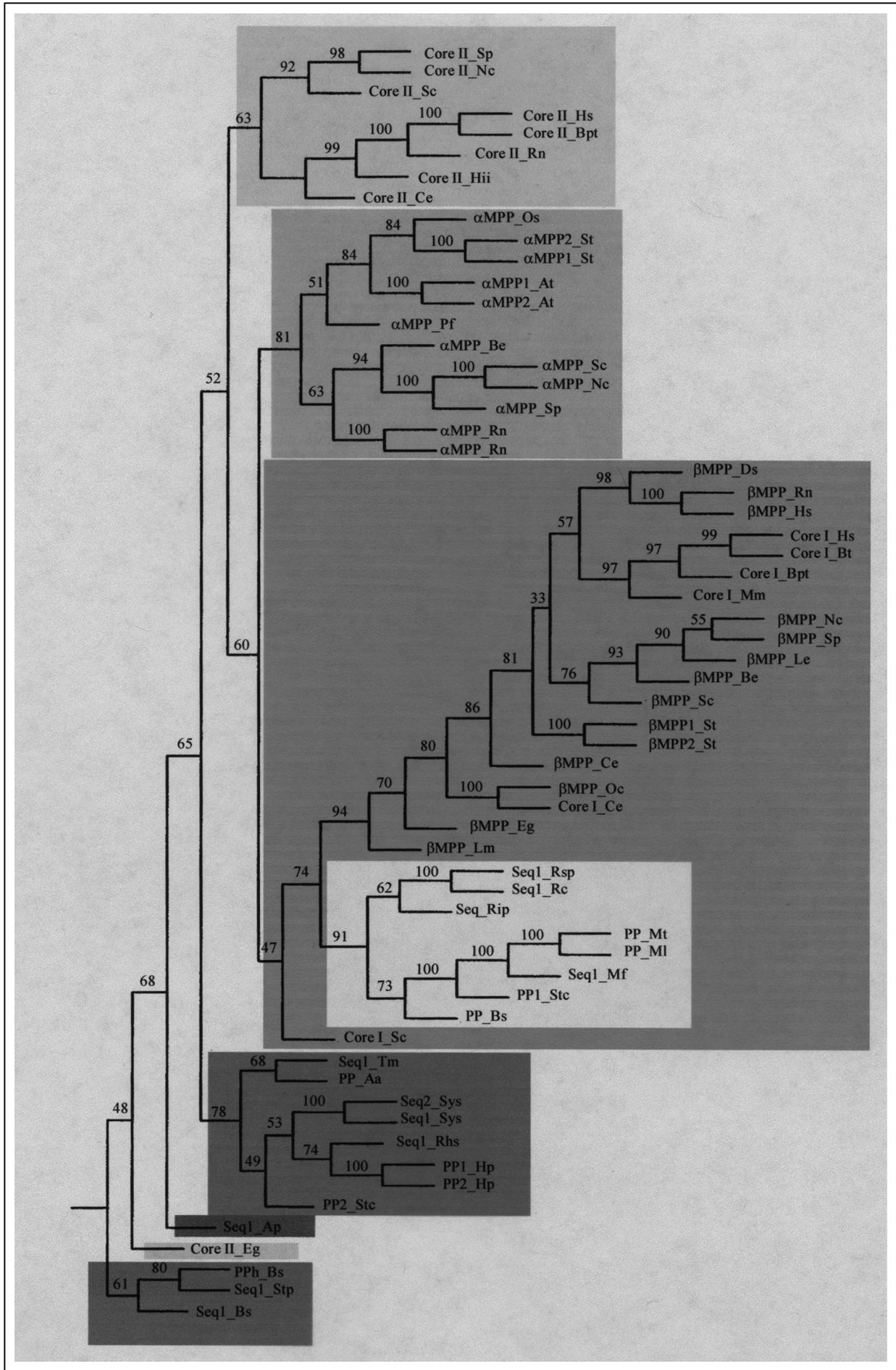
4.4 Stammbaum der Unterfamilie MPP-artiger Proteine

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, welche Unterfamilien innerhalb der Pitrilysinfamilie unterscheidbar sind und welche phylogenetischen Beziehungen zwischen den Unterfamilien bestehen. Außerdem wurden Merkmale in der Primärstruktur der Proteine erkannt, die helfen können, einzelne Sequenzen den drei Unterfamilien zuzuordnen.

Die phylogenetischen Beziehungen möglichst vieler Vertreter aus der Unterfamilie der MPP-artigen Proteine wurden im folgenden analysiert. Ziel dabei war es, die phylogenetisch engsten Verwandten der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease festzustellen. Dazu wurde mit 61 Vertretern dieser Unterfamilie ein multiples Alignment erstellt (Abb. 38 im Anhang), welches die Grundlage zur Berechnung eines Stammbaums bildete (Abb. 34). In dem Stammbaum liegen die Core I-Proteine und β -MPPs mit einer Gruppe eubakterieller Sequenzen auf einem gemeinsamen Ast. Diese Gruppe eubakterieller Sequenzen umfaßt drei Vertreter aus α -Proteobakterien, die bereits im Gesamtstammbaum diesem Teilst zugewordnet wurden und fünf Vertreter aus Firmicutes. Die Sequenz des Core I von *Saccharomyces cerevisiae* liegt an der Wurzel des Astes.

Alle α -MPPs wurden dem benachbarten Ast zugewordnet. Davon abgestuft ist ein Teilst mit Core II-Proteinen. Zwei weitere Gruppen eubakterieller Proteine, die Sequenz des Archae, *Aeropyrum pernix*, und das Core II von *Euglena gracilis* liegen auf tiefer abzweigenden Teilsten.

Abbildung 34 (folgende Seite): Phylogenetische Beziehungen zwischen MPP-artigen Proteinen aus Mitochondrien, Eubakterien und aus dem Archae, *Aeropyrum pernix*. Äste des Stammbaums sind mit verschiedenen Graustufungen unterlegt. Eine Gruppe von acht Proteinen aus α -Proteobakterien und Firmicutes ist den β -MPPs und Core I-Proteinen sehr ähnlich (hellgrau unterlegt). Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erklärt. Die Nummern im Stammbaum geben die Häufigkeiten an, mit der eine Verzweigung in 100 analysierten Stammbäumen errechnet wurde.



4.5 Phylogenetische Analyse der Core-Proteine und Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease

In die phylogenetische Analyse sind alle in Datenbanken publizierten MPP-Untereinheiten und Core-Proteine eingegangen. Der Sequenzvergleich verdeutlicht die charakteristischen Merkmale der Primärstruktur einzelner Sequenzgruppen. Beta-MPP-Untereinheiten besitzen eine vollständige inverse Zinkbindedomäne. Der essentielle Glutaminsäurerest befindet sich 76 Aminosäurereste in Richtung C-Terminus vom inversen Zinkbindemotiv entfernt. Die α -MPPs besitzen keine vollständige inverse Zinkbindedomäne, wobei der erste Histidinrest konserviert ist, der Glutaminsäurerest bei den Pilzen durch einen Asparaginsäurerest substituiert ist und der zweite Histidinrest entweder durch einen Argininrest oder Lysinrest substituiert ist. Abweichend davon ist die Aminosäuresequenz der α -MPP-Untereinheit von *Blastocladiella emersonii* in diesem Sequenzbereich. Charakteristisch für die α -MPPs ist das hochkonservierte hydrophobe Sequenzmotiv in der C-terminalen Hälfte der Proteine, mit der Konsensussequenz LQXLXGGGGSFSXGGPGKG. Den α -MPPs wird eine Sequenz von *Plasmodium falciparum* zugeordnet. Dieses Sequenz besitzt das hydrophobe Sequenzmotiv, ähnelt den α -MPPs aber wenig im Bereich der inversen Zinkbindedomäne.

Die Core-Proteine haben ebenfalls keine vollständige inverse Zinkbindedomäne, wobei ein Vergleich des entsprechenden Bereiches der Sequenzen von Core I- und Core II-Proteinen aus jeweils dem gleichen Organismus zeigt, daß die inverse Zinkbindedomäne bei den Core I-Proteinen besser erhalten ist. Eine Ausnahme davon bilden die Core-Proteine von *Saccharomyces cerevisiae*.

Der aus dem Sequenzvergleich erstellte Stammbaum gliedert sich in zwei große Teiläste auf, ein Ast mit den β -MPP-Untereinheiten und den Core I-Proteinen, ein zweiter mit den α -MPP-Untereinheiten (Abb. 35).

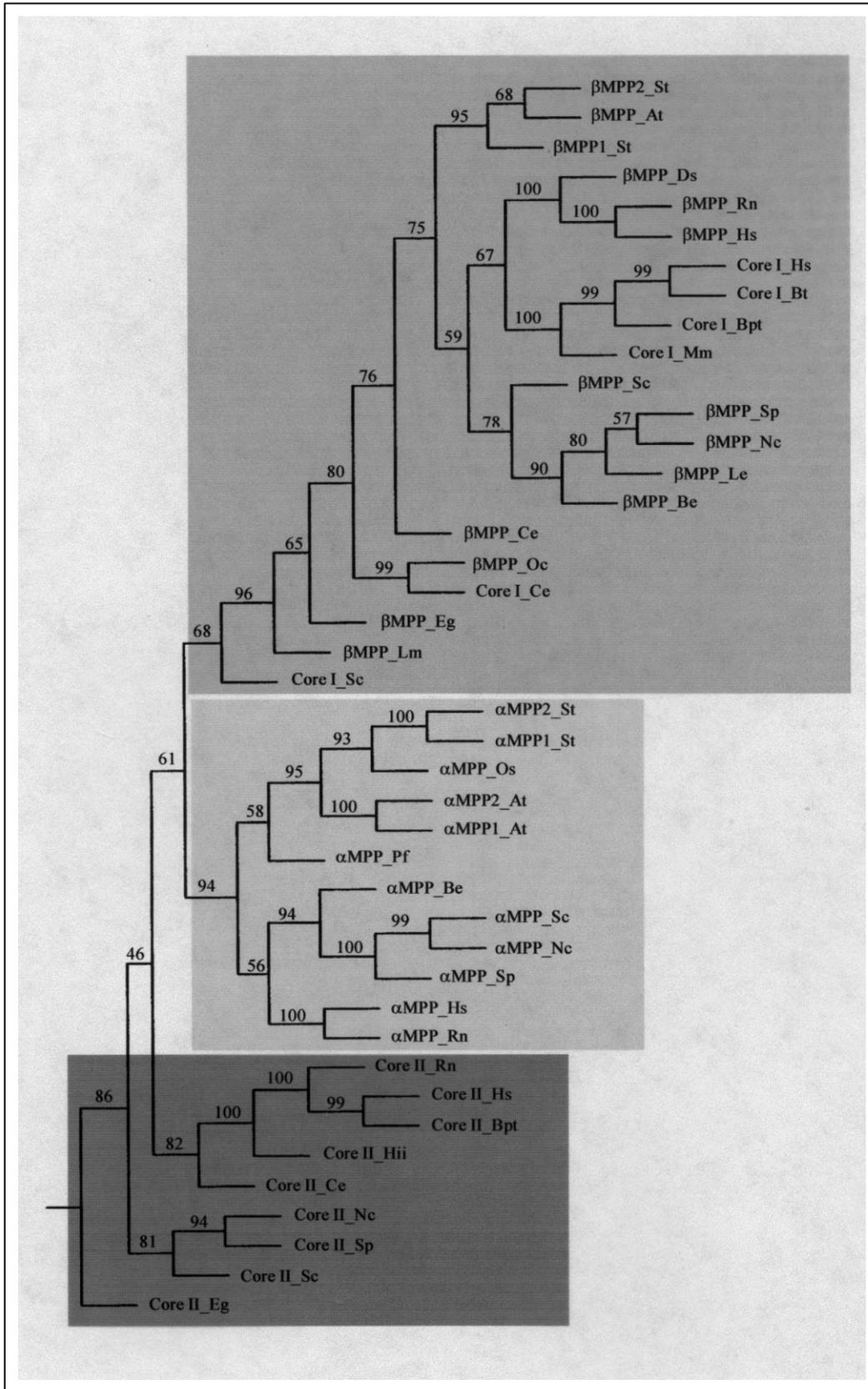


Abbildung 35: Stammbaum aller MPP-Untereinheiten und Core-Proteine. Die β -MPP-Untereinheiten und Core I-Proteinen sowie die α -MPPs und die Core II-Proteine sind in verschiedenen Graustufen unterlegt. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erklärt. Die Nummern im Stammbaum geben die Häufigkeiten an, mit der eine Verzweigung in 100 analysierten Stammbäumen errechnet wurde.

Auf dem Ast der β -MPP-Untereinheiten und Core I-Proteine liegt der Teilast der Sequenzen von Tieren näher am Teilast der Sequenzen aus Pilzen als am Teilast der Sequenzen aus Pflanzen. Die phylogenetischen Beziehungen der β -MPP-Untereinheiten spiegeln die Evolutionsverwandtschaft zwischen den Organismen wider. Die β -MPP-Untereinheiten der Mammalia sind näher mit den Core I-Proteinen der Mammalia verwandt als mit den β -MPPs der Pilze. In abgestuften Ähnlichkeiten zweigen die β -MPP-Untereinheiten und Core I-Proteinen der Nematoden, die β -MPP-Untereinheiten von *Euglena gracilis* und *Leishmania major* und das Core I von *Saccharomyces cerevisiae* vom Ast der β -MPP-Untereinheiten und Core I-Proteine ab.

Innerhalb der α -MPPs zeigt sich dieselbe Zuordnung der Teiläste wie bei den β -MPPs.

Sehr tief zweigen die Core II-Proteine in abgestuften Ähnlichkeiten vom Stammbaum ab, wobei die Core II-Proteine der Tiere den übrigen Sequenzen ähnlicher sind als die der Pilze. Die Ähnlichkeit der Core II-Proteine zu den α -MPPs ist insgesamt geringer als die Ähnlichkeit der Core I-Proteine zu den β -MPPs.

An der Basis des Stammbaums liegt die Core II-Sequenz von *Euglena gracilis*.

V. Diskussion

1. Die Cytochrom c Reduktasen aus niederen Pflanzen

In der vorliegenden Dissertation erfolgte erstmals eine vergleichende Analyse von Cytochrom c Reduktasen aus verschiedenen niederen Pflanzen hinsichtlich ihrer Untereinheitenkomposition und Prozessierungsaktivität.

Die Cytochrom c Reduktase-Komplexe aus dem Geweihfarn, *Platyserium bifurcatum*, dem Ackerschachtelhalm, *Equisetum arvense*, und der zu den Chlorophyta zählenden, chloroplastenfreien Alge, *Polytomella* spp., konnten über ein Mikroisoliationsverfahren, welches auf BN-PAGE und Elektroelution beruht, aus geringen Mengen an Ausgangsmaterial aufgereinigt werden. Aus *Equisetum arvense* und *Polytomella* spp. wurden dabei die Cytochrom c Reduktase-Komplexe in sehr reiner Form gewonnen, die Präparation des Komplexes aus *Platyserium bifurcatum* hingegen enthielt einige Untereinheiten der F₀F₁-ATP-Synthase als Verunreinigungen.

Untersuchungen an der Cytochrom c Reduktase wurden bisher intensiv an den Komplexen aus Rind, Hefe und Kartoffel vorgenommen (Schägger et al., 1986; Brand et al., 1994; Braun & Schmitz, 1995c). Alle drei Komplexe enthalten 10 Untereinheiten: drei respiratorische Proteine, zwei große Core-Proteine und fünf kleine Polypeptide. Zusätzlich enthält der Komplex aus Rind die Leitsequenz des Eisen-Schwefel-Proteins als elfte Untereinheit (Borchart et al., 1985; Brandt et al., 1993; Iwata et al., 1998). Für die Cytochrom c Reduktase aus *Equisetum arvense* konnten nun ebenfalls 10 Untereinheiten nachgewiesen werden, deren Größen denen der Untereinheiten des Komplexes aus Kartoffel ähneln. Auch der Komplex aus *Polytomella* spp. besitzt die gleiche Untereinheitenzahl (Gutiérrez-Cirlos et al., 1994). Ein Vergleich der Untereinheitenkomposition von Cytochrom c Reduktasen aus diesen sehr unterschiedlichen Organismen verdeutlicht, daß die komplexe Organisation der Cytochrom c Reduktasen innerhalb der Eukaryoten stark konserviert ist und sich wahrscheinlich sehr früh in der Evolution der eukaryotischen Zelle entwickelt hat.

Die Elektronen-Transfer-Aktivitäten der über BN-PAGE und Elektroelution aufgereinigten Cytochrom c Reduktasen aus *S. tuberosum*, *P. bifurcatum*, *E. arvense* und *Polytomella* spp. wurden nicht gemessen, allerdings kann auf Grund der folgenden Daten angenommen werden, daß die Komplexe intakt und aktiv sind. (i) Das Eisen-Schwefel-Protein, eine Untereinheit, die sehr leicht vom Cytochrom c Reduktase-Komplex dissoziieren kann, ist in allen vier Komplexen durch Immunfärbung bzw. direkte Sequenzierung nachgewiesen worden. Die

Dissoziation des Eisen-Schwefel-Proteins hätte die Inaktivierung der Elektronentransferaktivität zur Folge. (ii) Das apparente Molekulargewicht der Cytochrom c Reduktase-Komplexe von *S. tuberosum*, *P. bifurcatum* und *E. arvense* wurde in Blau-Nativen-Gelen mit ca. 500 kDa ermittelt. Dies entspricht den Molekulargewichten, die für die intakten dimeren Komplexe aus Hefe und Rind unter identischen Bedingungen festgestellt wurden (Schägger et al., 1994).

Die mitochondriale Prozessierungsprotease von Hefe, *N. crassa*, und Ratte ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert (Hawlitschek et al., 1988; Yang et al., 1988; Ou et al., 1989). Im Gegensatz dazu ist die Aktivität der mitochondrialen Prozessierungsproteasen von Kartoffel, Weizen und Spinat an den Cytochrom c Reduktase-Komplex gebunden (Braun et al., 1992; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995). Diese experimentellen Daten sind im Einklang mit der Tatsache, daß die Core I-Untereinheiten der Cytochrom c Reduktasen aus höheren Pflanzen eine vollständige Metallbindedomäne besitzen und die Core II-Untereinheiten, die für die α -MPPs charakteristische hydrophobe Domäne aufweisen. Um festzustellen, ob die Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktasen von höheren Pflanzen ein generelles, aus Sicht des Modells zur Co-Evolution der mitochondrialen Prozessierungsprotease und Cytochrom c Reduktase (Braun & Schmitz, 1995b) ursprüngliches Merkmal von allen Pflanzen ist, wurde die Prozessierungsaktivität der Cytochrom c-Reduktasen aus den drei niederen Pflanzen *P. bifurcatum*, *E. arvense* und *Polytomella* spp. überprüft. Das Ergebnis des Prozessierungsenzymtests war überraschend. In Übereinstimmung mit den Daten von höheren Pflanzen besitzen die Cytochrom c Reduktasen des Farns *P. bifurcatum* und des Schachtelhalmes *E. arvense* Prozessierungsaktivität. Für den Proteinkomplex der chloroplastenfreien Alge, *Polytomella* spp. konnte jedoch keine proteolytische Aktivität nachgewiesen werden. Im Sinne des von Braun und Schmitz (1995b) aufgestellten Modells zur Co-Evolution der mitochondrialen Prozessierungsprotease und Cytochrom c Reduktase lassen sich diese Ergebnisse folgendermaßen interpretieren. MPP ist ein Heterodimer, dessen Untereinheiten in den ursprünglichen Mitochondrien Teil des Cytochrom c Reduktase-Komplexes waren. Die Situation ist in allen grünen Pflanzen erhalten. Eine Duplikation des α -*mpp*-Gens führte zur Entstehung des Core II und die Duplikation des β -*mpp*-Gens war der Auslöser zur Entstehung des Core I. Beide Genduplikationen fanden in den Säugetieren und in Hefe statt, aber nur eine Genduplikation ereignete sich in *Neurospora crassa*, *Euglena gracilis* und *Polytomella* spp.. In Anbetracht der Phylogenie der Eukaryoten müssen sich diese Genduplikationen einige Male unabhängig voneinander ereignet haben (Brumme et al., 1998). Diese Theorie wird durch die Tatsache gestützt, daß sich im Verlauf der Evolution ganze Genomduplikationen

von Eukaryoten, beispielsweise bei Hefe und Vertebraten ereigneten (Spring, 1997; Wolfe et al., 1997). Dennoch bleibt die Frage, warum es nur bei einem Teil der Organismen zu einer Ablösung der MPP-Untereinheiten von der Cytochrom c Reduktase kam. Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der Tatsache, daß insbesondere bei Cytochrom c Reduktasen von Organismen mit Chloroplasten die Core-Proteine identisch mit den Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsproteasen sind. Vermutlich hat das Vorkommen der Chloroplasten, eines zweiten Organellentyps, der am Energiehaushalt beteiligt ist, einen veränderten Selektionsdruck auf die Mitochondrien zur Folge (Brumme et al., 1998).

Argumente, die sich mit dieser Interpretation nicht vereinbaren lassen, sind weiter unten aufgeführt.

2. Cytochrom c Reduktasen von Protisten – spiegeln sie Zwischenstadien in der Evolution der komplexen Cytochrom c Reduktasen höherer Eukaryoten wider?

Die komplexe Organisation der Cytochrom c Reduktase von Eukaryoten ist nach heutigem Wissensstand offensichtlich stark konserviert und hat sich bereits sehr früh in der Evolution der Eukaryoten entwickelt (Kapitel V/1.). Im Gegensatz dazu sind die Cytochrom c Reduktasen aus Bakterien mit nur drei bis vier Untereinheiten wesentlich einfacher organisiert. Zur Aufklärung der Ursachen für diesen quantitativen Sprung in der Komplexität der Cytochrom c Reduktase sind die Strukturen von Cytochrom c Reduktasen aus sehr früh in der Evolution von den Haupteukaryotenlinien abzweigenden Organismen, beispielsweise *Reclinomonas*, *Malawinomas* oder *Jacoba*, Protisten aus der Gruppe der Jacobids, besonders interessant. Die Ursachen für die Entstehung der komplexen Cytochrom c Reduktasen von Eukaryoten stehen in unmittelbarem Zusammenhang mit der Co-Evolution der mitochondrialen Prozessierungsprotease und der Cytochrom c Reduktase.

Vorarbeiten zur Isolation der Cytochrom c Reduktase aus *Reclinomonas americana* sind bereits geleistet worden. Es wurden Mitochondrien aus *R. americana* isoliert und mitochondriale Proteinkomplexe über BN-PAGE aufgetrennt. Auf Grund der Untereinheitenkomposition zweier Proteinkomplexe kann vermutet werden, daß es sich bei einem der Komplexe um die Cytochrom c Reduktase handelt. Da dieser Komplex im BN-Gel offensichtlich gemeinsam mit einem weiteren Komplex, wahrscheinlich der F_0F_1 -ATP-Synthase, in einer Bande aufgetrennt wird, ist eine zweifelsfreie Zuordnung der Untereinheiten bisher nicht möglich gewesen. Beide Enzymkomplexe enthalten potentiell Untereinheiten mit Größen von ca. 50 kDa. Im Fall der F_0F_1 -ATP-Synthase sind es die α - und die β -Untereinheiten und im Fall der

mitochondrialen Prozessierungsprotease handelt es sich um α -MPP und β -MPP. Anhand von zweiten Geldimensionen sind mindestens zwei Proteine mit Größen von ca. 50 kDa unterscheidbar, die Bestandteile der beiden Proteinkomplexe sein könnten. Ob es sich bei diesen Proteinen um die Core-Proteine der Cytochrom c Reduktase handelt, kann auf Grund des aktuellen Kenntnisstandes nicht entschieden werden. Die geplante Isolation und Charakterisierung der Cytochrom c Reduktase aus *R. americana* wird dies aufklären und damit neue Einblicke in die Co-Evolution der mitochondrialen Prozessierungsprotease und der Cytochrom c Reduktase erlauben.

3. Die charakteristische hydrophobe Domäne der α -MPPs

Alpha-MPPs besitzen in der C-terminalen Hälfte eine ca. 20 Aminosäurereste lange hydrophobe Domäne mit der Konsensussequenz LQXLXGGGGSF β SXGGPGKG. Da diese Domäne charakteristisch für die α -MPP-Untereinheiten ist und offensichtlich in anderen Proteinen der Pitrilysinfamilie nicht vorkommt, wird vermutet, daß sie für die spezielle Funktion der α -MPPs eine Bedeutung hat (Braun & Schmitz, 1995b).

Das Core I-Protein aus der Cytochrom c Reduktase von *Neurospora crassa* besitzt eine vollständige inverse Zinkbindedomäne. Es ist identisch mit der β -Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungsprotease. Trotzdem hat die Cytochrom c Reduktase von *Neurospora crassa* keine proteolytische Aktivität. Die Ursachen dafür konnten durch die Isolation und Sequenzierung der *core II*-cDNA von *Neurospora crassa* und die Ableitung der entsprechenden Aminosäuresequenz für das Core II aufgeklärt werden. Wie bereits postuliert, weist das Core II von *Neurospora crassa* die konservierte hydrophobe Domäne im C-terminalen Bereich des Proteins nicht auf und ist somit nach der Hypothese zur Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten von Braun & Schmitz (1995b) ein Relikt der α -MPP-Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungsprotease.

Durch den gezielten Austausch eines Bereichs des Core II-Proteins gegen die hydrophobe Domäne eines α -MPPs sollte das Core II so verändert werden, daß es partiell oder vollständig die Funktion des α -MPP bei der Prozessierung von Vorläuferproteinen übernehmen kann. Auf diese Weise sollte die Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase von *N. crassa* rekonstituiert werden und damit der Beweis erbracht werden, daß das Core II tatsächlich ein Relikt der α -MPP-Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungsprotease ist. Die gezielt veränderte *core II*-cDNA wurde in *Neurospora crassa* transformiert, ihre Integration in das Genom von *Neurospora crassa* konnte durch Southern Blot Analyse und ihre Expression über

Northern Blot Analyse nachgewiesen werden. In Prozessierungsenzymtest wurde eine spezifische, durch EDTA hemmbare Prozessierungsaktivität der aufgereinigten Cytochrom c Reduktasen aus den Transformanten gegenüber dem Vorläuferprotein der β -Untereinheit des F_0F_1 -ATP-Synthase-Komplexes aus *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen. Da diese Aktivität auch für die aufgereinigte Cytochrom c Reduktase-Fraktion des Wildtyps in Kontrollversuchen gezeigt wurde, kann nicht entschieden werden, ob die Prozessierungsaktivität der Transformanten auf die Wirkung des gezielt veränderten Core II zurückzuführen ist. Die Ursachen für die Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase des Wildtyps konnte bisher nicht aufgeklärt werden. Fest steht allerdings, daß die Cytochrom c Reduktase von *Neurospora crassa* allein keine Prozessierungsaktivität besitzt, in Verbindung mit der α -MPP-Untereinheit der mitochondrialen Prozessierungsprotease jedoch zur Umwandlung von Vorläuferproteinen in ihre reifen Formen in der Lage ist (Schulte et al., 1989). Demnach kann die Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase des Wildtyps zwei Ursachen haben. Zum einen kann die Cytochrom c Reduktase bedingt durch die Präparation mit der α -MPP-Untereinheit verunreinigt sein. Zum anderen besteht die Möglichkeit, daß es bei der Präparation der Mitochondrien zu einer Vermischung von Proben kam, da die Mitochondrien des Wildtyps und der Transformanten teilweise an einem Tag in sehr großen Ansätzen isoliert wurden.

Die Verunreinigung nach zwei chromatographischen Reinigungsschritten durch die α -MPP-Untereinheit erscheint angesichts der nachgewiesenen geringen Tendenz der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease von *Neurospora crassa* einen stabilen Komplex zu bilden eher unwahrscheinlich (Schulte et al., 1989; Schneider et al., 1990; Weiss et al., 1990). Um diese Möglichkeit vollständig auszuschließen wurde angestrebt, den Cytochrom c Reduktase-Komplex aus dem aufgereinigten bc_1 -Subkomplex, dem aufgereinigten Eisen-Schwefel-Protein und aus einem in *E. coli* exprimierten, aufgereinigten Core-Subkomplex, bestehend aus dem gezielt veränderten Core II und β -MPP, *in vitro* zu assemblieren (Linke & Weiss, 1986). Für einen *in vitro* assemblierten Komplex kann die Verunreinigung durch die α -MPP-Untereinheit nahezu vollständig ausgeschlossen werden. Außerdem würde der Komplex nur das gezielt veränderte Core II enthalten. Die Möglichkeit, daß sowohl das gezielt veränderte als auch das authentische Core II in den Cytochrom c Reduktase-Komplex integriert sein können, wie sie in den Cytochrom c Reduktasen der Transformanten gegeben ist, würde nicht bestehen. Der Core-Subkomplex aus dem gezielt veränderten Core II und dem β -MPP wurde bereits in *E. coli* überexprimiert und aufgereinigt. Die Überprüfung der Prozessierungsaktivität dieses Komplexes wäre ein erstes sinnvolles Vorexperiment. Würde

der Subkomplex keine Prozessierungsaktivität aufweisen, könnte das Ergebnis allerdings auch so interpretiert werden, daß für die Prozessierungsaktivität eine Integration des gezielt veränderten Core II und der β -MPP-Untereinheit in die Cytochrom c Reduktase erforderlich ist. Alpha-MPP und β -MPP der mitochondrialen Prozessierungsprotease von Kartoffel benötigen die Integration in den Cytochrom c Reduktase-Komplex für die Prozessierungsaktivität (Emmermann et al., 1993).

Der Nachweis, daß es bei der Präparation der Mitochondrien der Transformanten und des Wildtyps zu einer Probenvermischung kam, könnte durch isoelektrische Fokussierung der Cytochrom c Reduktasen erbracht werden, da sich die isoelektrischen Punkte des veränderten und des authentischen Core II um 0,4 pH-Einheiten unterscheiden.

Die endgültige Klärung der Frage, ob und wie die Einführung der charakteristischen hydrophoben Domäne der α -MPPs in das Core II von *Neurospora crassa* die Funktion dieser Untereinheit der Cytochrom c Reduktase beeinflusst, hat aktuell einiges an Bedeutung gewonnen.

Ito (1999) schlägt einen Mechanismus für die Prozessierungsreaktion vor und stellt ein Energie-Minimierungsmodell für die räumliche Struktur eines MPP-Heterodimers vor, welches unter Nutzung der Daten über die Anordnung der Core-Proteine im Cytochrom c Reduktase-Komplex von Rind berechnet wurde. Auf Grund von experimentellen Daten zur Mutation einzelner Aminosäurereste wird vorgeschlagen, daß die beiden MPP-Untereinheiten eine sogenannte ‚Substratbindungstasche‘ bilden und multiple Substratbindungsstellen zur Erkennung von Strukturelementen der Leitsequenzen benutzen. Die β -MPP-Untereinheit interagiert dabei mit Aminosäureresten in der Umgebung der Schnittstelle und distalen basischen Aminosäureresten des Vorläuferproteins, wohingegen die α -MPP-Untereinheit mit basischen Aminosäureresten weiter am N-Terminus der Leitsequenzen in Wechselwirkung tritt. Für die Bindung von Vorläuferproteinen mit sehr kurzen Leitsequenzen werden nur die Substratbindungsstellen des β -MPPs genutzt. In dem berechneten Modell zur räumlichen Struktur des MPP-Dimers befinden sich die potentiell an der Substratbindung beteiligten und die an der Metallbindung beteiligten Aminosäurereste sowie weitere essentielle Aminosäurereste an der Oberfläche innerhalb eines spaltartigen Hohlraumes, der von beiden Untereinheiten gebildet wird. Interessant ist, daß die charakteristische hydrophobe Domäne der α -MPPs in diesem Modell als ‚Loopstruktur‘ vorhergesagt wird, die aus der Oberfläche des Hohlraums ragt und bis in die Umgebung des aktiven Zentrums an der β -MPP-Untereinheit reicht. Aus diesen Daten werden zwei mögliche Bedeutungen der konservierten hydrophoben Domäne postuliert. (i) Es ist möglich, daß der spaltartige Hohlraum in der Nähe des aktiven

Zentrums durch die ‚Loopstruktur‘ auseinander gedrückt wird und so das aktive Zentrum erst für die Leitsequenzen erreichbar wird bzw. die proteolytisch abgespaltene Leitsequenz und das reife Protein nach der Prozessierungsreaktion besser vom Enzym freigegeben werden können. (ii) Die konservierte hydrophobe Domäne präsentiert dem aktiven Zentrum die Leitsequenz.

Aus der Perspektive der zuerst aufgeführten möglichen Bedeutung der konservierten hydrophoben Domäne ergibt sich auch eine weitere Erklärung für die von Deng et al. (1998) beschriebene partielle Rekonstitution der Prozessierungsaktivität der Cytochrom c Reduktase von Rind gegenüber Peptidsubstraten. Die Fähigkeit zur proteolytischen Spaltung von Peptidsubstraten wurde durch die Behandlung des Komplexes mit Triton X-100 in Konzentrationen, welche die strukturelle Integrität des Komplexes aufheben, erreicht. Begründet wurde dieser Effekt damit, daß die Leitsequenz des Eisen-Schwefel-Proteins, die in der Cytochrom c Reduktase von Rind identisch mit der Untereinheit IX ist und zwischen den beiden Core-Proteinen liegt (Iwata et al., 1998), nach der Triton X-100 Behandlung ‚den Weg zum aktiven Zentrum freigibt‘. Die Behandlung mit Triton X-100 könnte auch oder zusätzlich dazu die Bindung der Untereinheiten aneinander so lockern, daß der enge Spalt mit dem aktiven Zentrum insgesamt leichter zugänglich ist und so das Fehlen der ‚Loopstruktur‘, die in der mitochondrialen Prozessierungsprotease eine Art ‚Spacerfunktion‘ übernimmt, kompensiert.

4. Hat sich die mitochondriale Prozessierungsprotease aus einer hydrophilen Protease, die sich ursprünglich im Cytosol von Bakterien befand, entwickelt?

Durch die vollständige Sequenzierung von bisher 17 eubakteriellen Genomen und durch weitere 71 begonnenen Projekte zur vollständigen Sequenzierung eubakterieller Genome wurde in den letzten zwei Jahren eine Vielzahl von offenen Leserahmen, die für Vertreter der Pitrilysinfamilie kodieren, identifiziert (Kapitel III/4.2). Viele dieser offenen Leserahmen kodieren auch für putative Proteasen mit MPP-artigem Charakter. Aus der Position dieser putativen Proteasen in Stammbäumen mit Vertretern der Pitrilysinfamilie kann auf eine enge Verwandtschaft zu den Core-Proteinen und MPP-Untereinheiten geschlossen werden (Kapitel IV/4.3; Kapitel IV/4.4). Eine Gruppe von putativen Proteasen, von denen drei aus α -Proteobakterien und fünf aus Firmicutes stammen, weisen eine besonders große Ähnlichkeit zu den β -MPPs und Core I-Proteinen auf, wobei die Verwandtschaft der Sequenzen aus den α -Proteobakterien, insbesondere einer putativen Protease aus *Rickettsia prowazekii* zu den β -

MPPs, am engsten ist. Unter Einbeziehung der Auffassung, daß die rezenten α -Proteobakterien und die Mitochondrien einen gemeinsamen α -proteobakteriellen Vorfahren aus der Rickettsia-Untergruppe, zu der auch *Rickettsia prowazekii* gehört, besaßen (Gray, 1998), kann mit einer relativ großen Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß sich die mitochondriale Prozessierungsprotease aus einer Protease dieses gemeinsamen Vorfahren entwickelt hat.

Ein DNA-Klon, der für eine putative Protease aus *Rhodobacter sphaeroides* mit großer Ähnlichkeit zu den β -MPPs kodiert, wurde aus einer genomischen DNA-Bank isoliert. Die Sequenz des offenen Leserahmens und die daraus abgeleitete Aminosäuresequenz wird erstmals in der vorliegenden Dissertation präsentiert. Der offene Leserahmen wurde in *E. coli* überexprimiert und das entsprechende rekombinante Protein konnte isoliert und zur Herstellung spezifischer Antikörper verwendet werden. Mit Hilfe der spezifischen Antikörper wurde ein Protein im über BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE zweidimensional aufgetrennten bakteriellen Gesamtprotein nachgewiesen. Das apparente Molekulargewicht des detektierten Proteins stimmt mit dem kalkulierten Molekulargewicht der aus dem offenen Leserahmen abgeleiteten Aminosäuresequenz gut überein. In BN-Gelen wurde das Protein nahe der Lauffront aufgetrennt. Es ist offensichtlich nicht in einen Proteinkomplex integriert. Ein Hydrophobizitätsprofil nach Kyte und Doolittle (1982) weist die aus dem offenen Leserahmen abgeleitete Aminosäuresequenz als hydrophil aus. Auf Grund dieser Daten ist es wahrscheinlich, daß es sich bei dem detektierten Protein um eine lösliche MPP-artige Protease handelt. Der endgültige Beweis dafür muß allerdings noch erbracht werden und wäre ein Indez für die These, daß sich MPP aus einer löslichen Protease entwickelt hat. Die Isolation und Charakterisierung der potentiellen MPP-artigen Protease aus *Rhodobacter sphaeroides* wird möglicherweise Hinweise darauf geben, warum eine Protease aus einem Vorfahren der Mitochondrien das Potential zur Entwicklung der Prozessierungsaktivität besaß.

5. Die Evolution der mitochondrialen Prozessierungsprotease innerhalb der Evolution der Pitrilysinfamilie

Auf Grund von phylogenetischen Untersuchungen lassen sich die Vertreter der Pitrilysinfamilie in mindestens drei verschiedene Unterfamilien einteilen (Kapitel IV/4.1 und IV/4.3): die Familie MPP-artiger Proteine, zu welcher die Core-Proteine und MPP-Untereinheiten gehören, die Familie der Stroma-Prozessierungsproteasen und die Familie der Insulinasen.

Es wurde gezeigt, daß sich die phylogenetischen Beziehungen einzelner Proteine zum Teil bereits an einfachen Merkmalen in der Primärstruktur widerspiegeln. Zu diesen Merkmalen zählt die Länge der Aminosäuresequenz und die genaue Position eines an der Metallbindung beteiligten essentiellen Glutaminsäurerestes in Bezug auf das inverse Zinkbindemotiv. So befindet sich dieser essentielle Glutaminsäurerest bei den MPP-artigen Mitgliedern der Pitrylinsinfamilie, abgesehen von einzelnen Ausnahmen, genau 76 Aminosäurereste in Richtung C-Terminus vom inversen Zinkbindemotiv entfernt und bei den Mitgliedern der Insulinase-Familie in der Regel genau 77 Aminosäurereste vom inversen Zinkbindemotiv entfernt. Die Konservierung des essentiellen Glutaminsäurerestes an einer ganz bestimmten Position ist unter der Prämisse einer divergenten Evolution für nahe verwandte Sequenzen auch zu erwarten, da man eine geringe Tolerierung von Substitutionen essentieller Aminosäurereste voraussetzen muß.

Die Ähnlichkeiten zwischen Mitgliedern der drei Unterfamilien ist im Bereich der inversen Zinkbindedomäne hoch. Ein gemeinsamer Ursprung ist zumindest für die MPP-artigen Proteine und die N-terminalen Hälften der Proteine der beiden anderen Unterfamilien anzunehmen. Die C-terminalen Bereiche von Proteinen aus der Unterfamilie der Stroma-Prozessierungsproteasen und der Insulinase-Unterfamilie besitzen keine signifikanten Ähnlichkeiten zu anderen Proteinen und sind auch zwischen den beiden Unterfamilien nicht konserviert. Mitglieder aller drei Unterfamilien existieren sowohl in den Eubakterien als auch in den Eukaryoten. Die Zuordnung eubakterieller Vertreter zu den drei Unterfamilien muß allerdings auf Grund der kurzen Generationszeiten bei Eubakterien und frühen Abspaltung dieser voneinander kritisch betrachtet werden. Obwohl die Stroma-Prozessierungsproteasen eine vergleichbare Länge zu den Proteinen der Insulinase-Familie besitzen, weisen sie einen höheren Homologiegrad zu den MPP-artigen Proteinen auf. Ursache dafür könnte eine engere Verwandtschaft dieser Unterfamilien oder auch eine teilweise konvergente Entwicklung auf Grund der sehr ähnlichen Funktionen, das Abtrennen von Leitsequenzen, sein.

Bisher wurde nur ein offener Leserahmen, der für ein Protein der Pitrylinsinfamilie kodiert, in einem Archaeobakterium, *Aeropyrum pernix*, identifiziert. Daraus könnte geschlossen werden, daß bereits in dem gemeinsamen Vorfahren aller Organismen der drei Reiche Eukarya, Eubacteria und Archaea MPP-artige Proteasen existierten und diese möglicherweise sogar der Ausgangspunkt zur Entwicklung der Pitrylinsinfamilie waren. Unterstützt würde diese Theorie dadurch, daß gerade die Proteine der Unterfamilie MPP-artiger Proteasen in weit auseinanderentwickelten Eubakterien sehr ähnlich sind und sich evolutionär im Vergleich zu den Mitgliedern der anderen Unterfamilien äußerst konservativ verhalten. Da jedoch

bereits fünf Genome von Archae vollständig und 10 teilweise sequenziert wurden, scheinen Gene für Proteine der Pitrylinsfamilien in Archae eher eine Ausnahme zu sein. Deshalb ist die Sequenz aus *Aeropyrum pernix* möglicherweise ein weiteres Indiz für den Gentransfer zwischen Archae und Eubakterien, der inzwischen durch das Auffinden einiger eubakterieller Gene in archaebakteriellen Genomen belegt werden kann (Klenk et al., 1997).

Aus unterschiedlichen Hypothesen zur Entstehung der Mitochondrien und der eukaryotischen Zelle lassen sich verschiedene Möglichkeiten zur Evolution der Pitrylinsfamilie konstruieren, die allerdings aktuell differenziert zu beurteilen sind. Bei einer Möglichkeit kann die eher traditionelle Hypothese zur Entstehung der eukaryotischen Zelle zu Grunde gelegt werden, die davon ausgeht, daß sich die urkaryotische Zelle aus einem Archaepartner entwickelt hat und die Mitochondrien aus der Endosymbiose dieser urkaryotischen Zelle mit einem Eubakterium entstanden sind (Margulis, 1970). Postuliert wird ein Urprotein aus der Insulinase-Unterfamilie, welches bereits in den gemeinsamen Vorfahren der Eukaryoten, Eubakterien und Archäobakterien existierte. In den Eubakterien haben sich dann aus diesem Urprotein Proteasen mit unterschiedlichen Längen und Funktionen entwickelt. Die mitochondriale Prozessierungsprotease hat sich im Zuge der Endosymbiose eines α -Purpurbakteriums mit der urkaryotischen Zelle aus einer Protease des Endosymbionten entwickelt (Buchsteiner, 1998). Gegen dieses Modell spricht in erster Linie, daß bisher kein Mitglied der Insulinase-Unterfamilie in Archae gefunden wurde. Würde man als Urprotein ein Mitglied der Unterfamilie der MPP-artigen Proteine postulieren, könnte das Vorhandensein von Vertretern der Insulinase-Unterfamilie im Cytosol der Eukaryoten nicht erklärt werden. Aussagen über die Herkunft der Stroma-Prozessierungsproteasen sind auf Grund des bisherigen Kenntnisstandes rein spekulativ. Denkbar ist, daß sie sich im Zuge der Endosymbiose eines Cyanobakteriums, die zur Entstehung der Chloroplasten führte, aus einer Protease des Endosymbionten entwickelt hat.

Die Hydrogen-Hypothese zur Entstehung der eukaryotischen Zelle (Martin & Muller, 1998) erklärt den archaeähnlichen genetischen Apparat der Eukaryoten und die Ähnlichkeiten von Komponenten des Energiestoffwechsels der Eukaryoten zum Metabolismus der Eubakterien sowie distinkte Charakteristika der Eukaryoten. Aus Sicht der Hydrogenhypothese könnte eine eubakterielle Urprotease postuliert werden, aus der sich die einzelnen Unterfamilien der Pitrylinsfamilie entwickelt haben. Aus Vertretern dieser Unterfamilien in Eubakterien haben sich die unterschiedlichen Vertreter der Eukaryoten entwickelt. Da der Archaepartner nach der Vorstellung der Hydrogenhypothese im Verlauf der Syntrophie den Stoffwechsel des Eubakteriums zunächst mit dem Ziel dessen Ernährung zu sichern fast vollständig übernahm und

infolge dessen seinen eigenen Stoffwechsel verlor, besaßen die Proteine, aus denen sich die cytoplasmatischen Vertreter der Pitrilysinfamilie entwickelt haben, möglicherweise ursprünglich wichtige Funktionen im Stoffwechsel des eubakteriellen Syntrophiepartners. Gestützt wird dieser Gedanke dadurch, daß viele eukaryotische Vertreter der Pitrilysinfamilie vermutlich wichtig für die Regulation von grundlegenden Stoffwechselfunktionen sind. Leider sind die genauen Funktionen von Vertretern der Pitrilysinfamilie, insbesondere bei Eubakterien, nicht hinreichend erforscht, so daß sich momentan kein unmittelbarer Zusammenhang beweisen läßt. Da der Ursprung der Mitochondrien aus Sicht der Hydrogenhypothese unmittelbar mit der Entstehung der eukaryotischen Zelle verbunden ist, sind demnach erste eukaryotische Vertreter der Insulinase-Familie und die mitochondriale Prozessierungsprotease nahezu zeitgleich infolge eines Ereignisses entstanden.

6. Kritische Beurteilung des Ausgangsmodells zur Evolution der MPP-Untereinheiten und Core-Proteine

Viele aktuelle Daten lassen sich zur Bestätigung bzw. Erweiterung des von Braun und Schmitz (1995b) entwickelten Modells zur Evolution der MPP-Untereinheiten und Core-Proteine heranziehen.

So kann mit großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden, daß sich die mitochondriale Prozessierungsprotease aus einer Protease, die bereits in einem Vorfahren der Mitochondrien aus der Gruppe der α -Proteobakterien existierte, entwickelt hat (Kapitel IV/4.). Bisher gibt es allerdings keine Hinweise darauf, daß in den Vorfahren der Mitochondrien bereits Proteine existierten, die den Ausgangspunkt für die Entwicklung des dimeren Komplexes aus α -MPP und β -MPP bildeten. Es wurden zwar in einigen Eubakterien jeweils zwei MPP-artige Proteine identifiziert, keines dieser Proteine weist jedoch die charakteristische hydrophobe Domäne der α -MPPs auf. Auch aus Stammbäumen geht nicht hervor, daß es eine Gruppe von bakteriellen Proteinen gab, aus denen sich direkt die α -MPP-Untereinheiten entwickelt haben könnten. Da MPP bei allen bisher daraufhin untersuchten Organismen als Heterodimer zweier strukturell sehr ähnlicher Untereinheiten vorliegt, erscheint dagegen sicher, daß sich die beiden Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease infolge eines Duplikationsereignisses eines Ur-MPPs bereits sehr früh in der Evolution der Mitochondrien entwickelt haben. Es kann jedoch nicht vollständig ausgeschlossen werden, daß dieses Duplikationsereignis bereits in dem Vorfahren der Mitochondrien stattfand.

Das Modell von Braun und Schmitz (1995b) geht außerdem davon aus, daß weitere Genduplikationen die Grundlage für die Entstehung der Core-Proteine der Cytochrom c Reduktase waren und die Core-Proteine Relikte der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease sind. Aus Vergleichen der Primärstrukturen von über vierzig Core-Proteinen und MPP-Untereinheiten geht die große Ähnlichkeit der Core-Proteine zu den Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease hervor (Kapitel IV/4.4). Auffallend ist dabei, daß alle β -MPPs eine vollständige inverse Zinkbindedomäne besitzen. In den α -MPPs und Core-Proteinen sind die inversen Zinkbindedomänen dagegen in der Regel unvollständig. In den höheren Pflanzen Kartoffel (Braun et al., 1992), Weizen (Braun et al., 1995) und Spinat (Eriksson et al., 1994) sowie in zwei niederen Pflanzen, dem Farn *Platyserium bifurcatum* und dem Schachtelhalm *Equisetum arvense*, besitzt die Cytochrom c Reduktase Prozessierungsaktivität. Für die Core-Proteine der Cytochrom c Reduktasen von höheren Pflanzen wurde bewiesen, daß sie identisch mit den Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease sind (Braun et al., 1992; Eriksson et al., 1994; Braun et al., 1995). Diese Daten können als Indizien dafür gewertet werden, daß die Core-Proteine Relikte der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease sind. Aufgrund der Einordnung in Stammbäumen (Abb. 34, 35), und der Tatsache, daß Core I und β -MPP in *Neurospora crassa* identische Proteine sind, kann davon ausgegangen werden, daß die Core I-Proteine evolutionäre Relikte der β -MPPs sind. Möglich ist auch, daß die Core II-Proteine Relikte der α -MPPs sind. Unter der Annahme, daß sich die postulierten Genduplikationen mehrere Male unabhängig voneinander ereigneten, läßt sich das von Braun & Schmitz (1995b) entwickelte Modell vor dem Hintergrund der Evolution der Eukaryoten darstellen (Abb. 36). Hinterfragt man, warum es bei einigen Arten zum Ablösen der mitochondrialen Prozessierungsprotease von der Cytochrom c Reduktase kam und bei anderen nicht, so fällt auf, daß insbesondere bei Arten denen die Chloroplasten fehlen, die Prozessierungseigenschaft der Cytochrom c Reduktase durch eine teilweise oder vollständige Ablösung der aktiven MPP-Untereinheiten verloren gegangen ist. Dies könnte mit einem veränderten Selektionsdruck auf die Mitochondrien von Landpflanzen, Organismen mit Chloroplasten als zweiten Organellen-Typ, der am Energiehaushalt der Zelle beteiligt ist, erklärt werden.

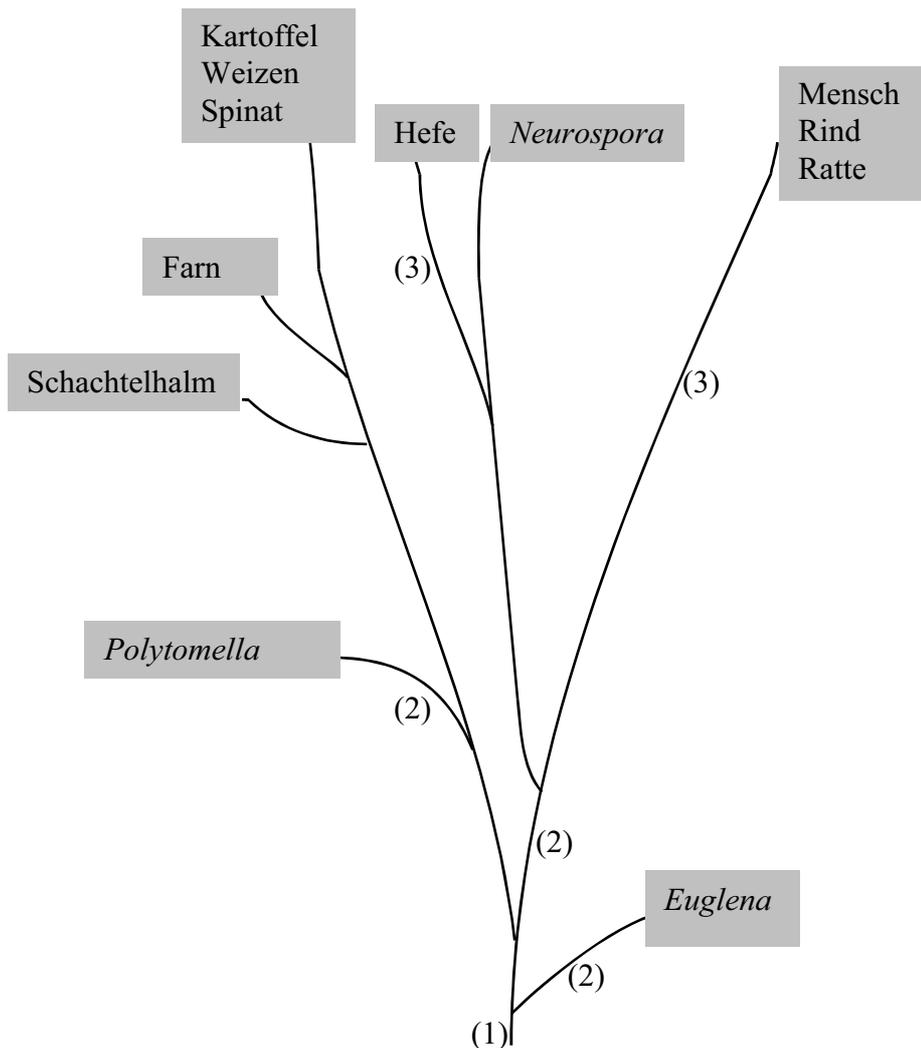


Abbildung 36: Das von Braun und Schmitz aufgestellte Modell zur Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten vor dem Hintergrund der Evolution der Eukaryoten. (1) Genduplikation und Evolution von α -MPP und β -MPP, (2) Genduplikation und Evolution von α -MPP und Core II, (3) Genduplikation und Evolution von β -MPP und Core I. Die Äste des Baumes zeigen Wege gemeinsamer Abstammung, aber ihre Länge gibt nicht den Ablauf der Zeit wieder.

Allerdings ist das von Braun und Schmitz (1995b) vorgeschlagene Modell zur Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten nur eine mögliche Hypothese, die nicht alle bekannten Daten gleichermaßen gut erklärt.

So sind die diskutierten Ursachen für die vorgeschlagene Richtung der Evolution in erster Linie spekulativ.

(i) In dem ursprünglichen Modell von Braun und Schmitz (1995b) wird postuliert, daß das Anheften der mitochondrialen Prozessierungsprotease an die Cytochrom c Reduktase für das

Prozessierungsenzym einen Vorteil bedeutete, weil durch die Lokalisierung an der Membran ein ganz unmittelbarer Zugriff auf importierte Proteine sichergestellt war. Diese feste Anheftung kann aber nur dann ein Vorteil gewesen sein, wenn zwischen der Cytochrom c Reduktase und Komponenten des Protein-Import-Apparates entweder ständig oder auch zeitweise ein Kontakt bestand. Als Indizienbeweis dafür müßte gezeigt werden, daß in höheren Pflanzen dieser Kontakt gegeben ist. Bisher gibt es keinerlei Hinweise darauf. Auffallend ist allerdings, wie bereits von Braun und Schmitz (1995b) bemerkt wurde, daß die Integration eines neuen Enzyms in einen Proteinkomplex von Eukaryoten keine Ausnahme darstellt. Eine kleine Untereinheit der NADH Ubichinon Reduktase in den Mitochondrien von *Neurospora* und Rind ist beispielsweise nahe verwandt mit dem Acyl-Carrier-Protein, welches an der Fettsäurebiosynthese von Bakterien beteiligt ist (Runswick et al., 1991; Sackmann et al., 1991). Möglicherweise ist die Integration von neuen Proteinen in die Proteinkomplexe von Eukaryoten Bestandteil eines generellen Prinzips, der Entstehung hochorganisierter multifunktionaler Enzyme mit komplexer Untereinheitenkomposition, welche ein allgemeiner Vorteil waren und möglicherweise eine grundlegende Voraussetzung für die Evolution mehrzelliger Eukaryoten mit spezialisierten Zellen bildeten.

(ii) Als Ursache für das Ablösen der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease vom Cytochrom c Reduktase-Komplex bei den Mammalia und bei Hefe wird von Braun und Schmitz (1995b) die Notwendigkeit gesehen, Proteinimport und Atmung unabhängig voneinander zu regulieren. Diese Argumentation ist insofern mißverständlich, als daß nicht zwischen kurzfristiger Regulation enzymatischer Aktivitäten und Adaption von Stoffwechselfunktionen an veränderte Lebensbedingungen unterschieden wird. Für die beiden Enzymaktivitäten der Cytochrom c Reduktase bei Pflanzen wurde nachgewiesen, daß sie völlig unabhängig voneinander sind und demnach auch unabhängig voneinander reguliert werden können (Emmermann & Schmitz, 1993; Braun & Schmitz, 1995c). Als Adaption an anaerobe Lebensbedingungen besitzen Hefezellen die einmalige Fähigkeit, die Bildung neuer Atmungskettenproteinkomplexe zu unterdrücken während der Proteinimport in die Mitochondrien aufrechterhalten werden muß. In diesem Sinne scheint naheliegend, daß das Ablösen der mitochondrialen Prozessierungsprotease von der Cytochrom c Reduktase vorteilhaft war. Braun und Schmitz (1995b) postulieren, daß die Entwicklung eines autonomen Prozessierungsenzyms in Mammalia eine notwendige Voraussetzung für die Anpassung des Stoffwechsels an schnell wechselnde Energiebedürfnisse war ohne das der Proteinimport dabei beeinflußt wird. Sinnvoll ist diese Überlegung dann, wenn davon ausgegangen wird, daß durch eine adaptationsbedingte Abnahme des Cytochrom c Reduktase-Gehaltes in den

Membranen die an die Cytochrom c Reduktase gebundenen Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease für den Proteinimport limitierend werden. Bisher ist die Regulierung der Atmungskette allerdings kaum erforscht und es ist wenig darüber bekannt, ob und wie sie auch auf der Ebene der Genexpression und der Regulation der Lebensdauer einzelner Komponenten erfolgt. Außerdem kommt das in *Neurospora crassa* zu 75 % an die Cytochrom c Reduktase gebundene β -MPP ca. 15 mal häufiger vor als das in der Matrix gelöste α -MPP. Die enzymatische Aktivität der mitochondrialen Prozessierungsprotease in *Neurospora crassa* ist in der Matrix lokalisiert. Dieses Beispiel impliziert, daß die an die Cytochrom c Reduktase gebundenen Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease möglicherweise eher in einem großen ‚Überschuß‘ vorliegen. Zusätzlich könnte man vermuten, daß an sinkende Energiebedürfnisse der Zelle auch die Anforderungen an den Proteinimport in die Mitochondrien adaptiert werden, daß heißt es werden weniger Proteine importiert.

Außerdem werden einige interessante Aspekte in der Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten im Modell von Braun und Schmitz (1995b) gar nicht aufgegriffen. (i) So bleibt offen warum und wie es nach der Duplikation des Ur-MPP zur Entwicklung zweier ähnlicher Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease mit offensichtlich unterschiedlichen Funktionen kam. In diesem Zusammenhang sei auf folgende Beobachtung hingewiesen. Vergleicht man die Sequenz im Bereich der inversen Zinkbindedomäne der α -MPPs, so fällt auf, daß die α -MPPs an Stelle des kompletten inversen Zinkbindemotivs HXXEH die Sequenzen HXXDR oder HXXEK besitzen. Im Sinne der Funktion können die stattgefundenen Aminosäuresubstitutionen zum authentischen inversen Zinkbindemotiv als ‚konservative Austausch‘, welche die Funktion möglicherweise teilweise erhalten, betrachtet werden. Warum fanden diese ‚konservativen Austausch‘ statt und keine zufälligen Aminosäuresubstitutionen? (ii) Ebenfalls interessant ist, daß zwar β -MPP neben Core II gemeinsam in der Cytochrom c Reduktase vorliegt aber α -MPP niemals neben Core I. Ist dies ein Zufall oder ist die Tendenz zur Bildung eines löslichen α -MPPs stärker als die zur Bildung eines löslichen β -MPPs? Kann dieser Unterschied möglicherweise aus der Funktion von α -MPP erklärt werden?

In den letzten Jahren wurden experimentelle Daten publiziert, die sich nur schwierig in das von Braun und Schmitz (1995b) entwickelte Modell einordnen lassen.

(i) Nurani et al. (1997) fanden in Prozessierungs-Enzymtests mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen die Aktivität der mitochondrialen Prozessierungsprotease von *Chlamydomonas reinhardtii* in der mitochondrialen Matrixfraktion. Nur eine vergleichsweise sehr geringe Restaktivität wurde in der mitochondrialen Membranfraktion nachgewiesen. Dies war Anlaß für die Vermutung, daß die mitochondriale Prozessierungsprotease von *Chlamydomonas reinhardtii* ein lösliches Enzym und nicht wie bei höheren Pflanzen Bestandteil der Cytochrom c Reduktase ist. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, daß die Cytochrom c Reduktase von *Polytomella* spp. keine Prozessierungsprotease ist. *Chlamydomonas reinhardtii* und *Polytomella* spp. sind nahe verwandte Grünalgen und gehören zu den Chlorophyceae. *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt aber Chloroplasten. Möglicherweise ist die mitochondriale Prozessierungsprotease in allen Chlorophyta unabhängig von der Cytochrom c Reduktase in der mitochondrialen Matrix gelöst. Zumindest bestätigen die für die Prozessierungsaktivität von *Chlamydomonas reinhardtii* ermittelten Daten nicht die These, daß ein veränderte Selektionsdruck durch das Vorhandensein von Chloroplasten generell zum Verbleib der Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease in der Cytochrom c Reduktase führt.

(ii) Es existieren Berichte von einer zusätzlichen Matrix-lokalisierten mitochondrialen Prozessierungsprotease in den Mitochondrien von Sojabohne und Spinat (Szigyarto et al., 1998). Die Autoren fanden in Prozessierungs-Enzymtest mit radioaktiv markierten Vorläuferproteinen eine Prozessierungsaktivität in der mitochondrialen Matrixfraktion mit einer leicht veränderten Sensitivität gegenüber Inhibitoren im Vergleich zur MPP-Aktivität der Cytochrom c Reduktase. Die leicht veränderte Sensitivität gegenüber Inhibitoren soll derjenigen des löslichen MPP von *Neurospora crassa* ähneln. Mit Antikörpern, welche gegen das β -MPP von *Neurospora crassa* gerichtet sind, wurden entsprechende Proteine in der mitochondrialen Matrix nachgewiesen. Die Möglichkeit, daß die beobachtete enzymatische Aktivität und die mit Antikörpern detektierten Kreuzreaktionen auf nicht assemblierte oder präparationsbedingt herausgelöste Core-Proteine der Cytochrom c Reduktase zurückzuführen sind, wird von den Autoren ausgeschlossen. Unter anderem führen sie die Argumente an, daß die Core-Proteine von Kartoffel außerhalb des Cytochrom c Reduktase-Komplexes keine proteolytische Aktivität besitzen und daß der Cytochrom c Reduktase-Komplex von Kartoffel außergewöhnlich stabil ist (Emmermann et al., 1993). Trotzdem kann der Beweis für das Vorhandensein einer strukturell verschiedenen löslichen Form von der an die Cytochrom c Reduktase gebundenen Form der mitochondrialen Prozessierungsprotease nur endgültig über eine Aufreinigung dieses Proteins erbracht werden.

(iii) Alpha- und β -MPP des zu den Phycomyceten gehörenden Pilzes *Blastocladiella emersonii* wurden in Western Blot-Experimenten durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern in der Fraktion der inneren mitochondrialen Membran nachgewiesen (Rocha & Gomes, 1999). Dies deutet auf eine Integration beider Untereinheiten in den Cytochrom c Reduktase-Komplex hin. Allerdings ist bekannt, daß Antikörper, welche gegen die Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease gerichtet sind, auch mit den Core-Proteinen der Cytochrom c Reduktase kreuzreagieren können.

Bezieht man diese aktuellen Daten in das Modell von Braun und Schmitz ein (1995b) und stellt das Modell erneut vor den Hintergrund der Evolution der Eukaryoten, kann die vorgeschlagene zeitliche Reihenfolge für die Entstehung der MPP-Untereinheiten und Core-Proteine nur bestätigt werden, wenn weitere unabhängige Genduplikationsereignisse postuliert werden.

7. Ein alternatives Modell für die Entstehung der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten

Ein etwas veränderter Ausgangspunkt für die Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten erklärt die unterschiedliche Lokalisierung der mitochondrialen Prozessierungsprotease in den einzelnen Organismen, einschließlich der im vorherigen Abschnitt diskutierten aktuellen Daten, ohne ständig neue Genduplikationsereignisse vorauszusetzen.

Sehr früh in der Evolution der Mitochondrien lagen die beiden Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease bereits jeweils zweimal vor. Entstanden sind die vier Proteine infolge von Genduplikationsereignissen, wobei drei Genduplikationen bzw. ein Genduplikationsereignis und eine Duplikation des ganzen Genoms ausreichen, um die Entstehung von jeweils zwei α -MPP-Untereinheiten und zwei β -MPP-Untereinheiten zu erklären. Ein Dimer aus α -MPP und β -MPP heftete sich an den Cytochrom c Reduktase-Komplex, ein zweites lag in der mitochondrialen Matrix vor. Prinzipiell könnte man davon ausgehen, daß beide Dimere proteolytische Aktivität besaßen und kein extremer Selektionsdruck, der entweder die lösliche oder membrangebundene Form von MPP bevorteilte, anlag. Möglicherweise war es sogar zeitweilig für einige Organismen ein Vorteil eine membrangebundene und eine lösliche Form von MPP zu besitzen. Andererseits wird der Verlust von Enzymfunktionen durch Mutationen von essentiellen Aminosäureresten oder sogar durch Deletion eines Gens toleriert und ist sogar wahrscheinlich, wenn die Enzymfunktion durch ein anderes Protein

vollständig ersetzt werden kann. Aus diesen Annahmen lässt sich das Entstehen der Core-Proteine zu verschiedenen Zeitpunkten in der Evolution der Eukaryoten erklären (Abb. 37).

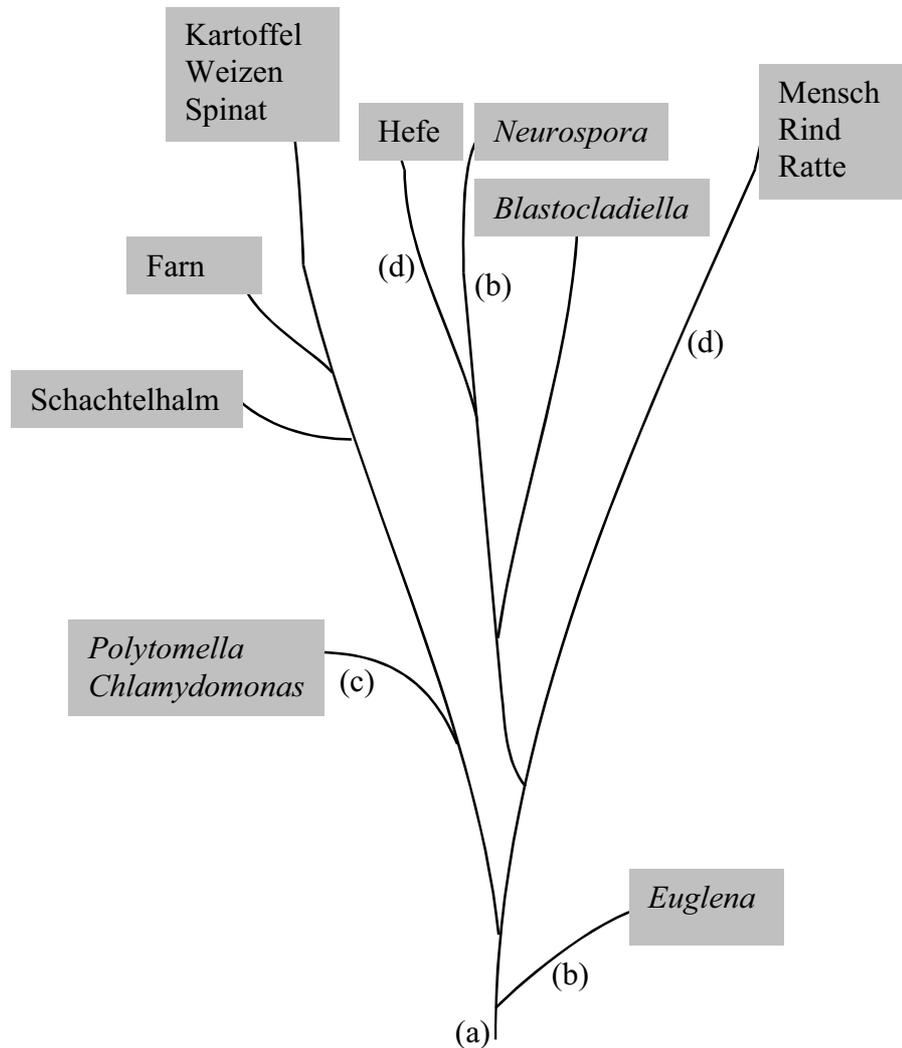


Abbildung 37: Degradierung der an die Cytochrom c Reduktase gebundenen Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease im Sinne eines alternativen Modells zur Evolution der MPP-Untereinheiten und Core-Proteine vor dem Hintergrund der Evolution der Eukaryoten. (a) Drei Genduplikationen bzw. ein Genduplikationsereignis und eine Duplikation des ganzen Genoms führen zur Evolution von jeweils zwei α -MPP-Untereinheiten und zwei β -MPP-Untereinheiten. Ein Dimer aus α -MPP und β -MPP heftete sich an den Cytochrom c Reduktase-Komplex ein zweites lag in der mitochondrialen Matrix vor. (b) Degradation der an die Cytochrom c Reduktase gebundenen α -MPP-Untereinheiten führen zur Entstehung von Core II-Proteinen. (c) Degradation von einer oder beiden an die Cytochrom c Reduktase gebundenen Untereinheiten führen zur Entstehung von einem Core-Protein oder beiden Core-Proteinen. (d) Degradation der an die Cytochrom c Reduktase gebundenen Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease führen zur Entstehung der Core-Proteine. Die Äste des Baumes zeigen Wege gemeinsamer Abstammung, aber ihre Länge gibt nicht den Ablauf der Zeit wieder.

Insbesondere die Unterschiede im Auftreten von Core-Proteinen und MPP-Untereinheiten bei nahe verwandten Organismen können besser erklärt werden. Bei Hefe besitzt die Cytochrom c Reduktase Core-Proteine, wohingegen in die Cytochrom c Reduktase von *Blastocladiella emersonii* nach aktuellem Kenntnisstand möglicherweise die aktiven Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease integriert sind. Diese Tatsache ist mit dem ursprünglichen Modell von Braun und Schmitz (1995b) nur erklärbar, wenn man für die Entstehung der Core II-Proteine der Mammalia und der Core II-Proteine von Hefe und *Neurospora* jeweils ein unabhängiges Genduplikationsereignis voraussetzt. In dem veränderten Vorschlag wird lediglich vorausgesetzt, daß die Evolution der vier Ausgangsproteine in den Organismen teilweise unterschiedlich und unabhängig verlief. Die Existenz von Isoformen der MPP-Untereinheiten in Kartoffel, Spinat, Weizen und vermutlich auch in *Arabidopsis* (dort wurden bisher zwei Gene für α -MPP gefunden) könnten als Indizien für die vorgeschlagene Ausgangssituation gewertet werden und könnten entweder unterschiedliche Spezifitäten in verschiedenen Pflanzenorganen oder auch Lokalisierungen der MPP-Aktivität in der mitochondrialen Matrix und an der Cytochrom c Reduktase erklären.

Die Aufklärung neuer struktureller und funktioneller Details von Cytochrom c Reduktasen und mitochondrialen Prozessierungsproteasen verschiedener Eukaryoten sowie MPP-artigen Proteasen wird weitere Einblicke in die Co-Evolution der Cytochrom c Reduktase und mitochondrialen Prozessierungsprotease geben. Besonders interessant sind aus dieser Perspektive die Cytochrom c Reduktasen und mitochondrialen Prozessierungsproteasen aus sehr ursprünglichen Protisten. Möglicherweise werden neue Erkenntnisse die postulierte Co-Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten besser nachvollziehbar machen, so daß ein gut abgesichertes Modell vorgeschlagen werden kann.

Aktueller Nachtrag:

Nach Fertigstellung der vorliegenden Dissertation veröffentlichten Bolhuis et al. (2000) erstmals Daten zur Funktion einer MPP-artigen Protease in Bakterien (*B. subtilis*). Mit Hilfe von ‚Knock-out‘ Mutanten konnten die Autoren zeigen, daß das Protein einen Regulator der Genexpression darstellt, der vermutlich nicht direkt an DNA bindet, sondern über eine proteolytische Inaktivierung eines noch zu identifizierenden Genaktivators wirkt.

VI. Literatur

Affholter, J.A., Fried, V.A. und Roth, R.A. (1988) Human insulin-degrading enzyme shares structural and functional homologies with *E. coli* protease III. *Science* 242, 1415-1418.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. und Watson, J.D. (1997) *Molekularbiologie der Zelle*. VCH, Weinheim.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. und Lipman, D.J. (1990) Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403-410.

Andersson, S.G.E., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Pontéén, T., Alsmark, U.C.M., Podowski, R.M., Näslund, A.K., Eriksson, A.-S., Winkler, H.H. und Kurland, C.G. (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133-143.

Arnoux, B., Ducruix, A., Astier, C., Picaud, M., Roth, M. und Reiss-Husson, F. (1990) Towards the understanding of the function of *Rhodobacter sphaeroides* wild type reaction center: Gene cloning, protein and detergent structures in the three-dimensional crystals. *Biochimie* 72, 525-530.

Attardi, G. und Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. *Ann. Rev. Cell Biol.* 4, 289-333.

Avalos, J., Geever, R.F. und Case, M.E. (1989) Bialaphos resistance as a dominant selectable marker in *Neurospora crassa*. *Curr. Genet.* 16(5-6), 369-372.

Bechmann, G., Schulte, U. und Weiss, H. (1992) Mitochondrial ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase. In: *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L., ed.), S. 199-216. Elsevier Science Publishers B.V., Stockholm, Schweden.

Becker, A. und Gold, M. (1975) Isolation of the bacteriophage lambda A-gene protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 581-585.

Becker, A.B. und Roth, R.A. (1992) An unusual active site identified in a family of zinc metalloendopeptidases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89(9), 3835-3839.

Becker, A.B. und Roth, R.A. (1993) Identification of glutamate-169 as the third zinc-binding residue in proteinase III, a member of the family of insulin-degrading enzymes. *Biochem. J.* 292, 137-142.

Benning, C. und Somerville, C.R. (1992) Isolation and genetic complementation of a sulfolipid-deficient mutant of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* 174 (7), 2352-2360.

Bolhuis, A., Koetje, E., Dubois, J.-Y., Vehmaanperä, J., Venema, G., Bron, S. und van Dijl, J.M. (2000) Did the mitochondrial processing peptidase evolve from a eubacterial regulator of gene expression? *Mol. Biol. Evol.* 17(1), 198-201.

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

Boumans, H., Berden, J.A. und Grivell, L.A. (1997) The role of subunit VIII in the structural stability of the bc₁ complex from *Saccharomyces cerevisiae* studied using hybrid complexes. *Eur. J. Biochem.* 249(3), 762-769.

Branda, S.S., Cavadini, P., Adamec, J., Kalousek, F., Taroni, F. und Isaya, G. (1999) Yeast and human frataxin are processed to mature form in two sequential steps by the mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 274(32), 22763-22769.

Brandt, U. und Trumpower, B. (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 29(3), 165-197.

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

Brandt, U., Uribe, S., Schägger, H. und Trumppower, B.L. (1994) Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome bc₁ complex. J. Biol. Chem. 269(17), 12947-12953.

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

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

Braun, H.P. und Schmitz, U.K. (1995a) Molecular structure of the 8 kDa subunit of cytochrome c reductase from potato and its $\Delta\Psi$ -dependent import into isolated mitochondria. Biochem. Biophys. Acta 1229, 181-186.

Braun, H.P. und Schmitz, U.K. (1995b) Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc₁ complex evolutionary relics of a processing protease? TIBS 20, 171-175.

Braun, H.P. und Schmitz, U.K. (1995c) The bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria. J. Bioenerg. Biomembr. 27, 423-436.

Braun, H.P. und Schmitz, U.K. (1999) The protein-import apparatus of plant mitochondria. Planta 209, 267-274.

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

Braun, H.P., Emmermann, M. und Schmitz, U.K. (1993) Cytochrome c reductase from potato mitochondria: A protein complex involved in respiration and protein import. In: Plant Mitochondria (Brennicke, A. und Kück, U. eds.), S. 307-314. VCH Publishers, Weinheim, FRG.

Braun, H.P., Emmermann, M., Krufft, V., Bödicker, M. und Schmitz, U.K. (1995) The general mitochondrial processing peptidase from wheat is integrated into the cytochrome bc₁-complex of the respiratory chain. *Planta* 195, 396-402.

Braun, H.P., Jänsch, L. und Schmitz, U.K. (1997) Potato mitochondrial peptidase complex. In: *Proteolysis and protein turnover* (Hopsu-Havu, V.K., Järvinen, M. und Kirschke, H. eds.), S. 209-297. ISO Press, Amsterdam, The Netherlands.

Brumme, S., Krufft, V., Schmitz, U.K. und Braun, H.P. (1998) New insights into the co-evolution of cytochrome c reductase and the mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 273, 13143-13149.

Brunner, M., Klaus, C. und Neupert, W. (1994) The mitochondrial processing peptidase. In: *Signal peptidases* (von Heijne G. ed.), S. 73-86. R.G. Landes Company, Austin.

Buchsteiner, E. (1998) Evolution von Metallo-Endopeptidasen am Beispiel der Pitrylysin-familie. Diplomarbeit, Universität Hannover.

Bui, E.T.N., Bradley, P.J. und Johnson, P.J. (1996) A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9651-9656.

Cedergreen, R., Gray, M.W., Abel, Y. und Sankoff, D. (1988) The evolutionary relationships among known life forms. *J. Mol. Evol.* 28, 98-112.

Chen, N.-Y., Jiang, S.-Q., Klein, D.A. und Paulus, H. (1993) Organization and nucleotide sequence of the *Bacillus subtilis* diaminopimelate operon, a cluster of genes encoding the first three enzymes of diaminopimelate synthesis and dipicolinate synthase. *J. Biol. Chem* 268, 9448-9465.

Cheng, Y.-S.E. und Zipser, D. (1979) Purification and Characterisation of Protease III from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 254, 4698-4706.

- Chesneau, V., Pierotti, A.R., Barre, N., Creminon, C., Tougard, C. und Cohen, P. (1994) Isolation and characterization of a dibasic selective metalloendopeptidase from rat testes that cleaves at the amino terminus of arginine residues. *J. Biol. Chem.* 269(3), 2056-2061.
- Crivellone, M.D., Wu, M.A. und Tzagoloff, A. (1988) Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase complex. *J. Biol. Chem.* 263(28), 14323-14333.
- Crofts, A.R. und Meinhardt, S.W. (1982) A Q-cycle mechanism for the cyclic electron-transfer chain of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. Soc. Trans.* 10(4), 201-203.
- Crofts, A.R. und Berry, E.A. (1998) Structure and function of the cytochrome bc₁ complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 8(4), 501-509.
- Deng, K., Zhang, L., Kachurin, A.M., Yu, L., Xia, D., Kim, H., Deisenhofer, J. und Yu, C.-A. (1998) Activation of a matrix processing peptidase from the crystalline cytochrome bc₁ complex of bovine heart mitochondria. *J. Biol. Chem.* 273, 20752-20757.
- Devereux, J., Haeberli, P. und Smithies, O. (1984) A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucl. Acids Res.* 12, 387-395.
- Doolittle, W.F. (1998) You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends Genet.* 14(8), 307-311.
- Douce, R. (1985) *Mitochondria in higher plants: Structure, function and biogenesis*. Academic Press, Orlando, FL.
- Ebbole, D.J. und Sachs, M.S. (1990) A rapid and simple method for isolation of *Neurospora crassa* homokaryons using microconidia. *Fungal. Genet. Newsl.* 37, 17-18.
- Edman, P. (1950) Method for the determination of amino acid sequences in peptides. *Acta Chem. Scand.* 4, 283-293.

Emmermann, M. und Schmitz, U.K. (1993) The cytochrom c reductase integrated processing peptidase from potato mitochondria belongs to a new class of metalloendoproteases. *Plant Physiol.* 103, 615-620.

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

Emmermann, M., Braun, H.P., Arretz, M. und Schmitz, U.K. (1993) Characterization of the bifunctional cytochrome c reductase-processing peptidase complex from potato mitochondria. *J. Biol. Chem.* 268, 91-97.

Eriksson, A.C., Sjöling, S. und Glaser, E. (1994) The ubiquinol cytochrome c oxidoreductase complex of spinach leaves mitochondria is involved in both respiration and protein processing. *Biochem. Biophys. Acta* 1186, 221-231.

Falk, G., Hampe, A. und Walker, J.E. (1985) Nucleotide sequence of the *Rhodospirillum rubrum* atp operon. *Biochem. J.* 228, 391-407.

Farchaus, J.W. und Wachtveitl, J. (1993) Tyrosine 162 of the photosynthetic reaction center L-subunit plays a critical role in the cytochrome c_2 mediated rereduction of the photooxidized bacteriochlorophyll dimer in *Rhodobacter sphaeroides*. 1. Site-directed mutagenesis and initial characterization. *Biochemistry* 32, 10885-10893.

Feinberg, A.P. und Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high activity. *An. Biochem.* 132, 6-13.

Felsenstein, J. (1985) Phylogenies from molecular sequences: inference and reliability. *Annu. Rev. Genet.* 22, 521-565.

Feng, D.F. und Doolittle, R.F. (1987) Progressive sequence alignment as a prerequisite to correct phylogenetic trees. *J. of Molecular Evolution* 25, 351-360.

Feng, D.F., Cho, G. und Doolittle, R.F. (1997) Determining divergence times with a protein clock: update and reevaluation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(24), 13028-13033.

Flavin, M. und Nerad, T. (1993) *Reclinomonas americana* N. G.,N. Sp., a new freshwater heterotrophic flagellate. *J. Euk. Microbiol.* 40 (2), 172-179.

Gatti, D.L. und Tzagoloff, A. (1990) Structure and function of the mitochondrial bc₁ complex. Properties of the complex in temperature-sensitive cor1 mutants. *J. Biol. Chem.* 265(35), 21468-21475.

Geli, V., Yang, M.J., Suda, K., Lustig, A. und Schatz, G. (1990) The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria. Overproduction and characterization of its two nonidentical subunits. *J. Biol. Chem.* 265(31), 19216-19222.

Gennis, R.B., Barquera, B., Hacker, B., van Doren, S.R., Arnaud, S., Crofts, A.R., Davidson, E., Gray, K.A. und Daldal, F. (1993) The bc₁ complexes of *Rhodobacter sphaeroides* and *Rhodobacter capsulatus*. *J. Bioenerg. Biomembr.* 25(3), 195-209.

Glaser, E., Eriksson, A.C. und Sjoling, S. (1994) Bifunctional role of the bc₁ complex in plants. Mitochondrial bc₁ complex catalyses both electron transport and protein processing. *FEBS Lett.* 346(1), 83-87.

Glaser, E., Sjoling, S., Tanudji, M. und Whelan, J. (1998) Mitochondrial protein import in plants. Signals, sorting, targeting, processing and regulation. *Plant Mol. Biol.* 38(1-2), 311-338.

Gray, M.W. (1996) The third form of life. *Nature* 383, 299-300.

Gray, M.W. (1998) *Rickettsia*, typhus and the mitochondrial connection. *Nature* 396, 109-110.

Gray, M.W., Lang, B.F., Cedergren, R., Golding, G.B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M., Brossard, N., Delage, E., Littlejohn, T.G., Plante, I., Rioux, P., Saint-Louis, D., Zhu, Y.,

und Burger, G. (1998) Genome structure and gene content in protist mitochondrial DNAs. *Nucl. Acids Res.* 26(4), 865-878.

Gray, M.W., Burger, G. und Lang, B.F. (1999) Mitochondrial Evolution. *Science* 283, 1476-1481.

Grohmann, L., Brennicke, A. und Schuster, W. (1992) The mitochondrial gene encoding ribosomal protein S12 has been translocated to the nuclear genome in *Oenothera*. *Nucl. Acids Res.* 20(21), 5641-5646

Gupta, R.S. (1995) Evolution of the chaperonin families (Hsp60, Hsp10 and Tcp-1) of proteins and the origin of eukaryotic cells. *Molecular Microbiology* 15, 1-11.

Gutiérrez-Cirlos, E.-B., Antaramian, A., Vázquez-Acevedo, M., Coria, R. und González-Halphen, D. (1994) A highly active ubiquinol-cytochrome c reductase (bc₁ complex) from the colorless alga *Polytomella* ssp., a close relative of *Chlamydomonas*. *J. Biol. Chem.* 269, 9147-9154.

Hallenbeck, P.L. und Kaplan, S. (1987) Cloning of the gene for Phosphoribulokinase activity from *Rhodobacter sphaeroides* and its expression in *Escherichia coli*. *J. of Bacteriology* 169, 3669-3678.

Häusler, T., Stierhoff, Y.D., Blattner, J. und Clayton, C. (1997) Conservation of mitochondrial targeting sequence function in mitochondrial and hydrogenosomal proteins from the early-branching eukaryotes *Crithidia*, *Trypanosoma* and *Trichomonas*. *European Journal of Cell Biology* 73, 240-251.

Hawlitsek, G., Schneider, H., Schmidt, B., Tropschug, M., Hartl, F.U. und Neupert, W. (1988). Mitochondrial protein import: Identification of processing peptidase and PEP, a processing enhancing protein. *Cell* 53(5), 795-806.

Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1988) Improved silver staining procedure for fast staining in Phast System Development Unit. I. Staining of sodium dodecyl sulfate gels. *Electrophoresis* 9(1), 28-32.

- Hsu, S.-M., Raine, L. und Fanger, H. (1981) A comparative study of the peroxidase-antiperoxidase method and an avidin-biotin method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. *Am. J. Clin. Pathol.* 75, 734-738.
- Isaya, G., Kalousek, F., Fenton, W.A. und Rosenberg, L.E. (1991) Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide. *J. Cell. Biol.* 113(1), 65-76.
- Ito, A. (1999) Mitochondrial processing peptidase: multiple-site recognition of precursor proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 265(3), 611-606.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S. und Jap, B.K. (1998) Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc₁ complex. *Science* 281, 64-71.
- Jansch, L., Krufft, V., Schmitz, U.K. und Braun, H.P. (1995) Cytochrom c reductase from potato does not comprise three core proteins but contains an additional low-molecular-mass subunit. *European Journal of Biochemistry* 228(3), 878-885.
- Jansch, L., Krufft, V., Schmitz, U.K. und Braun, H.P. (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant Journal* 9(3), 357-368.
- Kalousek, F., Isaya, G. und Rosenberg, L.E. (1992) Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization. *EMBO J.* 11(8), 2803-2809.
- Karlsson, B., Hovmöller, S., Weiss, H. und Leonard, K. (1983) Structural studies of cytochrome reductase. *J. Mol. Biol.* 165, 287-302.
- Keeling, P.J. und Doolittle, W.F. (1997) Evidence that eukaryotic triosephosphate isomerase is of alpha-proteobacterial origin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(4), 1270-1275.

Kitada, S., Shimokata, K., Niidome, T., Ogishima, T. und Ito, A. (1995) A putative metal-binding site in the beta subunit of rat mitochondrial processing peptidase is essential for its catalytic activity. *J. Biochem.* 117(6), 1148-1150.

Kitada, S., Kojima, K., Shimokata, K., Ogishima, T. und Ito, A. (1998) Glutamate residues required for substrate binding and cleavage activity in mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 273(49), 32547-32553.

Kleiber, J., Kalousek, F., Swaroop, M. und Rosenberg, L.E. (1990) The general mitochondrial matrix processing protease from rat liver: structural characterization of the catalytic subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87(20), 7978-7982.

Klenk, H.P., Clayton, R.A., Tomb, J.F., White, O., Nelson, K.E., Ketchum, K.A., Dodson, R.J., Gwinn, M., Hickey, E.K., Peterson, J.D., Richardson, D.L., Kerlavage, A.R., Graham, D.E., Kyrpides, N.C., Fleischmann, R.D., Quackenbush, J., Lee, N.H., Sutton, G.G., Gill, S., Kirkness, E.F., Dougherty, B.A., McKenney, K., Adams, M.D., Loftus, B., Peterson, S., Reich, C.I., McNeil, L.K., Badger, J.H., Glodeck, A., Zhou, L., Overbeek, R., Gocayne, J.D., Weigman, J.F., McDonald, L., Utterback, T., Cotton, M.D., Spriggs, T., Artiach, P., Kaine, B.P., Sykes, S.M., Sadow, P.W., D'Andrea, K.P., Bowman, C., Fujii, C., Garland, S.A., Mason, T.M., Olsen, G.J., Fraser, C.M., Smith, H.O., Woese, C.R. und Venter, J.C. (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390, 364-370.

Kobayashi, Y., Knoop, V., Fukuzawa, H., Brennicke, A. und Ohyama, K. (1997) Inter-organellar gene transfer in bryophytes: the functional *nad7* gene is nuclear encoded in *Marchantia polymorpha*. *Mol. Gen. Genet.* 256(5), 589-592.

Kojima, K., Kitada, S., Shimokata, K., Ogishima, T. und Ito, A. (1998) Cooperative formation of a substrate binding pocket by alpha- and beta-subunits of mitochondrial processing peptidase. *J. Biol. Chem.* 273(49), 32542-32546.

Kolakovich Eggleston, K., Duffin, K.L. und Goldberg, D.E. (1999) Identification and characterization of falcilysin, a metallopeptidase involved in hemoglobin catabolism within the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Biol. Chem.* 274(45), 32411-32417.

Koo, K. und Stuart, W.D. (1991) Sequence and structure of *mtr*, an amino acid transport gene of *Neurospora crassa*. *Genome* 34(4), 644-651.

Kyte, J. und Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157(1), 105-132.

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

Lang, B.F., Burger, G., Doxiadis, I., Thomas, D.Y., Bandlow, W. und Kaudewitz, F. (1977) A simple method for the large-scale preparation of mitochondria from microorganisms. *Anal. Biochem.* 77, 110-121.

Lang, B.F., Burger, G., O' Kelly, C.J., Cedergren, R., Turmel, M. und Gray, M.W. (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387, 493-497.

Lee, S.B., Milgroom, M.G. und Taylor, J.W. (1988) A rapid, high yield mini-prep method for isolation of total genomic DNA from fungi. *Neurospora Newsl.* 35, 23-24.

Lee, W.T., Terlesky, K.C. und Tabita, F.R. (1997) Cloning and characterization of two *groESL* operons of *Rhodobacter sphaeroides*: Transcriptional regulation of the heat-induced *groESL* operon. *J. of Bacteriology* 179, 487-459.

Leonard, K., Wingfield, P., Arad, T. und Weiss, H. (1981) Three-dimensional structure of ubiquinol:cytochrome c reductase from *Neurospora* mitochondria determined by electron microscopy of membrane crystals. *J. Mol. Biol.* 149(2), 259-274.

Lin, X., Kaul, S., Rounsley, S., Shea, T.P., Benito, M.-I., Town, C.D., Fujii, C.Y., Mason, T., Bowman, C.L., Barnstead, M., Feldblyum, T.V., Buell, C.R., Ketchum, K.A., Lee, J., Ronning, C.M., Koo, H.L., Moffat, K.S., Cronin, L.A., Shen, M., Pal, G., Aken, S.V., Umayam, L., Tallon, L.J., Gill, J.E., Adams, M.D., Carrera, A.J., Creasy, T.H., Goodman, H.M., Somerville, C.R., Copenhaver, G.P., Preuss, D., Nierman, W.C., White, O., Elsen, J.A.,

Salzberg, S.L., Fraser, C.M. und Venter, J.C. (1999) Sequence and analysis of chromosome 2 of the plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 402, 761-768.

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

Long, M., de Souza, S.J., Rosenberg, C. und Gilbert, W. (1996) Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome c_1 precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 7727-7731.

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

Luciano, P., Geoffroy, S., Brandt, A., Hernandez, J.-F. und Géli, V. (1997) Functional cooperation of the mitochondrial processing peptidase subunits. *J. Mol. Biol.* 272, 213-225.

Luciano, P., Tokatlidis, K., Chambre, I., Germanique, J.C. und Géli, V. (1998) The mitochondrial processing peptidase behaves as a zinc-metallopeptidase. *J. Mol. Biol.* 280(2), 193-199.

Maarse, A.C., De Haan, M., Schoppink, P.J., Berden, J.A. und Grivell, L.A. (1988) Inactivation of the gene encoding the 11-kDa subunit VIII of the ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 172(1), 179-184.

Margulis, L. (1970) *Origin of Eukaryotic Cells*. Yale Univ. Press, CT.

Margush, T. und McMorris, F.R. (1981) Consensus n-trees. *Bulletin of Mathematical Biology* 43, 239-244.

Martin, W. und Muller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392, 37-41.

Metzenberg, R.L. und Grotelueschen, J.S. (1992) Disruption of essential genes in *Neurospora* by RIP. *Fungal Genet. Newsl.* 39, 37-49.

Metzenberg, R.L. und Grotelueschen, J. (1995). Restriction polymorphism maps of *Neurospora crassa*: update. Fungal Genet. Newsl. 42, 82-90.

Metzenberg, R.L., Stevens, J.N., Selker, E.U. und Morzycka-Wroblewska, E. (1984). Method for finding the genetic map position of cloned DNA fragments. Neurospora Newsl. 31, 35-39.

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

Mitchell, P. (1975) The protonmotive Q cycle: a general formulation. FEBS Lett. 59(2),137-139.

Muller, M. und Martin, W. (1999) The genome of *Rickettsia prowazekii* and some thoughts on origin of mitochondria and hydrogenosomes. Bioassays 21(5), 377-381.

Murray, M.G. und Thompson, W.F. (1980) Rapid isolation of high-molecular-weight plant DNA. Nucl. Acids Res. 8, 4321-4325.

Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. Annu. Rev. BioChem. 66, 863-917.

Nishimura, A., Morita, M., Nishimura, Y. und Sugino, Y. (1990) A rapid and highly efficient method for preparation of competent *Escherichia coli* cells. Nucl. Acids Res. 18, 6169.

Nugent, J.M. und Palmer, J.D. (1991) RNA-mediated transfer of the gene *coxII* from the mitochondrion to the nucleus during flowering plant evolution. Cell 66(3), 473-481.

Nunnari, J., Fox, T.D. und Walter, P. (1993) A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. Science 262(5142), 1997-2004.

Nurani, G., Eriksson, M., Knorpp, C., Glaser, E. und Franzén, L.-G. (1997) Homologous and heterologous protein import into mitochondria isolated from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol. Biol. 35, 937-980.

Orbach, M.J., Sachs, M.S. und Yanofsky, C. (1990) The *Neurospora crassa arg-2* locus: structure and expression of the gene encoding the small subunit of arginine-specific carbamoyl phosphate synthetase. *J. Biol. Chem.* 265, 10981-10987.

Ou, W.J., Ito, A., Okazaki, H. und Omura, T. (1989) Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria. *EMBO J.* 8(9), 2605-2612.

Oudshoorn, P., Van Steeg, H., Swinkels, B.W., Schoppink, P. und Grivell, L.A. (1987) Subunit II of yeast QH2:cytochrome-c oxidoreductase. Nucleotide sequence of the gene and features of the protein. *Eur. J. Biochem.* 163(1), 97-103.

Pall, M.L. (1993) The use of Ignite (Basta; glufosinate; phosphinothricin) to select transformants of *bar*-containing plasmids in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. Newsl.* 40, 58.

Pall, M.L. und Brunelli, J.P. (1993) A series of six compact fungal transformation vectors containing polylinkers with multiple unique restriction sites. *Fungal Genet. Newsl.* 40, 59-62.

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

Perlman, R.K., Gehm, B.D., Kuo, W.L. und Rosner, M.R. (1993) Functional analysis of conserved residues in the active site of insulin-degrading enzyme. *J. Biol. Chem.* 268(29), 21538-21544.

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

Phillips, J.D., Schmitt, M.E., Brown, T.A., Beckmann, J.D. und Trumpower, B.L. (1990) Isolation and characterization of QCR9, a nuclear gene encoding the 7.3-kDa subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complex. An intron-containing gene with a conserved sequence occurring in the intron of COX4. *J. Biol. Chem.* 265(34), 20813-20821.

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

Rawlings, N.D. und Barrett, A.J. (1993) Evolutionary families of peptidases. Biochem. J. 290, 205-218.

Rocha, C.R.C. und Gomes, S.L. (1999) Characterization and submitochondrial localization of the α subunit of the mitochondrial processing peptidase from the aquatic fungus *Blastocladiella emersonii*. J. of Bacteriol. 181(14), 4257-4265.

Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M. und Walker, J.E. (1991) Presence of an acyl carrier protein in NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria. FEBS Lett. 286(1-2), 121-124.

Saavedra-Alanis, V.M., Rysavy, P., Rosenberg, L.E. und Kalousek, F. (1994) Rat liver mitochondrial processing peptidase. Both alpha- and beta-subunits are required for activity. J. Biol. Chem. 269(12), 9284-9288.

Sackmann, U., Zensen, R., Rohlen, D., Jahnke, U. und Weiss, H. (1991) The acyl-carrier protein in *Neurospora crassa* mitochondria is a subunit of NADH:ubiquinone reductase (complex I). Eur. J. Biochem. 200(2), 463-469.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) Molecular cloning. a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

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

Schägger, H. (1995) Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. In *Mitochondrial Biogenesis and Genetics, Pt A* (Attardi, G.M. und Chomyn, A., eds.), S. 190-202. Academic Press Inc., San Diego.

Schägger, H. und von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical Biochemistry* 166(2), 368-379.

Schägger, H. und von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Analytical Biochemistry* 199(2), 223-231.

Schägger, H., Link, T.A., Engel, W.D. und von Jagow, G. (1986) Isolation of the eleven protein subunits of the bc₁ complex from beef heart. *Meth. Enzymol.* 126, 181-191.

Schägger, H., Cramer, W.A. und von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 217(2), 220-230.

Schägger, H., Brandt, U., Gencic, S. und von Jagow, G. (1995) Ubiquinol-cytochrome-c reductase from human and bovine mitochondria. *Meth. Enzymol.* 260, 82-96.

Schatz, G. (1996) The protein import system of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 271(50), 31763-31766.

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

Schlösser, U.G. (1994) SAG-Sammlung von Algenkulturen Catalog of Strains 1994. BOACEJ, Vol. 3, S. 113-186, Universität Göttingen, Göttingen, Deutschland.

Schmitt, M.E. und Trumpower, B.L. (1990) Subunit 6 regulates half-of-the-sites reactivity of the dimeric cytochrome bc₁ complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 265(28), 17005-17011.

Schneider, H., Arretz, M., Wachter, E. und Neupert, W. (1990) Matrix processing peptidase of mitochondria. Structure-function relationships. *J. Biol. Chem.* 265(17), 9881-9887.

Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G. und Schatz, G. (1991) Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *EMBO J.* 10(2), 247-254.

Schneider, G., Sjolting, S., Wallin, E., Wrede, P., Glaser, E. und von Heijne, G. (1998) Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides. *Proteins* 30(1), 49-60.

Schoppink, P.J., Hemrika, W. und Berden, J.A. (1989) The effect of deletion of the genes encoding the 40 kDa subunit II or the 17 kDa subunit VI on the steady-state kinetics of yeast ubiquinol-cytochrome-c oxidoreductase. *Biochim. Biophys. Acta* 974(2), 192-201.

Schroeder, A.L. und Raju, N.B. (1991) *mei-2*, a mutagen-sensitive mutant of *Neurospora* defective in chromosome pairing and meiotic recombination. *Mol. Gen. Genet.* 231(1), 41-48.

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

Selker, E.U. (1990) Premeiotic instability of Repeated Sequences in *Neurospora crassa*. *Annu. Rev. Genet.* 24, 579-613.

Shii, K., Yokono, K., Baba, S. und Roth, R.A. (1986) Purification and characterization of insulin-degrading enzyme from human erythrocytes. *Diabetes* 35(6), 675-83.

Shimokata, K., Kitada, S., Ogishima, T. und Ito, A. (1998) Role of α -Subunit of Mitochondrial Processing Peptidase in Substrate Recognition. *J. Biol. Chem.* 273(39), 25158-25163.

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

Sistrom, W.R. (1960) A requirement for Sodium in the growth of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *J. Gen. Microbiol.* 22, 778-785.

Sokolowsky, V., Kaldenhoff, R., Ricci, M. und Russo, V.E.A. (1990) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. Fungal Genet. Newsl. 37, 41-43.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517.

Spring, J. (1997) Vertebrate evolution by interspecific hybridisation: are we polyploid? FEBS Lett. 400, 2-8.

Straubinger, B., Straubinger, E., Wirsel, S., Turgeon, G. und Yoder, O. (1992) Versatile fungal transformation vectors carrying the selectable bar gene of *Streptomyces hygrosopicus*. Fungal Genet. Newsl. 39, 82-83.

Striebel, H.M., Rysavy, P., Adamec, J., Spizek, J. und Kalousek, F. (1996) Mutational analysis of both subunits from rat mitochondrial processing peptidase. Arch. Biochem. Biophys. 335(1), 211-218.

Stürzl, M. und Roth, W.K. (1990) Run off synthesis and application of defined single stranded DNA hybridisation probes. Anal. Biochem. 185, 164-169.

Suwato, A. und Kaplan, S. (1989) Physical and genetic mapping of the *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1 genome: genome size, fragment identification, and gene localization. J. Bacteriol. 171, 5840-5849.

Szigyarto, C., Dessi, P., Smith, M.K., Knorpp, C., Harmeý, M.A., Day, D.A., Glaser, E. und Whelan, J. (1998) A matrix-located processing peptidase of plant mitochondria. Plant Mol. Biol. 36, 171-181.

Tateson, R. (1972) Ph. D. Thesis, University of Edinburgh.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. und Gibson, T.J. (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. 22, 4673-4680.

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

Trumpower, B.L. (1990) Cytochrom bc₁ Complexes of Microorganisms. Microbiol. Rev. 54, 101-129.

Tzagoloff, A., Wu, M.A. und Crivellone, M. (1986) Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of COR1, the structural gene for the 44-kilodalton core protein of yeast coenzyme QH₂-cytochrome c reductase. J Biol Chem 261(36),17163-17169

Villanueva, E., Luehrsen, K.R., Gibson, J., Delihias, N. und Fox, G.E. (1985) Phylogenetic origins of the plant mitochondria based on a comparative analysis of 5S ribosomal RNA sequences. J. Mol. Evol. 22, 46-52.

Vogels, H.J. (1964) Distribution of lysine among fungi: evolutionary implications. Am. Nat. 98, 435-446.

Vollmer, S.J. und Yanofsky, C. (1986) Efficient cloning of genes of *Neurospora crassa*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83, 4867-4873.

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

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

Weiss, H., Leonard, K. und Neupert, W. (1990) Puzzling subunits of mitochondrial cytochrome reductase. Trends. Biochem. Sci. 15(5), 178-180.

Williams, J.C., Steiner, L.A. und Feher, G. (1989) Primary structure of the reaction center from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Proteins 1, 312-325.

Wischmann, C. und Schuster, W. (1995) Transfer of *rsp 10* from the mitochondrion to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*: evidence for RNA-mediated transfer and exon shuffling at the intergration site. FEBS Lett. 374(2), 152-156.

Witte, C., Jensen, R.E., Yaffe, M.P. und Schatz, G. (1988) MAS1, a gene essential for yeast mitochondrial assembly, encodes a subunit of the mitochondrial processing protease. EMBO J. 7(5), 1439-1447.

Woese, C.R., Kandler, O. und Wheelis, M.L. (1990) Towards a natural system of organisms: Proposal for the domains Archae, Bacteria, and Eucarya. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4576-4579.

Wolfe, K.H. und Shields, D.C. (1997) Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. Nature 387, 708-713.

Xia, D., Yu, C.A., Kim, H., Xia, J.Z., Kachurin, A.M., Zhang, L., Yu, L. und Deisenhofer, J. (1997) Crystal structure of the cytochrome *bc*₁ complex from bovine heart mitochondria. Science 277, 60-66.

Yaffe, M.P., Ohta, S. und 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(8), 2069-2074.

Yang, M., Jensen, R.E., Yaffe, M.P., Oppliger, W. und Schatz, G. (1988) Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes. EMBO J. 7(12), 3857-1862.

Yu, C.-A., Tian, H., Zhang, L., Deng, K.-P., Shenoy, S.K., Yu, L., Xia, D., Kim, H. und Deisenhofer, J. (1999) Structural basis of multifunctional bovine mitochondrial Cytochrome *bc*₁ complex. J. Bioenerg. Biomembr. 31, 191-199.

Yu, L., Tso, S.-C., Shenoy, S.K., Quinn, B.N. und Xia, D. (1999) The role of supernumerary subunit of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome bc₁ complex. J. Bioenerg. Biomembr. 31, 251-257.

Zabarovsky, E.R. und Winberg, G. (1990) High efficiency electroporation of ligated DNA into bacteria. Nucl. Acids Res. 18, 5912.

Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V.M., Chi, Y.I., Kim, K.K., Hung, L.W., Crofts, A.R., Berry, E.A. und Kim, S.H. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁. Nature 392, 677-684.

Zhou, C., Yang, Y. und Jong, A.Y. (1990) Mini-prep in ten minutes. Biotechniques 8(2), 172-173.

VII. Anhang

Alignment mit Vertretern der Unterfamilie MPP-artiger Proteine

	*	20	*	40	*	60	
Seq1_Stp	:	-----	-----	-----	-----	-----	MTK : 3
PPh_Bs	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
Seq1_Sys	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
Seq2_Sys	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
PP2_Hp	:	-----	-----	-----	-----	-----	MKHFSVKRLLG : 11
PP1_Hp	:	-----	-----	-----	-----	-----	MKHFSVKRLLR : 11
Seq1_Rc	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
Seq1_Rsp	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
Seq1_Rip	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
PP_Ml	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
PP_Mt	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
Seq1_Mf	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
PP1_Stc	:	-----	-----	-----	-----	-----	MTSRSATATARTS : 13
PP_Bs	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
bMPP_Nc	:	-----	-----	-----	-----	-----	MASRRALNLNA : 11
bMPP_Sp	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
bMPP_Le	:	-----	-----	-----	-----	-----	ML : 2
bMPP_Be	:	-----	-----	-----	-----	-----	MLS : 3
bMPP_Sc	:	-----	-----	-----	-----	-----	M : 1
bMPP2_St	:	MATRHLNLTRRRSRITPFTVLPPCITFSSRSSTSITNPSQSSSLPSPPPPDAMIYDRLA					: 60
bMPP1_St	:	MTIRQLLTIARRSRNLTTSHSLRRLYSAS----	AAVAATSSSTPAIGPPPDAMIYDRLA				: 56
CoreI_Hs	:	-----	-----	-----	-----	-----	MAASVVCRA : 9
CoreI_Bt	:	-----	-----	-----	-----	-----	MAASAVCRA : 9
CoreI_Bpt	:	-----	-----	-----	-----	-----	MAASAVCRA : 9
CoreI_Mm	:	-----	-----	-----	-----	-----	WRRPESAE : 8
bMPP_Hs	:	-----	-----	-----	-----	-----	MAAAAAARVVLSSAARGGL : 18
bMPP_Rn	:	-----	-----	-----	-----	-----	MAAAAVSRTLPLPVAGRRL : 18
bMPP_Ds	:	-----	-----	-----	-----	-----	MALRV : 5
bMPP_Ce	:	-----	-----	-----	-----	-----	MKYRVQLFKIFYSNFR : 17
bMPP_Oc	:	-----	-----	-----	-----	-----	MALRFVIG : 8
CoreI_Ce	:	-----	-----	-----	-----	-----	MALRLAVS : 8
bMPP_Eg	:	-----	-----	-----	-----	-----	MTT : 3
bMPP_Lm	:	-----	-----	-----	-----	-----	MLRRTSAVAAT : 11
CoreII_Nc	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
CoreII_Sp	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
CoreII_Bpt	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
CoreII_Hs	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
CoreII_Rn	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
CoreII_Hii	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
aMPP1_St	:	-----	-----	-----	-----	-----	MYRATSSRLRALKVRGTNRVRLARFLCSTAVATKPSGGL : 38
aMPP2_St	:	-----	-----	-----	-----	-----	MYRCASSRLSSLKARQGNRVLTRFSSSAAVATKPSGGL : 38
aMPP_OS	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
aMPP2_At	:	-----	-----	-----	-----	-----	MYRTAASRAKALKGILNHNFRASRYASSAVATSSSSS : 38
aMPP1_At	:	-----	-----	-----	-----	-----	MYRTAASRARALKGVLTRSLRPARYASSAVAETSSST : 38
aMPP_Pf	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
aMPP_Nc	:	-----	-----	-----	-----	-----	MLNRFRLPARLVA : 12
aMPP_Sc	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
aMPP_Sp	:	-----	-----	-----	-----	-----	MLSEYQCLKNIG : 12
aMPP_Be	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
aMPP_Hs	:	-----	-----	-----	-----	-----	RRKMAAVVLAATRLLRGSGSWGCSRLRFGP : 30
aMPP_Rn	:	-----	-----	-----	-----	-----	MATAVWAAARLLRG-SAALCARPKFGS : 26
CoreII_Sc	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
Seq1_Rhs	:	-----	-----	-----	-----	-----	MSEPFPRPGSGPAPGHPTAEPWRRRKRWYSPSDGRAGTARSHLPQRS : 47
CoreII_Ce	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
Seq1_Tm	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
PP2_Stc	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
CoreI_Sc	:	-----	-----	-----	-----	-----	ML : 2
PP_Aa	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
CoreII_Eg	:	-----	-----	-----	-----	-----	MKSVVRSKGTQALF : 14
Seq1_Ap	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
Seq1_Bs	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -

	*	80	*	100	*	120				
Seq1_Stp	:	LVKINYPNIDEDLYYVKLENGL	-----	-----	-----	-----	TVYFIKKIGFLEKTAMLTVG	: 45		
PPh_Bs	:	-----	MKKSPTANGL	-----	-----	-----	DVYVLPKKGFNKTYAVFTTKY	: 31		
Seq1_Sys	:	-----	-----	-----	-----	-----	HVEV PNGITIIA QMP--V	: 31		
Seq2_Sys	:	---	MDIRLVSVQLCPTKPDFPA	-----	-----	-----	KIFTFDQGLTLIHQDVPT-V	: 38		
PP2_Hp	:	LSSVLLVTLGASMAHQSYLPKH	-----	-----	-----	-----	ESVT KNGIQVSVPLENKT	: 53		
PP1_Hp	:	LSSVLLVTLGASMAHQSYLPKH	-----	-----	-----	-----	ESVT KNGIQVSVPLENKT	: 53		
Seq1_Rc	:	-----	-----	-----	-----	-----	ELTT PNGLRIVTEHMPG-L	: 21		
Seq1_Rsp	:	-----	-----	-----	-----	-----	LLDT PNGFRIVTEHMPG-L	: 22		
Seq1_Rip	:	-----	-----	-----	-----	-----	NVSK KNGITILTYNMPY-V	: 24		
PP_M1	:	MRRSKQGAEGKAEKKAARSAGV	-----	-----	-----	-----	CRTT PGGIRVTEHLPA-V	: 41		
PP_Mt	:	-----	-----	-----	-----	-----	RRTT PGGIRVTEHLPA-V	: 34		
Seq1_Mf	:	-----	-----	-----	-----	-----	LGGLRVTEYIPS-V	: 14		
PP1_Stc	:	SEARAVARTQTLIKGEHGIGTV	-----	-----	-----	-----	RRTT PGGIRVTEHLPS-V	: 54		
PP_Bs	:	-----	-----	-----	-----	-----	KRYTCPNGVRIVLENNPT-V	: 21		
bMPP_Nc	:	QGVKARAGVINPFRRGLATPHSGT	-----	-----	-----	-----	GI---KTQTTT KNGITVASEQSP-YA	: 59		
bMPP_Sp	:	---	MLRLQNLPKLVRRFATTALP	-----	-----	-----	KTETTT KNGITVATEHHP-YA	: 41		
bMPP_Le	:	GRVLKSAARSQRGLRSFATTTNLG	-----	-----	-----	-----	P---FTEIST SNGITVATE SQP-HA	: 48		
bMPP_Be	:	AALRLTAKRNVRSLATASSSSYPGA	-----	-----	-----	-----	LLNVPKTQVTR PNGITVATE SNP-AL	: 54		
bMPP_Sc	:	FSRTASKFRNTRRLSTISSQIPG	-----	-----	-----	-----	TRTSK PNGITIA TEYIP-NT	: 45		
bMPP2_St	:	EQVKSIIKRLDPNQRFLRYNSDPD	-----	-----	-----	-----	TVADHTSILSAPETKVTT PNGIRIATE SNL-SS	: 118		
bMPP1_St	:	EDVKQKIKRLENPDSRFLQHLTTPNF	-----	-----	-----	-----	SRPHINPQLSLLRGVTT PSGIRVGHGDNL-AV	: 115		
CoreI_Hs	:	ATAGAQLLRARRSPALLRTPA	-----	-----	-----	-----	LRSTATFAQALQFVPETQVSL DNGIRVASEQS--SQ	: 66		
CoreI_Bt	:	AGAGTRVLLRTRRSPALLRSSD	-----	-----	-----	-----	LRGTATYAQALQSVPETQVSQL DNGIRVASEQS--SQ	: 66		
CoreI_Bpt	:	AGAGTRVLLRTRRSPALLRSSD	-----	-----	-----	-----	LRGTATYAQALQSVPETQVSQL DNGIRVASEQS--SQ	: 66		
CoreI_Mm	:	RPAPGRKCYFAPAARRPAEVTC	-----	-----	-----	-----	LAGYRXFAQALQSVPETQVSL DNGIRVASEQS--SH	: 65		
bMPP_Hs	:	WGFSESLIRGAAGRSLYFGENLR	-----	-----	-----	-----	LRSTQAATQVVLNVPETRVTC LESGIRVASEDS--GL	: 76		
bMPP_Rn	:	WGFTRRLPLRAAAAQPLYFGDRL	-----	-----	-----	-----	LRSTQAAPQVVLNVPETQVTC ENGIRVASENS--GI	: 76		
bMPP_Ds	:	LGVTQNLRTYMRGVEIIKR	-----	-----	-----	-----	YKSALTVKKTL LNIPATQVTC DNGIRVASEDS--GA	: 59		
bMPP_Ce	:	FARGGRVCESSIRYVHLVDKTS	-----	-----	-----	-----	QRRIAQVQPKSVFVPETIVTT PNGFRVATE NT--GG	: 75		
bMPP_Oc	:	SSLRPVLNTQVR-NVAALS	-----	-----	-----	-----	IKDVLAN-----QPTCEVHT KNGFRVAEDN--GK	: 55		
CoreI_Ce	:	SALRPALNSQVRNASSAVSVKDV	-----	-----	-----	-----	LAS-----APQAEVTT KNGFRVATE DN--GS	: 56		
bMPP_Eg	:	PSLSSILRHTRPIFKETLRAAR	-----	-----	-----	-----	P-----TLQNAL PNGFRVASE--SK-DG	: 45		
bMPP_Lm	:	AALPHNMTMKDPLCQOVL	-----	-----	-----	-----	SRCTP-----VVYSAL PNGFRVATEYVK-DC	: 54		
CoreII_Nc	:	--MISRSALLRGSQALALRR	-----	-----	-----	-----	PAAAKTAQRGFAAAA SPAASYEPTT IAGVKA SRDD--SG	: 56		
CoreII_Sp	:	--MKSFTRNLRRFQTPRR	-----	-----	-----	-----	N--LHGIS----YTPKKVEVSEAGRET--PT	: 40		
CoreII_Bpt	:	MKLLTRAGSLSRFYSLKVAP	-----	-----	-----	-----	KVATEAPAG--VPPHPQDLEFTR PNGIVIASLEN--YA	: 56		
CoreII_Hs	:	MKLLTRAGFSRFYSLKVAP	-----	-----	-----	-----	KVATAAPAG--APPQPQDLEFTK PNGIVIASLEN--YS	: 56		
CoreII_Rn	:	MKLLSRAGFSRFYSLKVAP	-----	-----	-----	-----	KLKTSAPGG---VPLQPQELEFTK PNGIVIASLEN--YA	: 55		
CoreII_Hii	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	: -		
aMPP1_St	:	FS---	WLTGGGSDSLPPLDFPLKDI	-----	-----	-----	QLPPLPDYVEPGTKITTT TNGIKIASEIS--AS	: 93		
aMPP2_St	:	FS---	WITGDTSSSVTPLDFPLND	-----	-----	-----	VKLSPLPDYVEPAKTQITTT ANGLKVA SEAS--VN	: 93		
aMPP_OS	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	: -		
aMPP2_At	:	----	SWLSGGYSSSLPSMNIPLAG	-----	-----	-----	VSLPPLSDHVEPSKLKTTT PNGITIA TEMS--PN	: 92		
aMPP1_At	:	PAYLSWLSGGSRAALTSLDM	-----	-----	-----	-----	PLOQVSLPPLADKVEPSKLQITTT PNGIKIASETT--PN	: 96		
aMPP_Pf	:	-----	-----	-----	-----	-----	MYICYICYIFYMYICYIYI	-----	FFFFFFFFFFFF FMKILHTCYIFYFFV	: 50
aMPP_Nc	:	QSSRCLPLTRARAGPLPVNN	-----	-----	-----	-----	ARTLATRAAAVNTKEPTERDNITTT SNGVRVASEDL--PD	: 70		
aMPP_Sc	:	-----	-----	-----	-----	-----	MLRNGVQRLYSNIAR-----TDNFKLSS ANGLKVA TSNT--PG	: 37		
aMPP_Sp	:	FSHKTVLKRRLFRKECTPALK	-----	-----	-----	-----	SFYSTQDP-----ALNEVRTEK KNGVTVYCDPR--PG	: 64		
aMPP_Be	:	-----	-----	-----	-----	-----	MSPAAQLAKAAAR-----STCMTR LPSGIRVATAPS--NS	: 33		
aMPP_Hs	:	PAYRRFSSGAYPNIP	-----	-----	-----	-----	LSSPLPGVPKVFATVDGQEKFKETKVTT DNGIRVASEQNK--FG	: 88		
aMPP_Rn	:	PAHRRFSSGATYPNIP	-----	-----	-----	-----	LSSPLPGVPKVFATVDGQEKFKETKVTT DNGIRVASEQNK--FG	: 84		
CoreII_Sc	:	-----	-----	-----	-----	-----	MLSAARLQFAQGSVRR-----LTVSARDAP--T	: 26		
Seq1_Rhs	:	TSHDGVCSRICAFVLCMVAL	-----	-----	-----	-----	QFLMSTSAMAADDESPLREAEVANFMI GNGMEV VVIPDHR-A	: 106		
CoreII_Ce	:	---	MRSSFVSKSAAA	-----	-----	-----	IKTKPTG-----SLKTK INGLK VVSQEN--NG	: 39		
Seq1_Tm	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	MERHTVNEIEIFTIPFD-KA	: 19	
PP2_Stc	:	-----	-----	-----	-----	-----	MPMGHTATAQAGSGGLT-----ATEHRL ANGLRVVLSGDH-LT	: 37		
CoreI_Sc	:	RTVTSKTVSNQFKRSLATA	-----	-----	-----	-----	VATP-----KA EVTQ L SNGIVVATEHNP-SA	: 46		
PP_Aa	:	-----	-----	-----	-----	-----	MIKFLILGVILMVQVLTAQ-----ELYIRD PNGAKLIVKPRD-DT	: 40		
CoreII_Eg	:	RRFSSALGDSINPNQVGV	-----	-----	-----	-----	GDNVIRVNGRLEFVDKVEKGLKTSV DNGTKVITLDN--GG	: 72		
Seq1_Ap	:	-----	-----	-----	-----	-----	VLEDLEHG-----VASNGIRYGFYRVE--S	: 23		
Seq1_Bs	:	-----	-----	-----	-----	-----	MEKKAFFQQLDER-----TDIRYTD SGLKIFRLKFP--R AHLRLCNVK	: 41		

	*	140	*	160	*	180		
Seq1_Stp	:	FGSLDNKLTVD--DESRDAPAGIAHFLEHKLFE---	DE	SGGDISLKF	QI	CA-ETNAFT	: 98	
PPH_Bs	:	GSIDNRFVPLGKNEMVHVPDGLIAHFLEHKLFE---	KA-DG	DVFQDFSKQGA	-SANAFTS		: 85	
Seq1_Sys	:	EAISFQLWLRVGSRWEGDEINGTAHFLEHMFVKGT	PERL	AMGEFERAI	SRGA-GTNAAT		: 89	
Seq2_Sys	:	PVAVVDVWVRAGAIAPDAWPGVAHILEHMFVKGT	KRV	PPGAFDQVI	YNGG-MANAAT		: 96	
PP2_Hp	:	GVIEVDVLYKVGSRNETMGKSGIAHMLEHLEHFKS	TKNL	KAGEFDKIVKRE	GG-VSNAST		: 111	
PP1_Hp	:	GVIEVDVLYKVGSRNEVMGKSGIAHMLEHLEHFKS	TKNL	KAGEFDKIVKRE	GG-VSNAST		: 111	
Seq1_Rc	:	ASASVGVWVLGGRHERLEQNGIAHFLEHMAFKG	TCTR	TALQIAEEAIEDV	GGYINAYT		: 80	
Seq1_Rsp	:	HSASIGIWIAGGRHERPEQNGIAHFLEHMAFKG	TCTR	SALRIAEEI	DVGG-YINAYT		: 80	
Seq1_Rip	:	HSVAINLIAKVGARYENEEEEGISHFLEHMAFKG	TCTR	TAQQIAEEFDSI	GG-YFNAYT		: 82	
PP_M1	:	RSASVGVWVGVSRDEGATVACAAHFLEHLEHFKS	TSTR	TAMDIAQAIDAV	GG-ELNAFT		: 99	
PP_Mt	:	HSASVGVWVGVSRDEGATVACAAHFLEHLEHFKS	TPTR	SAVDIAQAMDAV	GG-ELNAFT		: 92	
Seq1_Mf	:	RSASVGVWVGVSRDEGRSVACAAHFLEHLEHFKS	TPTR	TAVDIAQAVDAV	GG-ELNAFT		: 72	
PP1_Stc	:	RSATFCIWAHVSRDETPALNGATHYLEHLEHFKG	TRKR	SALDISSAIDAV	GG-EMNAFT		: 112	
PP_Bs	:	RSVAIGVWIGTGSRHETPEINGISHFLEHMFVKG	STK	SAREIAESFDR	IGG-QVNAFT		: 79	
bMPP_Nc	:	QTSTVGVWIDAGSRAETDETINGTAHFLEHMAFKG	TKR	TQQQLELEI	NMGA-HLNAYT		: 117	
bMPP_Sp	:	QTATVGVWIDAGSRAETAKNNGAAHFLEHLEHFKG	TKNR	SQKALELEFG	NMGA-HLNAYT		: 99	
bMPP_Le	:	QTATVGVWIDAGSRAETDKTNGTAHFLEHMAFKG	TGR	SQHALELEVEN	NMGA-HLNAYT		: 106	
bMPP_Be	:	ATATVGVWIDAGSRAETKANNVAAHFLEHLEHFKG	TQR	TQSGLEIEI	NMGA-HLNAYT		: 112	
bMPP_Sc	:	SSATVGLFVDAGSRAENVKNGTAHFLEHLEHFKG	TQNR	SQQGIELEI	NMGA-HLNAYT		: 103	
bMPP2_St	:	QTATVGVWIDAGSRFETEENNGVAHFLEHLEHFKG	TEKR	PIRALEEEI	NMGA-HLNAYT		: 176	
bMPP1_St	:	KTATVGVFIDAGSRFETDETINGTAHFLEHLEHFKG	TEKR	TSWEMEEI	NMGA-HLNAYT		: 173	
CoreI_Hs	:	PTCTVGVWIDVGSRFETEKNNGAGYFLEHLEHFKG	TKNR	PGSALEKEVE	SMGA-HLNAYS		: 124	
CoreI_Bt	:	PTCTVGVWIDAGSRYESEKNNGAGYFLEHLEHFKG	TKNR	PGNALEKEVE	SMGA-HLNAYS		: 124	
CoreI_Bpt	:	PTCTVGVWIDAGSRYESEKNNGAGYFLEHLEHFKG	TKNR	PGNALEKEVE	SMGA-HLNAYS		: 124	
CoreI_Mm	:	ATCTVGVWIDAGSRYESEKNNGAGYFLEHLEHFKG	TKNR	PGNALEKEVE	SMGA-HLNAYS		: 123	
bMPP_Hs	:	STCTVGLWIDAGSRYENEKNGTAHFLEHLEHFKG	TKKR	SQDLELEI	NMGA-HLNAYT		: 134	
bMPP_Rn	:	STCTVGLWIDAGSRYENEKNGTAHFLEHLEHFKG	TKKR	SQDLELEI	NMGA-HLNAYT		: 134	
bMPP_Ds	:	STATVGLWIDAGSRSENDERNGVAHFLEHLEHFKG	TDKR	SQTDLELEVEN	NMGA-HLNAYT		: 117	
bMPP_Ce	:	STATVGVFIDAGSRYENEKNGTAHFLEHLEHFKG	TPRR	TRMGLELEVEN	NMGA-HLNAYT		: 133	
bMPP_Oc	:	QTATVGVWIEGTGSRYENEGNNGVAHFLEHLEHFKG	TKR	ASKALESELEI	SMGA-HLNAYS		: 113	
CoreI_Ce	:	ATATVGVWIEGTGSRYENEGNNGVAHFLEHLEHFKG	TGKR	ASAALESELEI	SMGA-HLNAYS		: 114	
bMPP_Eg	:	DTCTVGVWIDAGSRWETEKNNGVAHFLEHLEHFKG	TGKR	SRQDIEFGM	SMGA-HLNAYT		: 103	
bMPP_Lm	:	PFATVGVWIDAGSRFEDIRNSGVAHFLEHLEHFKG	TDRY	SKSDVENLF	SMGA-HFNAYT		: 112	
CoreII_Nc	:	PTTRLGAVAKAGTRYEP--LAGLTVGLEFAFKNT	TNKR	TALRITRESE	LLGG-QLQAYH		: 112	
CoreII_Sp	:	ATGSLVVINAGSRYQP--DAGVSHLEHLEHFKG	TTEER	SALRITRESE	LLGG-QLSTQI		: 96	
CoreII_Bpt	:	PASRIQLFIKAGSRYENSNNLGTSHLEHLEHFKG	TTKGA	SSFKITRGI	AVGG-KLSVTS		: 114	
CoreII_Hs	:	PVSRIQLFIKAGSRYEDFSNLGTSHLEHLEHFKG	TTKGA	SSFKITRGI	AVGG-KLSVTA		: 114	
CoreII_Rn	:	PLSRIQLFIKAGSRYENYNLGTSHLEHLEHFKG	TTKGA	SSFKITRGI	AVGG-KLSVTA		: 113	
CoreII_Hii	:	-----N-SGFAVTRNLQQKGG-NL					: 17	
aMPP1_St	:	PAASICLYVDCGSIIYEPASYGATHLEHLEHMAFKS	TLNR	SHLRIVREI	EAI	GG-NVTAAA	: 151	
aMPP2_St	:	PAASICLYVDCGSIIYETPASYGATHLEHLEHMAFKS	TLNR	SHLRIVREI	EAI	GG-NVTASA	: 151	
aMPP_OS	:	-----					: -	
aMPP2_At	:	PAASICLYVDCGSIIYETPQFRGATHLEHLEHMAFKS	TLNR	SHFRLVREI	EAI	GG-NTSASA	: 150	
aMPP1_At	:	PAASICLYVDCGSIIYEPYFHGATHLEHLEHMAFKS	TLNR	THFRLVREI	EAI	GG-NTSASA	: 154	
aMPP_Pf	:	AGLYVKCSRYEINDKVNEQMSVLMNMAFHS	TAHL	SHLRTIKSLEKI	CA-TVSCNA		: 108	
aMPP_Nc	:	AFSGVGYIDAGSRYENDYVRGASHIMDRLAFKS	TSSR	TADEMLETV	EKLGG-NIQCAS		: 128	
aMPP_Sc	:	HFSALGLYIDAGSRFEGRNKGCETHIDRLAFKS	TEHV	EGRAMAETI	ELI	GG-NYQCTS	: 95	
aMPP_Sp	:	HFSGLGVYVKAAGSRYETTKKFSGVSHMDRLAF	QATERT	PVGEMKAKLE	NL	GG-NYMCST	: 122	
aMPP_Be	:	HFAAVGVYVDA GPIYETSIDRQVSHFVSSLA	FKS	THGA-TE	SQVLKTMAGI	GG-NIFCTA	: 91	
aMPP_Hs	:	QFCTVGLILINSGSRYEAKYLSGIAHFLEHLEHFKS	TARFDSKDEI	LLTLEKHGG	-ICDCQT		: 147	
aMPP_Rn	:	QFCTVGLILINSGSRYEAKYLSGIAHFLEHLEHFKS	TARFDSKDEI	LLTLEKHGG	-ICDCQT		: 143	
CoreII_Sc	:	KISTLAVKVHGGSRYPATK--DGAHILNRFNQ	TNTR	SALKLVRES	ELI	GG-TFKSTL	: 82	
Seq1_Rhs	:	PIVTOIWIYKVGNADEPPGKSGIAHFLEHLEHFKG	TKKH	PSGEFSAKIAE	I	GG-EENAFI	: 164	
CoreII_Ce	:	AISQILAFRAGSRYEKVTQPGLVHVRNFVGR	DAQSY	PGLQVWSSA	SCA-NLNSFA		: 97	
Seq1_Tm	:	RTISCAFLIKKGSAAHEPEELAGISHLEHLEHMA	FRTKSY	DHFSLKYTVE	VVGG-TLNAFT		: 77	
PP2_Stc	:	PVAAVCLWYDVGSRHVVKGRITGLAHLEHLEHFKG	TQ	SAQVKGNHGFEL	VQAGG-SLNGTI		: 95	
CoreI_Sc	:	HTASVGVVFGSGAANENPNYNGVSNLWKNIFLS	-----	KENSAVAAKE	GLALSSNI		: 97	
PP_Aa	:	EAVALHVWFRVGSVYEKYDEKMAHFLEHLEHFKG	TTEKY	KYGEIDRI	E	SI	GG-NINAGT	: 98
CoreII_Eg	:	SVAQLTFLYKDGVPYENIFNAGISSMKEALTK	DGLTS	SEYITKTF	LQKACI	IVHEPTV	: 131	
Seq1_Ap	:	ESAAICIAARGSSFEPPGKYGIAHLEHLEHFKG	TFRGNE	YLQDGEDRAV	LSGG-EANAYT		: 81	
Seq1_Bs	:	IDFGSRDVCIRAESGDTLLPYCTAHFLEHLEHFKG	TWHN	-----GRNLYSDFFAH	CA-LNAFT		: 95	

	*	200	*	220	*	240									
Seq1_Stp	:	TFNQ	SFFSTASK-FQENLEL	QYFVL	--SA-NITDES	SVSR	KKIIGQ	ILMYQDD	--A	: 152					
PPh_Bs	:	FTRTAYL	FSSTSN-VERNLETL	LIDFVQ	--DP-YFTEKT	VEKEKGIIGQE	INMYDDN	--PD	: 139						
Seq1_Sys	:	SQDY	QFYFTSAPO	FEHLAPLQ	L	DVVL	--NP-TIADG	PFER	ERLVVLE	IRRSQDD	--P	: 144			
Seq2_Sys	:	SHDYAHFY	LTTAADYLPRTL	PLY	AEILL	--QA-EVP	ECLFY	EREVVLE	IRGSEDD	--P	: 151				
PP2_Hp	:	SFDI	TR	FIKTSQANL	DKSLELFA	ETMG	--SL-NLKE	DEFLP	ERQVVAE	RRWR	TDNS	-P	: 167		
PP1_Hp	:	SFDI	TR	FIKTSEANL	DKSLELFA	ETMG	--SL-NLKE	DEFLP	ERQVVAE	RRWR	TDNS	-P	: 167		
Seq1_Rc	:	SREAI	YARVLKAD	VGLALDVI	SDIVL	--NS-VFD	PREIEV	ERHVILQ	IGQALDT	--P	: 135				
Seq1_Rsp	:	SREMI	YARVLEAD	TGLALDVI	ADIVL	--NP-SSTR	RRSRSSGTSS	CRRSARR	STR	--P	: 135				
Seq1_Rip	:	GHE	NIVYARVLS	ENCHKALNI	ADIIQ	--NS-IF	ADEEIAK	EYQIIMO	IAHHHDN	--P	: 137				
PP_Ml	:	AK	HTCYAHVLDS	DLELAVDL	VADVVL	--NG-RC	AVDDVEL	ERDVVLE	IAMRDDD	--P	: 154				
PP_Mt	:	AK	HTCYAHVLGSD	LPLAVDL	VADVVL	--NG-RC	AADDVEV	ERDVVLE	IAMRDDD	--P	: 147				
Seq1_Mf	:	TRE	HTCYAHVLDS	DLELAVDL	VADVVL	--RG-RC	ATEDVEV	ERDVVLE	IAMRDDD	--P	: 127				
PP1_Stc	:	AK	EYTCYARVLD	TDLPLAID	VVCDMLT	--GS-LI	QEEVDV	ERGAILP	IAMTEDD	--P	: 167				
PP_Bs	:	S	KEYTCYAKVL	DEHANYAL	DVAD	MFF	--HS-TF	ENELKKE	KNVVYE	IKMYEDA	--P	: 134			
bMPP_Nc	:	SREN	IVYFAKALNE	DVPKVDI	LDIILQ	--NS-KLE	ESAIER	ERDVILR	SEEVEKQL	--	: 172				
bMPP_Sp	:	SRE	QIVYAHAPQ	NAVPHAVAV	ADILT	--NS-SI	SASAVER	ERQVILR	QEEVDKMA	--	: 154				
bMPP_Le	:	SRE	QIVYAKSFSK	DVPVAVDI	ISDILQ	--NS-KLE	SGAIER	ERDVILR	QEEVDKQL	--	: 161				
bMPP_Be	:	SRE	QIVYAKLFSQ	DAKGVNI	GDILQ	--NS-TL	DPGAIDR	ERAVILR	AEEVDKQV	--	: 167				
bMPP_Sc	:	SREN	IVYAKSLQ	EDIPKAVDI	ISDILT	--KS-VL	DNSAIER	ERDVILR	SEEVDKMY	--	: 158				
bMPP2_St	:	SRE	QIVYFAKVLG	DVPKAVDI	GDILQ	--NS-LLE	EDKIER	ERSVILR	MEEVEKQP	--	: 231				
bMPP1_St	:	SRE	QIVYAKVLDN	DVPVALDI	ADILQ	--NS-KF	EERKIER	ERDVILR	MEEVEGQT	--	: 228				
CoreI_Hs	:	TRE	HTIAYIKALSK	DLPKAVEL	ADIVQ	--NC-SLE	DSQIEK	ERDVILR	MQENDASM	--	: 179				
CoreI_Bt	:	TRE	HTIAYIKALSK	DLPKAVEL	ADIVQ	--NC-SLE	DSQIEK	ERDVILR	MQENDTSM	--	: 179				
CoreI_Bpt	:	TRE	HTIAYIKALSK	DLPKAVEL	ADIVQ	--NC-SLE	DSQIEK	ERDVILR	MQENDTSM	--	: 179				
CoreI_Mm	:	TRE	HTIAYLIKALSK	DLPKVV	-----						: 144				
bMPP_Hs	:	SRE	QIVYAKAFSK	DLPRAVEI	ADIIQ	--NS-TL	GEAIEI	ERGVILR	MQEVETNL	--	: 189				
bMPP_Rn	:	SRE	QIVYAKAFSK	DLPRAVEI	ADIIQ	--NS-TL	GEAIEI	ERGVILR	MQEVETNL	--	: 189				
bMPP_Ds	:	SRE	QIVYAKCLSK	DVPKAVEI	ADIIQ	--NS-QL	GESEIAR	ERSVILR	MQEVESNL	--	: 172				
bMPP_Ce	:	SRE	STIYAKCFTE	KLDQSVDI	ISDILL	--NS-SL	ATKDIEA	ERGVILR	MEEVAGNF	--	: 188				
bMPP_Oc	:	TDR	IAVAVQSS	EDVEKVVDI	ADVLR	--NS-KL	DSSAVEA	ERVLLR	LEEKEGDL	--	: 168				
CoreI_Ce	:	ER	DQIAVAVQAG	AQDVEKVVDI	ADVLR	--NS-KL	EASTIDT	ERVNLLR	LEASDYH	--	: 169				
bMPP_Eg	:	SRE	HTCYVVKCFK	DVPKAVDI	ADILL	--NS-KR	TEQDLDA	ERQIVVQ	KEDVEARI	--	: 158				
bMPP_Lm	:	SR	DRIAYVKAFTK	DVKMIDVVS	DLLQ	--RG-RY	RRHDIEA	ERPTILA	MREVEELV	--	: 167				
CoreII_Nc	:	TRE	AVVLQASFL	REDLPYFTEL	AEVIS	--ET-KY	TTFEFHEL	VEN	CIHEKQAKLD	-S	: 166				
CoreII_Sp	:	TRE	HILITARFL	NEYLEYARL	AEVVD	--AT-KF	LPQLTE	EVLPTAR	ESELFRED	-I	: 152				
CoreII_Bpt	:	TRE	NMAYTVECL	RDDVDILMEF	LNVT	--AP-EF	RRWEVAAL	QPQ	LRIDKAVALQ	N-P	: 169				
CoreII_Hs	:	TRE	NMAYTVECL	RDDVDILMEF	LNVT	--AP-EF	RRWEVADL	QPQ	LKIDKAVAFQ	N-P	: 169				
CoreII_Rn	:	TRE	NMAYTVEG	IRDIEILMEF	LNVT	--AP-EF	RRWEVAAL	RSQ	LKIDKAVAFQ	N-P	: 168				
CoreII_Hii	:	TV	TSREVVAYT	VETTANN	LEGLHYLQ	DVIQ	--P--AF	KPW	LADSVPF	-IKN--QVAC	: 70				
aMPP1_St	:	SRE	HLIYTYDALK	TYVPMVEL	IVSVR	--NP-AF	LDEWVSE	QLEKVK	SIDEYTKNP	--	: 206				
aMPP2_St	:	SRE	HMIYTYDALK	TYVPMVEM	ADCVR	--NP-AF	LDEWVKE	QLEKVK	AISEYSKNP	--	: 206				
aMPP_OS	:	-----									: -				
aMPP2_At	:	SRE	QMGYTIDALK	TYVPEMVEV	IVSVR	--NP-AF	LDEWVNE	ELRKVKV	IGEFATNP	--	: 205				
aMPP1_At	:	SRE	QMSYTIDALK	TYVPEMVEV	IVSVR	--NP-AF	LDEWVNE	ELRKMKV	IAELAKNP	--	: 209				
aMPP_Pf	:	FRE	HMVYSC	ECLKEYLPI	VTNLI	IGNVL	--FP-RF	L	SWEMKNNV	RNLNLMREKLFENN	--	: 163			
aMPP_Nc	:	SRE	SMMYQA	ATFNKAIP	TAVELMAE	TIR	--DP-KL	TDEELEGQ	IMTAQY	VNEIWSKA	--	: 183			
aMPP_Sc	:	SREN	IMYQASVFN	QDVGKMLQ	LMS	ETVR	--FP-KI	TEQELQEQ	KL	SAEY	IDEVVMKP	--	: 150		
aMPP_Sp	:	SRE	SMIYQAAV	FNDVKSMSK	L	AETVL	--AP-KI	QEDDLVHY	RDSIIY	ENSELWTKP	--	: 177			
aMPP_Be	:	TRE	SILYQGSV	LHDLPR	TVQL	ADTTL	--RP-AL	TEEEIAER	BATIAF	AEDLHSRP	--	: 146			
aMPP_Hs	:	SR	DTMAYAVS	ADSKGLD	TVVAL	ADVVL	--QP-RL	TDEE	EMTRMAVQ	ELEDLNR	PDP	: 204			
aMPP_Rn	:	SR	DTMAYAVS	ADSKGLD	TVVGL	ADVVL	--HP-RL	TDEE	IEIMTRMAVQ	ELEDLNR	PDP	: 200			
CoreII_Sc	:	DRE	YITLKATFL	KDLPYYVNA	ADVLY	--KT-AF	KPHEL	TESVLPA	ARYDYAVAEQCP	: 138					
Seq1_Rhs	:	GSDY	IAHQ	TVTPE	SLRMTME	FEADRMR	--HL-VL	TDAVIVP	ERDVILE	RRWRVEND	-P	: 220			
CoreII_Ce	:	TR	DIFGQISV	ARDQAAYALS	IGHVAA	--KP-AF	KPWELED	VTP	PTILADL	LSQKTPYG	--	: 152			
Seq1_Tm	:	DKL	AIAYAKV	PEFHFGK	T	LN	KEITF	--YP-IF	SPEDTEI	ERKII	LEYKMSQDDP	--	: 132		
PP2_Stc	:	S	FERIN	FETMPAHQ	LELALWLEA	DRMGSLA	-ALDDE	S	MEMNQ	RDVKN	RRQRYDN	-VP	: 153		
CoreI_Sc	:	SR	DQCS	IVSSLP	GSTDKSLDF	NQSF	IQQANLL	SSSNFEAT	KKSVLK	QVQDFEEND	-H	: 156			
PP_Aa	:	SKDY	YHVEIA	HPYWKQ	ALEV	YQLTM	---KAT	LDEEMIEK	KPIVIE	ELRRGKDN	P	: 153			
CoreII_Eg	:	VN	KS	IAEFT	VEGFR	TLAQPA	VADKFWQ	SLLF	PRFSPEN	VEVKRLVE	ESKETKRDS	-P	: 190		
Seq1_Ap	:	TRE	LILLCAE	FVSDSLAR	VAEK	FLAVS	---ARR	LVEGE	FER	ERAVVEA	VKGLISSP	--	: 136		
Seq1_Bs	:	TY	TD	INFM	F	TSLPDRL	RQTIPI	LDALWN	---HSF	D	KKIVAQ	EKAVITS	IQTAHLN	---	: 149

```

*           260           *           280           *           300
Seq1_Stp : DYRAYSGIILQNLFPK--TSIANDIAES--KESIQKITKILLETHHTYFYOPTNMSIFIVG : 208
PPh_Bs   : WRLYYGVNIENMYKE--HPVRIDIAGT--AESISHITKDLLYECYETFYHPSNMLLFIVG- : 194
Seq1_Sys : QRRIFQVVQLIFPG--TPYARPVLCR--REI IENLQAQQMRDFHAHWYQPPAMTVTVVG : 200
Seq2_Sys : DWLGFQALCQLLHPQ--HAYGRSVLGD--APSVQNYTANQRCFHRTHYQPENMTVVMVG : 207
PP2_Hp   : IGMLYFRFFNTAVVY--HPYHWTPICF--MDDIQNWTLKDIKKFHSLYQPKNAIVLVVG : 223
PP1_Hp   : IGMLYFRFFNTVMSI--TP-TMDAICF--MDDIQNWTLKDIKKFHSLYQPKNAIVLVVG : 222
Seq1_Rc   : DDIIFDWLQEAAYPD--QAMGRITILCP--SENIERFGREDFERFVAEHYQPDQMIISAAG : 191
Seq1_Rsp  : TTSSSTGCRRPPTPV--SFG-RTILCP--EERVSTFGRADTRFVGEHYGPDHMIISAAG : 190
Seq1_Rip  : DDLIYETFYNTVYKG--QPLGKSIILCT--TKTLVTFTEKEHFLNFIGKHYNAENLYLSIAG : 193
PP_M1    : EDALGDMFLAALFGD--HPVGRPVICT--MESVSAMTRTQHSFHVRRYTPERMVAVAG : 210
PP_Mt    : EDALADMFLAALFGD--HPVGRPVICS--AQSVMTRAQIQSFHLRRYTPERMVAAAG : 203
Seq1_Mf   : EDSLGDVFLSAMFGD--HPVGRPVICS--VESIETMTRAQHSFHVRRYTPERMIVAVAG : 183
PP1_Stc  : GDCVHDLFAHTMFGD--NALGRPVICT--VDTVNALTADRIRRFYRKHDPHTLVVAAAG : 223
PP_Bs    : DDIVHDLLSKATYGN--HSLGYPILCT--EETLASFNGDSLQYMHDYTPDRVVISVAG : 190
bMPP_Nc  : EEVFDHLHATAAYQ--HQPLGRTILCPR-ENIRD-ITRTELVNYIKNNYADRMYLVGAG : 228
bMPP_Sp  : DEVVFDHLHATAAYQ--GHPLGRTILCPK-ENIES-LTREDILQYIKDNYRSDRMIISSAG : 210
bMPP_Le  : EEVFEHLHAAVAFQ--GQPLGRTILCPK-NNILS-IQRDDLASYIQTNYTADRMVIVGTG : 217
bMPP_Be  : EEVFDHLHAAAFQ--ENALGYTILCPK-ENIQT-LSQADLQAYIKNNYADRMYVVGAG : 223
bMPP_Sc  : DEVVFDHLHEITYK--DQPLGRTILCPI-KNIKS-ITRTDKDYITKNYKGRMVLGAG : 214
bMPP2_St : EEVIFDQHTTAFQ--YTPLGRTILCPA-QNIEK-MTRAHIQDYISTHYGAHRMVISAG : 287
bMPP1_St : EEVIFDHLHSTAFQ--YSPLGRTILCPA-QNIKT-ITRSHLDKYISTHYTAPRMVIVASG : 284
CoreI_Hs : RDVVFNYLHATAFQ--GTPLAQAVEGCS-ENVRK-LSRADITEYLSRHYKAPRMVIAAG : 235
CoreI_Bt : RDVVFNYLHATAFQ--GTPLAQSVEGCS-ENVRK-LSRADITEYLSRHYKAPRMVIAAG : 235
CoreI_Bpt : RDVVFNYLHATAFQ--GTPLAQSVEGCS-ENVRK-LSRADITEYLSRHYKAPRMVIAAG : 235
CoreI_Mm : ----- : -
bMPP_Hs : QEVVFDYLHATAAYQ--NTALGRTILCPT-ENIKS-ISRKDVVDYITTHYKGRIVLAAAG : 245
bMPP_Rn : QEVVFDYLHATAAYQ--NTALGRTILCPT-ENIKS-ISRKDVVDYITTHYKGRIVLAAAG : 245
bMPP_Ds : QEVVFD----- : 178
bMPP_Ce : QEVVFDIILADVFK--GNPLSYTILCPI-ELIQT-INKNDLQGYINTHYRSGRMVIAAG : 244
bMPP_Oc : QGVTMNDNLHAAAYQ--GTSMSKSPICTS-TSLKA-ISGQHLKEWQEDNMRPIRMVLSAVG : 224
CoreI_Ce : QLVLFDMHHAAGEQ--GTPALSVLCTS-ESIPN-ISAQQLKEWQEDHYRVRMVSAG : 225
bMPP_Eg : DEVLMDHLHSAAFE--GSGICLSILCPL-ENIQKSITKGMIDDFVKTHYTGERMALVSG : 215
bMPP_Lm : DEVLMDNVHQAAYDPTTSGPLTILCPV-ENIAKNINKSMIEDYVRVHYTGERMCLVSSG : 226
CoreII_Nc : AAIALDAAHNVAFHS---GLGSPLYPTVDTPTSSYLNENSVAAFANLANKANIAVVADG : 223
CoreII_Sp : LRVAMAKLHEKAFHR---GICNEVY----LPASASPSISEIKDFASKAVKSNFSVISSG : 205
CoreII_Bpt : QAHVIENLHAAAYRN---ALANSLYCP--DYRIGKVTPELHDYVQNHFTSARMALIGL : 224
CoreII_Hs : QTHVIENLHAAAYQN---ALANPLYCP--DYRIGKVTSEELHYFVQNHFTSARMALIGL : 224
CoreII_Rn : QTRVIENLHDVAYKN---ALANLYCP--DYRMGKITSEELHYFVQNHFTSARMALVGLG : 223
CoreII_Hii : VP-HQVQAVELLHKAAFRN---GLGNSVYVP--KFQIGKLSSETMLHYVANNFNASCAV : 124
aMPP1_St : QHLLLEAVEH-SAGYSG--PYCNLAAT--EATVNRNLNSTVLEEFVAENYTAPRIVLAASG : 261
aMPP2_St : QHLLLEAVEH-SAGYAG--PYCNLMAT--EATINRLNSTVLEEFVAENYTAPRMVLAASG : 261
aMPP_OS : -----ENYTAPR : 7
aMPP2_At : MGFLLEAVEH-SAGYSG--ALANPLYAP--ESAITGLTGEVLENFVFENYTASRMVLAASG : 260
aMPP1_At : MGFLLEAVEH-SAGYSG--PLASPLYAP--ESALDRLNGELLEEFMTENFTAARMVLAASG : 264
aMPP_Pf : ELYITELLHNTAWYNN--TLGNKLYVY--ESSIENYTSENLRNFMLKHFSPKNMILIGVN : 219
aMPP_Nc : ELIILPELVHMAAFKDN--TLGNPLLC--KERLDYINRDVIQTYRDAFRPELHVAFAG : 239
aMPP_Sc : ELVLPELLHATAAYSGE--TLGSPLICP--RELIPSISKYYLLDYRNKFTPENTVAAFVG : 206
aMPP_Sp : DALLGEFAHVTAFQNN--TLGNCLLCT--PDKVNGITATSIREYLKYFRPEHLTAYAG : 233
aMPP_Be : DAFIGEMHAAVAFGGR--GLGNSIFCE--PQRARNMSTDTIREYFATYLHPSRMVAVAGT : 202
aMPP_Hs : EPLLTEMHAAAYREN--TVGLHRFCP--TENVAKINREVLHSHYLRNYTPDRMVLAVG : 260
aMPP_Rn : EPLLTEMHAAAFREN--TVGLHRFCP--VENIGKIDREVLHSHYLRNYTPDRMVLAVG : 256
CoreII_Sc : VKSAEDQLYAITFR---KGLGNPLLYDG---VERVSLQDIKDFADKVTKENLEVSGEN : 191
Seq1_Rhs : EQLLEEMQATLYQN--HPYRITIC--WMHEMEQLNREDALKFYDRYAPNNAIVVAG : 276
CoreII_Ce : --IVFEDIHRAAFRN--DSIFRFLYSS--KGQVGAYKSQETAKFAAKHFVSGNAVIVGIN : 206
Seq1_Tm : TSKLFDTLVETVWPG---PYCRPIICR--KETIEKISSEDEREYHRKNYNLDPCTKIILAG : 187
PP2_Stc : YGTAFEKLTALAYPEG-HPYHHTPICS--MADLDAATLEDARAFFRITYAPNNAVILSVVG : 210
CoreI_Sc : PNRVLEHLHSTAFQN--TPISLPTRCT--LESLENLVVADLESFANNHFLNSNAVIVGTG : 212
PP_Aa : TTVLWEEFEKLVYKVS--PYRFPIIC--FEETIRKFTREKILKFKYSFYQPRMVAIVG : 209
CoreII_Eg : FAYLQDILHKTAFKG--SPICHTSFVP--AYNLGYIDSNKIFDRWDAHGFGNIAVIATN : 246
Seq1_Ap : ESRIYRLHAAAWG--DSHLGRPIEC--YPETVANISKADVEEYKASVFSPERMSIAIVG : 192
Seq1_Bs : HQLSYHYQLISMLSP---SSPAAVFPAGRIEDIEALDISIQKAYKAAVAHRMTLFLIG : 206

```

	*	320	*	340	*	360	
Seq1_Stp	:	----	DIDIDETFLAIQRFQTTLSYPDRKRVTVDPLHY	----			: 241
PPh_Bs	:	---	PVDPEAIISQVRENQGGKPYTDQPEIKREEVKE	----			: 227
Seq1_Sys	:		NQSVGNLVETVARSFADCYRVKSPSQTLMPPLVNIP	----			: 236
Seq2_Sys	:	-----	DIREKAAIAYMEEIIFDHFGVRSECPPTTRLPN	----			: 239
PP2_Hp	:	-----	DVNSQKVFELSKKHFESLKNLDEKAIPTPYMK	----			: 255
PP1_Hp	:	-----	DVNSQKVFELTKKHFESLKNLDEKAIPTPYMK	----			: 254
Seq1_Rc	:	----	AVDFAAIVKQAERLFGHLRPIGAPAVQLARWS	----			: 223
Seq1_Rsp	:	----	GVDHGRIVAQAQALFGHLKPVGQRFMPADFL	----			: 222
Seq1_Rip	:	----	NIEFNKIVMIAEELFASLKQGVKSSFIPAKYI	----			: 225
PP_Ml	:	----	NVDDEMVALVREHFGSRLIRGRQSAPPRKS	----			: 241
PP_Mt	:	----	NVDHDGLVALVREHFGSRLVRRPVPAPRKG	----			: 234
Seq1_Mf	:	----	NVRTTTCGVVGPRAFRPPAGGRSAVAPRKAR	----			: 215
PP1_Stc	:	----	NVDHNKVVRRQVRAAFEKSGALKDPAAQPLAPR	----			: 255
PP_Bs	:	----	NISDSFIKDVEKWFGSYEAKGKATGLEKPE	----			: 220
bMPP_Nc	:	----	GVPHEQLVEMADKYFSKLPATAPVSSAS	----			: 256
bMPP_Sp	:	----	SISHEELVKLAEKYFGHLEPSAEQLSLG	----			: 238
bMPP_Le	:	----	GVDHQLSLVKLAEKHFSSLPVSANPLALG	----			: 245
bMPP_Be	:	----	NVDHAELCKLAETNFGKLPQ	----	GS		: 245
bMPP_Sc	:	----	AVDHEKLVQYAQKYFGHVPKSESFPVPLG	----			: 242
bMPP2_St	:	----	AVKHEEVVELVKKHFTKLSSNP-IITTS	----			: 314
bMPP1_St	:	----	PVKHEEFVEQVKKQFTKLSTN--PTTAS	----			: 310
CoreI_Hs	:	----	GVEHQQLDLAQKHLGGIPWTYAEDAVP	----			: 263
CoreI_Bt	:	----	GLEHRQLDLAQKHFGSLSGTYEDAVP	----			: 263
CoreI_Bpt	:	----	GLEHRQLDLAQKHFGSLSGTYEDAVP	----			: 263
CoreI_Mm	:	----		----			: -
bMPP_Hs	:	----	GVSDELILDLAKFHFG-DSLCTHKGEIP	----			: 272
bMPP_Rn	:	----	GVCNELLELAKFHFG-DSLCAHKGDVP	----			: 272
bMPP_Ds	:	----		----			: -
bMPP_Ce	:	----	GVNDAIVKMAEKYFG--ELKHGDSST	----			: 269
bMPP_Oc	:	G----	GCSGSKLQGLAEKYFGDLSN-EYPRKVP	----			: 252
CoreI_Ce	:	G----	GVS--VSSLADKYFGDLSN-EYPRKVP	----			: 251
bMPP_Eg	:	----	AVDHGQLCDLASKYFGALPTG	----			: 236
bMPP_Lm	:	----	GISPDAAHALAKEYFGSVSSM	----			: 247
CoreII_Nc	:	----	ASQAGLEKWVEPFKGVPATSSGN	----			: 247
CoreII_Sp	:	----	PDVQKASDLCAKYFAVIPDGSP	----			: 227
CoreII_Bpt	:	----	VSHPVLKQVAEQFLNIRGGLGL	----			: 246
CoreII_Hs	:	----	VSHPVLKQVAEQFLNMRGGLGL	----			: 246
CoreII_Rn	:	----	VSHSILKEVAEQFLNIRGGLGL	----			: 245
CoreII_Hii	:	VGVG----	VDQNALVGFQCSLELATAGK	----			: 148
aMPP1_St	:	----	VEHEELLKVAEPLLSDLPKVPRA	----			: 284
aMPP2_St	:	----	VEHEEFLKVAEPLLSDLPKVATI	----			: 284
aMPP_OS	:	MVLAASG----	VEHGELVSAIEPLLSDLPSVKRP	----			: 37
aMPP2_At	:	----	VDHEELLKVVEPLLSDLPNVPP	----			: 283
aMPP1_At	:	----	VEHEELLKVAEPLTSDLPNVPPQ	----			: 287
aMPP_Pf	:	----	VEHDELTKWTSRAFDQDYVPIPYTNQ	----			: 244
aMPP_Nc	:	----	VEHERAVKLAEKYFGDMKASDAPGLSRTGSETSVDSLVSSESSESSSSSSSD	----			: 293
aMPP_Sc	:	----	VPEKALELTEKYLGDWQSTHPP	----			: 229
aMPP_Sp	:	----	IPQETAKEITKELYGHLPSSSLP	----			: 256
aMPP_Be	:	----	VAHAELVDLVSKAFVPSSTRAPS	----			: 225
aMPP_Hs	:	----	VEHEHLVDCARKYLLGVQPAWGSA	----			: 284
aMPP_Rn	:	----	VEHEHLVECARKYLLGVQPAWGAP	----			: 280
CoreII_Sc	:	----	VVEADLKRQFVDESLLSTLPAGKSIVS	----			: 217
Seq1_Rhs	:	----	DVDAGRVRQLADETFGTLPRGPDLPAR	----			: 303
CoreII_Ce	:	----	VDGSILKSYAECEGVVDPGHIITN	----			: 230
Seq1_Tm	:	----	KVNDDYLSLLEKELSELERNKPGDPLP	----			: 214
PP2_Stc	:	----	DIDPEQTLAWIEKYFGSIASHDGKQPP	----			: 237
CoreI_Sc	:	----	NIKHEDLVNSIESKNLSLQTGTKP	----			: 236
PP_Aa	:	----	KVNPKEVEEEVMKTFGKEEGRVVP	----			: 233
CoreII_Eg	:	----	IEHEAVLAAITDSAWVARAHNKVGG	----			: 271
Seq1_Ap	:	----	RISRLEALRVVKLFSQLEPGGKVR	----			: 216
Seq1_Bs	:	----	GSENTETLLPPLHQLKRPDYHAER	----			: 231

	*	380	*	400	*	420	
Seq1_Stp	:	-----	-----	YPVIK-----	SSSVDMDV-----	-----	: 254
PPh_Bs	:	-----	-----	QEAVFR---	KEKEIKMNV-----	-----	: 242
Seq1_Sys	:	-----	-----	PPFTKV---	ETTTVVDDS-----	-----	: 251
Seq2_Sys	:	-----	-----	HPIQTI---	KRETLRIPE-----	-----	: 254
PP2_Hp	:	-----	-----	EPKQDG--	ARTAVVHKD-----	-----	: 270
PP1_Hp	:	-----	-----	EPKQDG--	ARTAVVHKD-----	-----	: 269
Seq1_Rc	:	-----	-----	GNE-----	R---RELKD-----	-----	: 232
Seq1_Rsp	:	-----	-----	GGE-----	R---RELKS-----	-----	: 231
Seq1_Rip	:	-----	-----	GGK-----	C---FIHKE-----	-----	: 234
PP_Ml	:	-----	-----	TGR--	INGGPALTLGKRD-----	-----	: 257
PP_Mt	:	-----	-----	TGR--	VNGSPRLTLVSRD-----	-----	: 250
Seq1_Mf	:	-----	-----	DGS--	VVSHRCSWSTPRD-----	-----	: 231
PP1_Stc	:	-----	-----	AGRRTVRAA	CRVELIGRK-----	-----	: 273
PP_Bs	:	-----	-----	-----	FHTEKLTRKKE-----	-----	: 231
bMPP_Nc	:	-----	-----	ILSK-KKPDFI	CSDIRIRDDT-----	-----	: 276
bMPP_Sp	:	-----	-----	APRG-LKPRFV	CSEIRARDDD-----	-----	: 258
bMPP_Le	:	-----	-----	RLSSERKPTFV	CSEARIRDDE-----	-----	: 266
bMPP_Be	:	-----	-----	GKAKFVRPAFT	CSVIRIVDD-----	-----	: 266
bMPP_Sc	:	-----	-----	SPRG-PLPVFC	RGERFIKENT-----	-----	: 262
bMPP2_St	:	-----	-----	QLVSEEPAI	FTCSEIRIIDD-----	-----	: 335
bMPP1_St	:	-----	-----	ELVAREPAI	FTCSEVRVIDDD-----	-----	: 331
CoreI_Hs	:	-----	-----	TLTP---	CRFTCSEIRHRDDA-----	-----	: 281
CoreI_Bt	:	-----	-----	TLSP---	CRFTCSQICHREDG-----	-----	: 281
CoreI_Bpt	:	-----	-----	TLSP---	CRFTCSQICHREDG-----	-----	: 281
CoreI_Mm	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
bMPP_Hs	:	-----	-----	ALPP---	CKFTCSEIRVRDDK-----	-----	: 290
bMPP_Rn	:	-----	-----	ALPP---	CKFTCSEIRVRDDK-----	-----	: 290
bMPP_Ds	:	-----	-----	-----	-----	-----	: -
bMPP_Ce	:	-----	-----	EFVP---	ATYSPCEVRGDIPD-----	-----	: 287
bMPP_Oc	:	-----	-----	EGGG---	IRFTCEYRYRNDY-----	-----	: 270
CoreI_Ce	:	-----	-----	QVDG---	TRFTCEYRYRNDN-----	-----	: 269
bMPP_Eg	:	-----	-----	QPKPSGFTRFL	CSDKRETNQL-----	-----	: 257
bMPP_Lm	:	-----	-----	NNRPLLRGVY	KVVHTVLWNEG-----	-----	: 268
CoreII_Nc	:	-----	-----	LNTAASKYF	CGEQRVAKN-----	-----	: 265
CoreII_Sp	:	-----	-----	LKSAPTKI	SSGESRVYSK-----	-----	: 245
CoreII_Bpt	:	-----	-----	SGAKAKYH	CGEIREQNG-----	-----	: 263
CoreII_Hs	:	-----	-----	SGAKANYR	CGEIREQNG-----	-----	: 263
CoreII_Rn	:	-----	-----	AGAKAKYR	CGEIREQNG-----	-----	: 262
CoreII_Hii	:	-----	-----	-----	SGTGSNYYGGDARKDTP-----	-----	: 165
aMPP1_St	:	-----	-----	EEPTPVYV	CGDYRRQAD-----	-----	: 301
aMPP2_St	:	-----	-----	EEPYPVYV	CGDYRCQAD-----	-----	: 301
aMPP_OS	:	-----	-----	-----	EEPKSVYVGGDYRCQAD-----	-----	: 54
aMPP2_At	:	-----	-----	AEPKSQYV	CGDFRQHTG-----	-----	: 300
aMPP1_At	:	-----	-----	LAPKSQYV	CGDFRQHTG-----	-----	: 304
aMPP_Pf	:	-----	-----	KEVTPKYT	CGFISVEDKN-----	-----	: 262
aMPP_Nc	:	SSESSGGLLS	KLFSPKAKKATPNPFLTRVPISTEDL	TRPAHYTCG--	FLTLPSQPPLNP-----	-----	: 351
aMPP_Sc	:	-----	-----	IT--K--	KVAQYTCG--	ESCIP--	PAPVFG : 251
aMPP_Sp	:	-----	-----	PLEAIPSHY	TCG--FMGIKKSEAPPVP-----	-----	: 281
aMPP_Be	:	S-----	-----	VTHSDIETAY	CGSHQLVIPKPPPTHNP-----	-----	: 254
aMPP_Hs	:	-----	-----	EAVDIDRSVA	QYTCGIKLERDMSNVSLGP-----	-----	: 314
aMPP_Rn	:	-----	-----	GAVWMLTAQ	WHSTRGGSSRWRETCQMSALR-----	-----	: 310
CoreII_Sc	:	-----	-----	KSEPKFFL	CEENRVRFIG-----	-----	: 235
Seq1_Rhs	:	-----	-----	VRPQEP	EQNTKRIVALDPR-----	-----	: 323
CoreII_Ce	:	-----	-----	QGSPFR	CGDYRREFAR-----	-----	: 245
Seq1_Tm	:	-----	-----	PPPSFEHTE	PRYIVRND-----	-----	: 231
PP2_Stc	:	-----	-----	RDGALPDV	MCGELREVVVEEVP-----	-----	: 259
CoreI_Sc	:	-----	-----	VLKKKA	AFLCSEVRLRDDT-----	-----	: 255
PP_Aa	:	-----	-----	KVQIPTEPE	QICIRFKLKD-----	-----	: 254
CoreII_Eg	:	-----	-----	VAAPASKYS	CGEGYDVVHRAKEFDDQ-----	-----	: 297
Seq1_Ap	:	-----	-----	EPETPEPRT	TFLREERG-----	-----	: 233
Seq1_Bs	:	-----	-----	KIIPACPPVLS	QKMMMLGDEER-----	-----	: 252

	*	440	*	460	*	480					
Seq1_Stp	:	---	TTAKLVVGF	RG-YLT-LT-QHSL	LT	YRIALKFL	S-----M-----L	: 288			
PPh_Bs	:	--	QPKCLVGLKSK	NPF-KL-GKELL	KHEL	SMNLLLE	-----A-----LF	: 278			
Seq1_Sys	:	---	IQQARLILLWR	SPGL-DQ-FEKT	LP	GLVAVILGR	-----C-----R	: 286			
Seq2_Sys	:	---	LGPSRLTMGW	NGPGI-DR-LQ	DNIGL	DLLAVVLAG	-----S-----H	: 289			
PP2_Hp	:	---	GVHLEWVALG	YKQVPA-FK-HK	DQ	VALDALSRL	LIGE-----C-----K	: 305			
PP1_Hp	:	---	GVHLEWVALG	YKQVPA-FK-HK	DQ	VALDALSRL	LIGE-----C-----K	: 304			
Seq1_Rc	:	---	LEQVFAFALAF	EFGPGY-R--DAD	LYTAQ	YATALLGG	-----C-----M	: 266			
Seq1_Rsp	:	---	LEQVFAFMAFE	APNY-R--AP	VYAAQ	YAMALGG	-----C-----M	: 265			
Seq1_Rip	:	---	LEQTSILV	LGFECTSY-IN-LG	QLYQ	TYLLSIFGG	-----C-----M	: 269			
PP_Ml	:	---	AEQTIVLLG	VRTTPGR-S--WE	HRWALS	VLHTALGG	-----C-----L	: 291			
PP_Mt	:	---	AEQTIVSLG	IRTTPGR-G--WE	HRWALS	VLHTALGG	-----C-----L	: 284			
Seq1_Mf	:	---	GEQSFVSLG	VRTTPGR-H--WE	HRWALS	VLNTALGG	-----C-----L	: 265			
PP1_Stc	:	---	TEQAFVILG	MPLAR-T--DERR	WAMG	VLNTALGG	-----C-----M	: 307			
PP_Bs	:	---	TEQAFVILG	MPLAR-T--DERR	WAMG	VLNTALGG	-----C-----M	: 265			
bMPP_Nc	:	---	IPTANIAI	AVEGVS--WSD	DYFTGL	VTAIVGN	YDKALGN-----APHQ	: 319			
bMPP_Sp	:	---	SPTANIAI	AVEGMS--WK	HPDYFT	ALVMQAI	IGNWDRAMGA-----SPHL	: 301			
bMPP_Le	:	---	LPTAFVAI	AVEGVG--WSS	PDYFPM	MQSIFG	GNWDRSLGA-----SSLL	: 309			
bMPP_Be	:	---	MPTAFVIA	LAVEGAS--WT	SADHW	PLLVAS	AMIGSYDRAAGN-----AHP	: 308			
bMPP_Sc	:	---	LPTAFVIA	LAVEGVS--WS	APDYF	VALATQ	AIVGNWDRAIGT-----GTNS	: 305			
bMPP2_St	:	---	LPLAQFAV	AFSGAS--WT	DPDSI	ALMVQ	QMLGSWNKSSGG-----GKHM	: 378			
bMPP1_St	:	---	LPLAQFAV	AFQGAP--WT	DPDAI	PLMVQ	SMLGTWNKNAGC-----GKHM	: 374			
CoreI_Hs	:	---	LPFAFVAI	AVEGPG--WAS	PDNVA	LQVANA	IIGHYDCTYGC-----GVHL	: 324			
CoreI_Bt	:	---	LPLAFVAI	AVEGPG--WA	HPDN	VALQVA	NAIIGHYDCTYGC-----GAHL	: 324			
CoreI_Bpt	:	---	LPLAFVAI	AVEGPG--WA	TR			: 299			
CoreI_Mm	:	---						: -			
bMPP_Hs	:	---	MPLAFVIA	AVEAVG--WA	HPDT	ICIMV	ANTLIGNWDRSFGC-----GMNL	: 333			
bMPP_Rn	:	---	MPLAFVIA	AVEAVG--W	THPT	IRIMV	ANTLIGNWDRSFGC-----GMNL	: 333			
bMPP_Ds	:	---						: -			
bMPP_Ce	:	---	LPMLYGAM	VVEGVS--W	THE	DNLALM	VANTLMGEYDRMRGF-----GVNA	: 330			
bMPP_Oc	:	---	IPHYAAVA	LRA-----				: 282			
CoreI_Ce	:	---	VPHMYAA	FAVEGVG--Y	AHKD	ALALQ	IANQFICQWDVTHAT-----SRTA	: 312			
bMPP_Eg	:	---	NPLTFVA	VAFQTPG--I	SHPD	AIKIKV	LEQLLGSYSRDKGEAA	YSCFARAI	VMDFY	: 311	
bMPP_Lm	:	---	MATANTA	VAFPICG--A	SHPD	SYPLQ	LHNVI	QFR--EG--QYDQFS	----SQRR	: 314	
CoreII_Nc	:	---	GKNAIVIA	AFPGASLG-----V	PHPETS	VLVGLL	GGVSNIKWS	----PG-----FSSL	: 308		
CoreII_Sp	:	---	GTNYFCL	GFP--AP-----A	ASPEL	FVLS	SILGGDAAVKWS	----HG-----NTLL	: 285		
CoreII_Bpt	:	---	DSLVAFA	LVAESAAI--GS	-AEANAF	SVLQ	HVLGAGPHVKRC	----SN-----ATSS	: 308		
CoreII_Hs	:	---	DSLVAFA	LVAESAVA--GS	-AEANAF	SVLQ	HVLGAGPHVKRC	----SN-----TTSH	: 308		
CoreII_Rn	:	---	DNLVAFA	LVAESAAI--GN	-AEANAF	SVLQ	HLLGAGPHIKRC	----NN-----TTSL	: 307		
CoreII_Hii	:	---	GNMAHVAV	AGPGGAV--S	NQK	EALAF	AVLQC	ALGAGPATKRG	----AV-----	: 207	
aMPP1_St	:	---	SGMTFA	LAFEVPGG-WL	KEK	AMTTL	TVLQMLM	GGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 348	
aMPP2_St	:	---	AEMTFA	LAFEVPGG-W	MSEK	ESMTTL	TVLQMLM	GGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 348	
aMPP_OS	:	---								: 97	
aMPP2_At	:	---	GEATFA	LAFEVPG--W	NNEKEA	IATV	LQMLM	GGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 346	
aMPP1_At	:	---	GEATFA	VAFEVPG--W	NNEKEA	VATV	LQMLM	GGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 350	
aMPP_Pf	:	---	VKKTNIA	IAYETQGG-W	KSS-D	MITTL	VLOTLM	GGGGSFSTC	----GP-----GKGM	: 308	
aMPP_Nc	:	N-LPTFT	IQLAF	EGLA---IS	DDI	YALATL	QTL	LGGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 398	
aMPP_Sc	:	N-LPELF	IQIGF	EGLP---I	DHPD	IYALATL	QTL	LGGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 298	
aMPP_Sp	:	Y-QQEF	TVVI	AAMEGLP---V	TDPD	IYALAC	LQFL	LGGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 328	
aMPP_Be	:	Y-EQTL	TVQVA	FVPPP---F	THPDM	FVSTL	QVLM	GGGGAFSAC	----GP-----GKGM	: 301	
aMPP_Hs	:	TPIPEL	TVIM	VGLESCS---F	LEED	FIPFA	VLNMM	GGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 362	
aMPP_Rn	:	PPRFQSS	TVYGG	ARELL---L	LEED	FIPFA	VLNMM	GGGGSFSAC	----GP-----GKGM	: 358	
CoreII_Sc	:	---	DSVAAI	GIPV	NKAS-----LA	QEV	LANYLTS			: 263	
Seq1_Rhs	:	---	VTVP	SFQK	SWTTSY	GTAEQ	GEA	ALDILSEILGG	-----C-----T	: 360	
CoreII_Ce	:	---	GNDVIM	VAGD	GAAVG--D	LKFL	AAQV	FLAHI	GRASPLK	FAS	: 287
Seq1_Tm	:	---	LEQVFA	AMAR	PICG---RI	SEDI	YPLY	ALNTALGSG	-----M	: 265	
PP2_Stc	:	---	ARALMA	AYRL	PEDG----	TRAC	DAAD	LALTVLGGG	-----E	: 291	
CoreI_Sc	:	---	LPKAWI	SLAVE	GEP---V	NSPNY	FVAK	LAAQIFG	SYN-----AFEP	: 293	
PP_Aa	:	--	RIEKAY	WII	GWRV	PAIG---K	T	YKGLLV	FSEILCGG	-----R	: 289
CoreII_Eg	:	F	TDVYSTY	TVYAF	KAPGR--S	NLKE	HAAS	LVIAQALS	N-----A	: 334	
Seq1_Ap	:	---	IEAAYA	LTL	PLPP	RSGLAN	VLAR	LRGVFN	LEAG-----A	: 269	
Seq1_Bs	:	---	MEDTWT	GLQI	GALPG---Q	N	LLS	IKLYWDIAAR	-----ILFQL	: 288	

	*	500	*	520	*	540			
Seq1_Stp	:	IGWTSKIYHTL	--Y-EDGKIDDSFDVDVEIHHNFQFVLISLDTP	-----	EPIAMSNYIR	:	339		
PPh_Bs	:	AKSSAQYESL	--Y-EKGYIDETFSDFTAEYFGFAAIGGDTP	-----	EPDQLAEDISS	:	329		
Seq1_Sys	:	VSRIFRELREE	--K-GLVTAIGAS-NSTQATQCMFYISAQLPAE	-----	NIPMVEQYIL	:	336		
Seq2_Sys	:	CARLVQRLREE	--L-GLVFDIQSC-FSLQKEASTFTINAYL TSA	-----	QAERVEAEIC	:	339		
PP2_Hp	:	SSWIQSELVDK	--K-RLASQAFSHNMQLQDESVFLFIAGGNPNV	-----	KAEALQKEIV	:	356		
PP1_Hp	:	SSWIQSELVDK	--K-RLASQAFSHNMQLQDESVFLFIAGGNPNI	-----	KAEALQKEIV	:	355		
Seq1_Rc	:	SSRIFQKIREE	--R-GLCYSIFAQ-AGAYDTGMITIYAGTSGE	-----	EVADLCGLTI	:	316		
Seq1_Rsp	:	SSRIFQKIVREE	--R-GLCYSIFAQ-SGAYDTGQITIIYAGTSGE	-----	EVADLAGLTV	:	315		
Seq1_Rip	:	SSRIFQSIREK	--L-GLAYVVGYSY-NSAYFDSVFTIYASTAHN	-----	KLELLYREIK	:	319		
PP_Ml	:	SSRIFQEIRET	--R-GLAYSVYSA-LDIFADSGALSVYAACLPG	-----	RFADVMQVIS	:	341		
PP_Mt	:	SSRIFQEVRET	--R-GLAYSVYSA-LDLFADSGALSVYAACLPE	-----	RFADVMRVTA	:	334		
Seq1_Mf	:	SSRIFQQIRES	--R-GLAYLGVLD-RGPLRDSGALSVYAGCQPE	-----	RFDEVVRVTT	:	315		
PP1_Stc	:	SSRIFQEVREK	--R-GLAYSVYSY-TSGFADCGIFGVYAGCRPS	-----	QVHDLVKICR	:	357		
PP_Bs	:	SSRIFQDVRED	--K-GLAYSVYSY-HSSYEDSGMLTIYGGTGAN	-----	QLQQLSETIQ	:	315		
bMPP_Nc	:	GSKLQSGFVHKH	----DLATSVMFSF-STSYSDTGLWGIYLVTD	-----	KLDRVDDLHV	:	366		
bMPP_Sp	:	SSRISTIVQQH	----QLANSFMSF-STSYSDTGLWGIYLVTE	-----	NLGRIDDLVH	:	348		
bMPP_Le	:	SSRISHIISSN	----SLANSFMSF-STSYSDTGLWGIYLVSE	-----	NLMNLDDTLH	:	356		
bMPP_Be	:	SSKLAQIVAKH	----NLANSFTSF-NTIYSDTGLWGIYIQSN	-----	NRDNLDDLAH	:	355		
bMPP_Sc	:	PSPLAVAASQNG	----SLANSYMSF-STSYSDTGLWGMIVTDS	-----	NEHNVLIVN	:	354		
bMPP2_St	:	GSEIVQRVAIN	----ELAESVMAF-NTNYKDTGLFGVYAEAK	-----	PDCLSDLAY	:	424		
bMPP1_St	:	GSDLAQSVAIN	----ELAESMMSF-NTNYKDTGLFGVYAVAK	-----	SDCLSDLSY	:	420		
CoreI_Hs	:	SSPLASGAVAN	----KLCQSFQTF-SICVAETGLLGAHFVCD	-----	RMKIDDMMF	:	370		
CoreI_Bt	:	SSPLASIAATN	----KLCQSFQTF-NICVAETGLLGAHFVCD	-----	HMSIDDMMF	:	370		
CoreI_Bpt	:	-----	-----T-----	-----	TWPSRWP	-----	TPSLATTTA	:	316
CoreI_Mm	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
bMPP_Hs	:	SSKLAQLTCHG	----NLCHSFQSF-NTSYSDTGLWGLYMVCE	-----	SSTVADMLH	:	379		
bMPP_Rn	:	SSKLAQLTCHG	----NLCHSFQSF-NTSYSDTGLWGLYMVCE	-----	QATVADMLH	:	379		
bMPP_Ds	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
bMPP_Ce	:	PTRIAEKLSD	----AGIEVFQSF-NTQYKETGLVGTYFVAA	-----	PESIDNLID	:	376		
bMPP_Oc	:	-----	-----	-----	-----	-----	-----	:	-
CoreI_Ce	:	ASRIVQKIGHD	----HGVHNLQHF-NINYKDTGLFGIYFVADAH	-----	DLNDTSGIMK	:	361		
bMPP_Eg	:	DPKVGQFFRENKAGHNPIHSLNAF-WAYPEVGLLGFYIAIE	----	PGKSYGHEWENILH	:	366			
bMPP_Lm	:	NPNPWVERVPN	-----LVQLRPF-YTPYEETALIGYHIVTARMATSGVARDDAOTLMLN	-----	-----	:	367		
CoreII_Nc	:	AKAT	-----AANPGAEFAH-NYASDAGLAIQITGKG	-----	AAVGVAVEAV	:	352		
CoreII_Sp	:	AKAAGT	-----ASEYKATAVAD-LTPYSDASILSVVISGSCP	-----	KAIKATASESF	:	332		
CoreII_Bpt	:	LYQAVA	---K---GVHQPFDVSAF-NASYSDSGLFGFYTISQAA	-----	SAGDVIKAAYN	:	356		
CoreII_Hs	:	LHQAVA	---K---ATQQPFDVSAF-NASYSDSGLFGIYTTISQAT	-----	AAGDVIKAAYN	:	356		
CoreII_Rn	:	LSQVA	---K---GSQQPFDVSAF-NASYSDSGLFGIYTVSQAA	-----	AAGDVINAAYN	:	355		
CoreII_Hii	:	NGPFGKALSS	---A---LGDANARFAAL-NASYADAGLFGFVVSTEAQ	-----	NAGKAVD	:	255		
aMPP1_St	:	YSRIYLRLVNL	---AYPQIHAFSAF-SSIYNNTGLFGIQAATTSD	-----	FAPRAIEVAVK	:	399		
aMPP2_St	:	YSRIYLRLVNL	---QYPQIHAFSAF-SSIYNNTGLFGIQGTTSSD	-----	FGPQAVDVAVK	:	399		
aMPP_OS	:	---GKGMHSRLYLRLIX	---NXHQIXHSLHL	-----	-----	:	122		
aMPP2_At	:	HSWLYLRLLN	---QHQQFQSC TAF-TSVENNTGLFGIYGCTSP	-----	FASQGIELVAS	:	397		
aMPP1_At	:	HSWLYRRVNL	---EYQEVQSC TAF-TSIFNDTGLFGIYGCS	-----	FAAKAIELAAK	:	401		
aMPP_Pf	:	YSRIYFLNVLN	---SYNFIESCMAF-STQHSDTGLFGIYFTG	-----	NTSDIKAMAL	:	359		
aMPP_Nc	:	YSRIYTNVLN	---QHGWVESC VAF-NHSYSDSGLFGIAASCYPG	-----	RTLPLMQVMCR	:	449		
aMPP_Sc	:	YSRIYTHVLN	---QYFVENC VAF-NHSYSDSGLFGISLSCIPQ	-----	AAFQAVEVIAQ	:	349		
aMPP_Sp	:	YSRIYLNVLN	---QYPWVETCMAF-NHSYSDSGLFGMFVTILDD	-----	AAHLAAPLIIR	:	379		
aMPP_Be	:	YSRIYTNVLN	---RYRWME SCAF-QHAYSS TSLFGISASC VPS	-----	FNPHLCNVLAG	:	352		
aMPP_Hs	:	FSRIYLNVLN	---RHHWMYNATSY-HHSYEDTGLLCIHASADPR	-----	QVREMVEIITK	:	413		
aMPP_Rn	:	FSRIYLNVLN	---RHHWMYNATSY-HHSYEDTGLLCIHASADPR	-----	QVREMVEIITK	:	409		
CoreII_Sc	:	LSEISG	-----LISSAKLDKFTDGGIFTLFVRDQ	-----	DSAVVSSNIK	:	302		
Seq1_Rhs	:	RSRIYQELVVK	---Q-AIASSGGAYFNGRSLPSSFTVFGSPRGE	-----	AKIEEVEDAID	:	412		
CoreII_Ce	:	PGSTSGLALAN	----LPEGVTGSFAFQAFYDGSGLVGVYLLATG	-----	ANADSAVR	:	334		
Seq1_Tm	:	SSII FHEIREK	----EGFVYDVFSQIYALKETCIIIVYAALSPE	-----	KIDEFFSKMK	:	315		
PP2_Stc	:	SSRIYNRLVRR	----DRTAVAAGFGLRLLAGAPSLGWLDVKTS	-----	DVEVPVIET	:	340		
CoreI_Sc	:	ASRIQGIKLLDNIQEQQLCDNFNHFSLSKSGIWF	-----	NVTMIDDLIH	:	345			
PP_Aa	:	ISVFYRELRE	-----KGLVYSYSCGDMGPRDNIFITATFPPE	-----	NYEKVKRVE	:	338		
CoreII_Eg	:	VSPVLN	--TS-----FAPKRLEVFYQAVDTVCTICLSSVQASN	-----	AQLKAFKA	:	378		
Seq1_Ap	:	TSII FKEVRE	-----ERGLAYGFNV DVHITSWG	-----	SSMSLIVL	:	305		
Seq1_Bs	:	DSPFFQEIQQT	--Y-RLEIDRLSAETYIYEDGCFILILHSQGTHS	-----	SAYIDVAS	:	337		

	*	560	*	580	*	600		
Seq1_Stp	:	QKLATIKIS--KEFTNEHLNLLK	KEMYGDFIQS	DSIEHL--THQFS-LY	SDSD-KETY	:	393	
PPh_Bs	:	--MLLRAG--ELITAEKIELAR	KKKIGTFLKALNSPEYI--	ANQFT-RYAF	LD---MSLF	:	379	
Seq1_Sys	:	DHIERLQN---EPIPEKDLER	IRTOVANRFIFGNRPGDR--	ANLYCYYYAQIC	D-LEPA	:	390	
Seq2_Sys	:	AAIQTLQT---TPISTAELARA	QRIKCNDFIFSTETPAQL--	AGLYC-YYQTLAT-AELA	:	392		
PP2_Hp	:	ALLEKLKK---GEITQAE	LDKIKINQKADFISN	LESSSDV--AGLFA-DY	VQND-IQGL	:	409	
PP1_Hp	:	ALLEKLKK---GEITQAE	LDKIKINQKADFISN	LESSSDV--AGLFA-DY	VQND-LQGL	:	408	
Seq1_Rc	:	DELKRAAE---D-MTEAEVA	RARARAKAGMLMGL	SPSSR--AERMARNLAI	WGR-VPGL	:	369	
Seq1_Rsp	:	DELKRATE---D-MSEAEVA	RARARAKAGMLMGL	SPSNR--AERLARLLAI	WGR-VPGV	:	368	
Seq1_Rip	:	NEIIKITE---T-VSTEEI	IRAKMQRSLNMQAQ	QNTYK--SEETGKNYSV	FCK-YILP	:	372	
PP_M1	:	EVLASVAG---DGITEAE	CRIAKGSRGGIILG	EDSNSW--MSRLGRSE	NYGK-YRGI	:	395	
PP_Mt	:	DVLESVAR---DGITEAE	CGIAKGSIRGGLVLG	EDSSSR--MSRLGRSE	NYGK-HRSI	:	388	
Seq1_Mf	:	EVLEGVAR---DGITAE	DECRIAKGSRGGLVLG	EDSGSR--MHRIGRSE	NYGE-HRTI	:	369	
PP1_Stc	:	DELDHVAE---HGLTDDEI	GRAVGQIQGSTVVG	LEDTGAL--MNRIKSE	ICWGE-QMSV	:	411	
PP_Bs	:	ETLATLKR---DGITSKE	LENSKEQMKGSIMLS	LESTNSK--MSRNGKNE	LLIGK-HKTL	:	369	
bMPP_Nc	:	FSLREWTRLCs-NVSEAE	VARAKAQIKASILLS	DGTTAV--AEDIGRQI	VTSGRMSP	:	422	
bMPP_Sp	:	FTLQNWARLT--VATRAE	VEVARAKQIRASILLS	LDSTTAI--AEDIGRQI	TTC-RRMSP	:	403	
bMPP_Le	:	FTLKEWTRMSI-APTEGE	VEVARAKQIKAGLLLS	DGTTAV--AEDIGRQI	VTSGRMTP	:	412	
bMPP_Be	:	FTVREWMRLAT-APSEGE	VATAKQIKTSLLLA	DGTPPV--AEEIGRQI	AYG-RRISP	:	411	
bMPP_Sc	:	EILKEWKR	IKSGKISDAEVNRAKQI	KAALLS	DGSTAI--VEDIGRQI	VVTTG-KRLSP	411	
bMPP2_St	:	VIMNGICKLSY-KVSDAD	VVARAKQIKSSIMLH	IDGSGPT--AEDIGRQI	LITYG-RRIPY	:	480	
bMPP1_St	:	CIMREISKLCY-RVSDAD	VTHACNOIKSSIMLH	IDGTSPV--AEDIGRQI	HVTYG-RRIPV	:	476	
CoreI_Hs	:	VLOGQWMRLC-TSATESE	VARAKQIKRNALVSH	DGTPPV--CEDIGRQI	LITYG-RRIPL	:	426	
CoreI_Bt	:	VLOGQWMRLC-TSATESE	VARAKQIKRNALVSH	DGTPPV--CEDIGRQI	LITYG-RRIPL	:	426	
CoreI_Bpt	:	PTVAERT----	CPAHLPLLRPTSCARV	SRPSTSATQTPG--	CWAHTSSATT-----	:	362	
CoreI_Mm	:	-----	-----	-----	-----	:	-	
bMPP_Hs	:	VVQKEWMRLC-TSVTESE	VARAKQIKTNMLLQ	DGSTPI--CEDIGRQI	MCYN-RRIPI	:	435	
bMPP_Rn	:	AVQKEWMRLC-TAVSESE	VARAKQIKTNMLLQ	DGSTPI--CEDIGRQI	MCYN-RRIPI	:	435	
bMPP_Ds	:	-----	-----	-----	-----	:	-	
bMPP_Ce	:	SVLQQVWVLA-NNIDEA	AVDRAKRSIHTNLLM	DGSTPV--CEDIGRQI	ICYG-RRIPT	:	432	
bMPP_Oc	:	-----	-----	-----	-----	:	-	
CoreI_Ce	:	SVAHEWKHLAS-AATEE	EVAMAKNQFRTNLYQ	NETNTQK--AGFNAKEL	IYTC-NLRQL	:	417	
bMPP_Eg	:	YAMRELIRVSRNISEE-E	FERAKNOIKLQTM	LQDGTNI--ADDIGRQI	VLSFG-ARVPL	:	422	
bMPP_Lm	:	YVLSLYDL	CATKVEDSLLEAAKAE	FKASVMMDSTTNS--	AEDLGRQI	MIHFG-RRVPL	424	
CoreII_Nc	:	KGLKAI	AAG---VSKEDLTKAI	AKAKFNLLSASEVSGTG--	LVHACANLI	AGG-KPIQV	406	
CoreII_Sp	:	KALKSLSSN----	IPNDVVKSGIAMAKTK	YLSAFEPVTLN--AISASS	LVSASK----GS	:	382	
CoreII_Bpt	:	Q-VKTIAQGN---LSNP	DVQAANKIKAGYLS	SVESSEGF--LDEV	GSQA	AAG-SYTPP	409	
CoreII_Hs	:	Q-VKRIAQGN---LSNT	DVQAANKIKAGYLS	SVESSECF--LDEV	GSQA	AVG-SYMP	409	
CoreII_Rn	:	Q-VKAVAQGN---LSSA	DVQAANKIKAGYLS	SVETSEGF--LSEI	GSQA	ATG-SYMP	408	
CoreII_Hii	:	ALT----RALKSGS---	VSAEDVNRGKALLK	VAVLDAYSTDSSL--	IAEMGLQAVLTK-D	:	305	
aMPP1_St	:	ELTAVANPG---EVD	MVQLDRAKQSTKSA	ILMNE	SRMVA--SEDI	GRQI	IYG-ERKPV	453
aMPP2_St	:	ELIAVANPS---EVD	QVQLNRAKQATKSA	ILMNE	SRMVA--SEDI	GRQI	IYG-ERNPV	453
aMPP_OS	:	-----	-----	-----	-----	:	-	
aMPP2_At	:	EMNAVADG----	KVNQKHLDRAKAATK	SAILMNE	SRMIA--AEDI	GRQI	IYG-ERKPV	450
aMPP1_At	:	ELKDVAGG----	KVNQAHLDRAKAATK	SAVLMNE	SRMIA--AEDI	GRQI	IYG-ERKPV	454
aMPP_Pf	:	EFQKMN-----	RVTDEELNRAKKS	IKSFMWMSLEYKSIL--	MEDLARQMMILN	-RILTG	410	
aMPP_Nc	:	ELHALTTDHGYSALGE	LEVSRAKNOIRSSLLM	NE	SRMVE--LEDL	GRQV	VHG-RKIPV	506
aMPP_Sc	:	QMYNTFANKDLRLT-E	DEVRAKNOIKSSLLM	NE	SKLVE--LEDM	GRQV	MHG-RKIPV	405
aMPP_Sp	:	ELCNTVLSVTSEET---	ERAKNOIKSSLLM	NE	SRMIS--LEDL	GRQI	QTQNGLYITP	432
aMPP_Be	:	EFVHMARNLSDEEV---	ARAKNOIKSSLLM	NE	SQVIT--VEDI	GRQV	IAQN-QRLEP	404
aMPP_Hs	:	EFILMG-G----	TVDTVELE	RAKTOITSMMLMNE	SRPVI--FEDV	GRQV	IATR-SRKLP	465
aMPP_Rn	:	EFILMG-R----	TVDLVELE	RAKTOITSMMLMNE	SRPVI--FEDV	GRQV	IATR-SRKLP	461
CoreII_Sc	:	KIVADLKK-----	GKD-IPAINYTKL	KNAVQ--NESVSSPIELN	-----	:	339	
Seq1_Rhs	:	AEIRKIEFG---ITD	VELEKAKNRFRVRSI	FARDSQSGM--AGIYC-AA	ATGDTAHDV	:	466	
CoreII_Ce	:	ATVKVLR-----	TTQVQDIEGCKRRRAI	ADILFNAENNVYS--	AYDLATNAYNG---	PEQ	384	
Seq1_Tm	:	DVLSNES-----	LFMKNFEYGMRYL	GKLDVTDNPAGM--	MSFVIDDLSNDS--	LETI	365	
PP2_Stc	:	AIDEELARFADEGPTA	EEMERAAQIQEREWLDR	IGTVAGR--ADELCR	YAVLFG-DPQLA	:	397	
CoreI_Sc	:	FTLKQWNRLT-ISVTD	TEVERAKSLIKLQ	LQLYESGNPVNDANLI	CAEVIKG-SKLSL	:	403	
PP_Aa	:	ELLKETYEN----	LTDEQVEEAKSRI	INSRLFEEERVEND--	AFDICYSYTVVR-DLDFY	:	391	
CoreII_Eg	:	ALSKIG-----	TLSEADLAVHKSAA	LLTAYGNVSWRAT--	QATLIDSFNTT	-QPLSP	429	
Seq1_Ap	:	EGNRDRVG-----	ELFDAMTRSERALR	GGYPESEWR--E--	GRRIRYFYTRREA	:	352	
Seq1_Bs	:	YYVTQKKEQ-----	VAAWLQYGDSDI	TDAIIYDSDYVRKCFEWA	AECRDCDS-----	F	386	

	*	620	*	640	*	660	
Seq1_Stp	:	FDIPKTI	ERLTLKDVVTIGKAFFEKADA	-SDFTVFPK	-----		: 429
PPh_Bs	:	DVVTVLEQITLEDVQNVIQEEIAADRL	-TVCKVVPKS	-----			: 415
Seq1_Sys	:	LTPVQIQALTAADLOKSACTYLSPTAY	-GKVIALPAED	-----			: 428
Seq2_Sys	:	IAYPQIVRQYWPEALQTLAQRYLSTGAY	-ALVLLLEAAES	-----			: 430
PP2_Hp	:	TDYQRQFLDLKVSIDLVRVANEYFKDTS	-TTVFLKP	-----			: 444
PP1_Hp	:	TDYQQQFLDLKVSIDLVRVANEYFKDTS	-TTVFLKP	-----			: 443
Seq1_Rc	:	DEVSTLIDGVTVEAVRSYAGRMMAIQDR	TALALYCPAEAAPDLAGLRRLAA	-----			: 421
Seq1_Rsp	:	DEAVEKIDAVTVGAVRDYAERMAQARS	--ALALYCPTEAAPALAQIRERLAA	-----			: 418
Seq1_Rip	:	EEIIEITNIRADDIINTANKIFSGTT	--TLAIIICPNDLNGF	-----			: 412
PP_M1	:	EHTLQQIDEVTVVEQVNALAHQLLNKRY	--GAAVLGPYASKKTLPRQLRIMVN	-----			: 445
PP_Mt	:	EHTLRQIEQVTVEEVNAVARRHLLSRRY	--GAAVLGPHGSKRSLPQQLRAMVG	-----			: 438
Seq1_Mf	:	DHTLAQIEAVTLEEVNAVHQLLSRDY	--GAAVLGPYSSKKRCHNSFKLSPADPLRWVQ	-----			: 426
PP1_Stc	:	DDMLARASVTPDDVRAVARVDVLRGR	--SLSVICPLKDKQASRLHDAVA	-----			: 459
PP_Bs	:	DEIINELNAVNLERVNGLARQLFTEDY	--ALALISPSGNMPS	-----			: 409
bMPP_Nc	:	AEIERIDAVSAKDVMDFANKKIWDQDI	-AISAVGSIEGLFDYARIRGDMSRNAF	-----			: 476
bMPP_Sp	:	QEVDLRIGQITEKDVARVA SEMIWDKDI	-AVSAVGSIEGLLDYTVFVAVFL	-----			: 453
bMPP_Le	:	AQIENAVDAVSVDDIKRVAQKYLWDKDF	-ALAAFENIDGLKDYGRIRNDMSSMLY	-----			: 466
bMPP_Be	:	FEIDRLVDAVTVEDVKRVANEFIYDRDL	-AIVAVGPVECLPDYNRIRSAMNLLRY	-----			: 465
bMPP_Sc	:	EEVFEQVDKITKDDIIMWANYRLQNKPV	-SMVALCNTSTVPNVSYIEEKLNQ	-----			: 462
bMPP2_St	:	AELFSRIDSVDGTGTIKRVNRNRFIFDR	DV-AISARGPIQDLPDYNWFRRRTYWLR	Y-----			: 534
bMPP1_St	:	TELFARVDAVDASTIKRVANRNFIFDQD	V-AISALGPIQTLPDYNWFRRRTFMLRY	-----			: 530
CoreI_Hs	:	AEWESRIAEVDASVREICSKYIYDQCP	-AVAGYGPPIEQLPDYNRIRSGMFWLRF	-----			: 480
CoreI_Bt	:	AEWESRIAEVDARVVREVC SKYFYDQCP	-AVAGYGPPIEQLPDYNRIRSGMFWLRF	-----			: 480
CoreI_Bpt	:	-----					: -
CoreI_Mm	:	-----					: -
bMPP_Hs	:	PELEARIDAVNAETIREVCTKYIYNRSP	-AIAAVGPIKQLPDFKQIRSNMCWLRD	-----			: 489
bMPP_Rn	:	PELEARIDAVDAEMVREVCTKYIYGKSP	-AIAALGPIERLPDFNQICSNMRWTRD	-----			: 489
bMPP_Ds	:	-----					: -
bMPP_Ce	:	PELHARIESITVQQLRDVCRRVFLEGQV	-SAAVVGKTYQYWPVNEEIHGRLIRMQ	-----			: 485
bMPP_Oc	:	-----					: -
CoreI_Ce	:	SELEAQIQKVDAGAVREAI SRHVYDRDL	-AAVGVCRTEAFP NYALTRAGMSWWRM	-----			: 471
bMPP_Eg	:	ASFFEQLDAISREDLIRVGPRVLLRQGP	-RGGGDWRHGQARVRRPAGDDLRLGPLSCPL	-----			: 481
bMPP_Lm	:	QEVFERVDAVTPESLRAAAEKYLGVVQP	-TVSCIGASSTLPKYDPLSLVSNVHPQLTPA	-----			: 483
CoreII_Nc	:	AETLKALEGVTAEKLAQA AKKLL-EGKA	-SVSAVGDHLVLPYAEDLGLKV	-----			: 454
CoreII_Sp	:	DAFISGFDPKTPASISKVSSLL-AKPA	-STVAVGNLDVLPYYDEL	-----			: 426
CoreII_Bpt	:	STVLQQIDAVADADVINA AKKFFV-SGRK	-SMAASGNLGH TPFIDEL	-----			: 453
CoreII_Hs	:	STVLQQIDSVANADIINA AKKFFV-SGQK	-SMAASGNLGH TPFVDEL	-----			: 453
CoreII_Rn	:	STVLQQIDAVADADVKA AKKFFV-SGKK	-SMTASGNLGH TPFDEL	-----			: 452
CoreII_Hii	:	VQSADALVSAIDGVTQDDVQSAAKKAG	-SSKL-SVGAVGNLAHV PYASDLA	-----			: 354
aMPP1_St	:	EHVLKADAI SANDIASVAQKLI-SSPL	-TMASYGDVLSLPTYDVSSRFH SK	-----			: 504
aMPP2_St	:	EHFLKADAVSAKDIASVQKLI-SSPL	-TMASYGDVLSLPSYDAVSSRF RSK	-----			: 504
aMPP_OS	:	-----					: -
aMPP2_At	:	DQFLKTVDQTLTKDIADFTSKVI-TKPL	-TMATFGDVLNVPSYDSVSKFR	-----			: 499
aMPP1_At	:	DQFLKSV DQTLTKDIADFTSKVI-SKPL	-TMGSFGDVLAVPSYDTISSKFR	-----			: 503
aMPP_Pf	:	KQLSDAIDSITKEDIQRVVHNFL-KTKP	-TVVVYGNINYS PHYDEICNILGHK	-----			: 461
aMPP_Nc	:	REMTREINELTVKDLRRVAKRVV-GGMA	-NNAGCGSGAPT VV LQ EATVQG	-----	LKTT		: 558
aMPP_Sc	:	NEMISKIEDLKPDDISRV AEMIF-TGNV	-NNAGNGKGRATVVMQGDRGSGFGEVENVLKAY	-----			: 463
aMPP_Sp	:	KEMIEKIDALTPSDL SRVARRVL-TGNV	-SNPGNGTGKPTVLIHGNVDEVGDFALCKKA	-----			: 490
aMPP_Be	:	LELVNNISAVTRDDLVRVAEALV-AKPP	-TMVAVGEDLT KLTDIKETLAAFNASG-EALQ	-----			: 461
aMPP_Hs	:	HELCTLRNWKPEDVKRVASKML-RGKP	-AVAALGDLTDLPTYEDIQTALSSKDGRLPRT	-----			: 523
aMPP_Rn	:	HELCTLRNWKPEDIKRVASKML-RGKP	-AVAALGDLTDLPTYEHIQAALSSRDGRLPRT	-----			: 519
CoreII_Sc	:	-----FDAVKDFKLG---KFN	-----YVAVGDVSNLPYLDEL	-----			: 368
Seq1_Rhs	:	EAWPLIRAVKAAEVQAAARKYLSPDRS	-VAGYLLPRESATSGDKSR	-----			: 512
CoreII_Ce	:	SELIAETIQIQESDVQKYTKA AFER---	LAI SAYCNYGRIPYADEL	-----			: 427
Seq1_Tm	:	EERVERIKNYSKEDYRRAYERFIAGNWS	--VFGICPESGKII EKHEMIV	-----			: 412
PP2_Stc	:	LTAVQRVLEVTAEEVQEVAKARLRPDNR	-AVLVYEPTASADETDASDENEEAAK	-----			: 450
CoreI_Sc	:	GEAFKKIDAITVKDKAWAGKRLWDQDI	-AIAGTQIEGLLDYMRIRSDMSMMRW	-----			: 457
PP_Aa	:	RFFDKNLSRVRVDVMRIFERYIKEDKYE	SEILMVPEDGNKAE	-----			: 433
CoreII_Eg	:	LEIVSAIKAVSADTVKSVVATMLGSPAT	--LVHHCDSPCAPTL DALQ	-----			: 474
Seq1_Ap	:	ISNMERADALSAVILFHEKPF TLEDLVN	QTLSSSEWSLEEFRLRPRGLALIV	-----			: 403
Seq1_Bs	:	LDMYHIIQDMAQVFLSLIDAMASSNK	---AI IHVSQKEAIRQ	-----			: 426

Se	*	680	
PPSeq1_Stp	: -----		: -
SePh_Bs	: -----		: -
SeSeq1_Sys	: -----		: -
PPSeq2_Sys	: -----		: -
PPPP2_Hp	: -----		: -
SePP1_Hp	: -----		: -
SeSeq1_Rc	: -----		: -
SeSeq1_Rsp	: -----		: -
PPSeq1_Rip	: -----		: -
PPPP_Ml	: -----		: -
SePP_Mt	: -----		: -
PPSeq1_Mf	: -----		: -
PPPP1_Stc	: -----		: -
bMPP_Bs	: -----		: -
bMbMPP_Nc	: -----		: -
bMbMPP_Sp	: -----		: -
bMbMPP_Le	: -----		: -
bMbMPP_Be	: -----		: -
bMbMPP_Sc	: -----		: -
bMbMPP2_St	: -----		: -
CoMbMPP1_St	: -----		: -
CoCoreI_Hs	: -----		: -
CoCoreI_Bt	: -----		: -
CoCoreI_Bpt	: -----		: -
bMCoreI_Mm	: -----		: -
bMbMPP_Hs	: -----		: -
bMbMPP_Rn	: -----		: -
bMbMPP_Ds	: -----		: -
bMbMPP_Ce	: -----		: -
CoMbMPP_Oc	: -----		: -
bMCoreI_Ce	: -----		: -
bMbMPP_Eg	: CTPLPRQSVVCMA-----		: 494
CoMbMPP_Lm	: QFPEDARACPL-----		: 494
CoCoreII_Nc	: -----		: -
CoCoreII_Sp	: -----		: -
CoCoreII_Bpt	: -----		: -
CoCoreII_Hs	: -----		: -
CoCoreII_Rn	: -----		: -
aMCoreII_Hii	: -----		: -
aMaMPP1_St	: -----		: -
aMaMPP2_St	: -----		: -
aMaMPP_OS	: -----		: -
aMaMPP2_At	: -----		: -
aMaMPP1_At	: -----		: -
aMaMPP_Pf	: -----		: -
aMaMPP_Nc	: ELGWDQIQDTIAQWKLGR-----		: 577
aMaMPP_Sc	: GLGNSSSKNDSPKKKGWF-----		: 482
aMaMPP_Sp	: GIGH-----		: 494
aMaMPP_Be	: PVGSAGSFGRVTM-----		: 474
aMaMPP_Hs	: YRLFR-----		: 528
CoaMPP_Rn	: YRLFR-----		: 524
SeCoreII_Sc	: -----		: -
CoSeq1_Rhs	: -----		: -
SeCoreII_Ce	: -----		: -
PPSeq1_Tm	: -----		: -
CoPP2_Stc	: -----		: -
PPCoreI_Sc	: -----		: -
CoPP_Aa	: -----		: -
SeCoreII_Eg	: -----		: -
SeSeq1_Ap	: -----		: -
Seq1_Bs	: -----		: -

Abbildung 38 (Seiten 135-146):

Alignment mit Vertretern der Unterfamilie MPP-artiger Proteine. Aminosäurepositionen, die in mindestens 50 % der aufgeführten Eiweiße konserviert sind, sind grau unterlegt. Die verwendeten Abkürzungen sind in Tabelle 6 erklärt.

Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1:	Struktur-Modell des dimeren Cytochrom c Reduktase-Komplex (Abbildung aus Yu et al., 1999).	9
Abb. 2:	Ausschnitt aus einem multiplen Sequenzvergleich im Bereich der Metallbindedomäne mit Vertretern der Pitrilysinfamilie (Abbildung aus Braun & Schmitz, 1995b).	12
Abb. 3:	Zwei Ausschnitte aus einem multiplen Sequenzvergleich mit MPP-Untereinheiten und Core-Proteinen aus verschiedenen Organismen (Abbildung aus Brumme et al., 1998).	14
Abb. 4:	Hypothetisches Modell zur Co-Evolution der Cytochrom c Reduktase (bc ₁ Komplex) und der mitochondrialen Prozessierungsprotease (MPP) (Abbildung aus Braun & Schmitz, 1995b).	16
Abb. 5:	Zweidimensionale Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen aus <i>Polytomella</i> spp. durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE.	40
Abb. 6:	Zweidimensionale Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen aus <i>P. bifurcatum</i> durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE.	41
Abb. 7:	Zweidimensionale Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen aus <i>E. arvense</i> durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE.	42
Abb. 8:	Zweidimensionale Auftrennung von mitochondrialen Proteinkomplexen aus <i>R. americana</i> durch BN-PAGE und Tricin-SDS-PAGE.	43
Abb. 9:	Immunologische Identifizierung der Core I-Proteine und Eisen-Schwefel-Proteine der Cytochrom c Reduktase-Komplexe von <i>S. tuberosum</i> (St), <i>P. bifurcatum</i> (Pb), <i>E. arvense</i> (Ea) und <i>Polytomella</i> spp. (Ps).	45
Abb. 10:	Alignments der N-terminalen Aminosäuresequenzen: (A) des Cytochrom c1, (B) des Eisen-Schwefel-Proteins und (C) des QCR8-Proteins verschiedener Organismen.	47
Abb. 11:	Tricine-SDS-PAGE der Cytochrom c Reduktase-Komplexe von <i>S. tuberosum</i> (St), <i>P. bifurcatum</i> (Pb), <i>E. arvense</i> (Ea) und <i>Polytomella</i> spp. (Ps).	50
Abb. 12:	Die Prozessierungsaktivität der isolierten Cytochrom c Reduktasen von <i>S. tuberosum</i> (St), <i>P. bifurcatum</i> (Pb), <i>E. arvense</i> (Ea) und <i>Polytomella</i> spp. (Ps).	51
Abb. 13:	Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Core II von <i>Neurospora crassa</i> (Accession-Nr.: E286572).	54
Abb. 14:	RFLP-Untersuchung der Kartierungspopulation zur Kartierung des <i>core II</i> .	55
Abb. 15:	RFLP-Kartierung des <i>core II</i> Polymorphismus mit Hilfe der Kartierungspopulation von Metzzenberg et al. (1984, 1995).	56
Abb. 16:	Ausschnitt aus einem multiplen Alignment von Core II- und α -MPP-Sequenzen.	57
Abb. 17:	Strategie zur Einführung der hochkonservierten hydrophoben Domäne des α -MPPs aus <i>Solanum tuberosum</i> in das Core II von <i>Neurospora crassa</i> .	57
Abb. 18:	Stammbäume für α MPP- und Core II-Proteine aus verschiedenen Organismen mit authentischem Core II von <i>Neurospora crassa</i> (A) bzw. verändertem Core II von <i>Neurospora crassa</i> (B).	58
Abb. 19:	Schematische Darstellung der Expressionskassetten von MpBARMTE1 und CpBARMTE1 einschließlich der angrenzenden Sequenzbereiche.	61
Abb. 20:	Southern Blot Analyse von BamHI restringierter genomischer DNA, isoliert aus den Stämmen M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, C1, C2, C3, C4, C5 und aus dem Wildtyp (WT).	62

- Abb. 21:** Southern Blot Analyse von *NdeI* und *NotI* restringierten Plasmiden MpBARMTE1 (MP) und CpBARMTE1 (CP) und *NdeI* und *NotI* restringierter genomischer DNA, isoliert aus den Stämme M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, C1, C2, C3, C4, C5 und aus dem Wildtyp (WT). 63
- Abb. 22:** Northern Blot Analyse mit Gesamt-RNA der Transformanten M1, M2, M3, M4, M5, M6, M7, M8, C1, C2, C3, C4, C5 und des Wildtyps. 64
- Abb. 23:** Über Affinitätschromatographie, Druckfiltration und anschließende Gelfiltrationschromatographie aufgereinigte Cytochrom c Reduktasen (A) aus dem Transformantenstamm M2; (B) aus dem Transformantenstamm M7; (C) aus dem Wildtyp. 66
- Abb. 24:** Gelelektrophoretische Analyse von Fraktionen der Ni-Affinitätssäule zur Aufreinigung des veränderten Core II. 69
- Abb. 25:** Gelelektrophoretische Analyse von Fraktionen der Ni-Affinitätssäule zur Aufreinigung des veränderten Core II gemeinsam mit β -MPP. 71
- Abb. 26:** Nukleotidsequenz und abgeleitete Aminosäuresequenz des Klons 12 mit einem vollständigen offenen Leserahmen für eine putative MPP-artige Protease (Seq1_Rsp). 74
- Abb. 27:** Aminosäuresequenzvergleich der putativen MPP-artigen Protease aus *Rhodobacter sphaeroides* mit MPP-artigen Proteinen. 75
- Abb. 28:** Aufreinigung der rekombinanten putativen Protease von *Rhodobacter sphaeroides* aus dem *E. coli* Expressionsstamm BL21. 77
- Abb. 29:** Zweidimensionale Auftrennung von ca. 300 μ g Gesamtprotein aus *Rhodobacter sphaeroides* durch BN-PAGE und Tricine-SDS-PAGE. A: Coomassie-gefärbte Spur mit Gesamtprotein von *Rhodobacter sphaeroides* nach BN-PAGE. B: Coomassie gefärbtes Gel nach Auftrennung in der zweiten Geldimension. C: Immunoblot einer zweiten Geldimension mit einem gegen die putative Protease gerichteten Antiserum. 79
- Abb. 30:** Phylogenetische Beziehungen zwischen eukaryotischen Mitgliedern der Pitrilysinfamilie. 84
- Abb. 31:** Stammbaum mit eubakteriellen Vertretern der Pitrilysinfamilie. 86
- Abb. 32:** Gesamtstammbaum, der die Beziehungen zwischen Vertretern der Pitrilysinfamilie der Eukaryoten, Eubakterien und einem putativen Protein aus *Aeropyrum pernix*, einem Archaeobakterium, aufzeigt. 89
- Abb. 33:** Ausschnitte aus Gesamtstammbäumen mit Vertretern der Pitrilysinfamilie aus Eukaryoten, Eubakterien und Archae. 89
- Abb. 34:** Phylogenetische Beziehungen zwischen MPP-artigen Proteinen aus Mitochondrien, Eubakterien und aus dem Archae, *Aeropyrum pernix*. 90
- Abb. 35:** Stammbaum aller MPP-Untereinheiten und Core-Proteine. Die β -MPP-Untereinheiten und Core I-Proteinen sowie die α -MPPs und die Core II-Proteine sind in verschiedenen Grauabstufungen unterlegt. 93
- Abb. 36:** Das von Braun und Schmitz aufgestellte Modell zur Evolution der Core-Proteine und MPP-Untereinheiten vor dem Hintergrund der Evolution der Eukaryoten. 107
- Abb. 37:** Degradierung der an die Cytochrom c Reduktase gebundenen Untereinheiten der mitochondrialen Prozessierungsprotease im Sinne eines alternativen Modells zur Evolution der MPP-Untereinheiten und Core-Proteine vor dem Hintergrund der Evolution der Eukaryoten. 112
- Abb. 38:** Alignment mit Vertretern der Unterfamilie MPP-artiger Proteine. 146

Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1:	verwendete Organismen	18
Tab. 2:	Antikörper, die für die Durchführung dieser Arbeit zur Verfügung standen.	19
Tab. 3:	Auflistung verwendeter Vektoren	19
Tab. 4:	Auflistung verwendeter Oligonukleotide	20
Tab. 5:	N-terminale Sequenzen von Untereinheiten der Cytochrom c Reduktasen von <i>P. bifurcatum</i> und <i>E. arvense</i>	46
Tab. 6:	Auflistung der in Stammbaumberechnungen einbezogenen Mitglieder der Pitrilysinfamilie	82

Abkürzungen

ACA	6-Amino-capronsäure
ATCC	„American Type Culture Collection“
ATP	Adenosintriphosphat
b	Basen
BLAST	„Basic Local Alignment Search Tool“
bp	Basenpaare
Bis-Tris	(bis[2-Hydroxyethyl]imino-tris[hydroxymethyl]methan
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	copy DNA (aus reverser Transkription von RNA)
C-Terminus	Carboxy-Terminus einer Aminosäuresequenz
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid
DDBJ	„DNA Data Bank of Japan“
DIG	Digoxigenin
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EBI	„European Bioinformatics Institute“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ExPASy	„Expert Protein Analysis System“
FeS-Protein	Eisen-Schwefel-Protein
g	Erdbeschleunigung
IDE	„Insulin-Degrading Enzyme“
IMP	Innere-Membran-Protease
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid
MIP	mitochondriale Intermediat-Peptidase
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MPP	mitochondriale Prozessierungsprotease
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NCBI	„National Center for Biotechnology Information“
NRD-Konvertase	N-Arginin (R)-dibasische Konvertase
N-Terminus	Amino-Terminus einer Aminosäuresequenz
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	„polymerase chain reaction“, Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PP	putative Protease
PVDF	Polyvinylidendifluorid
PQQ	Pyrroloquinolin Quinon
Q	Ubichinon
QH ₂	Ubichinol
RFLP	Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus
RIP	„repeat induced point mutation“, wiederholt induzierte Punktmutation
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDP	„Sporozoite Developmental Protein“
rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
Tris	Trishydroxymethylaminomethan

Verwendete Symbole für Aminosäuren

A	Alanin	V	Valin
R	Arginin	L	Leucin
N	Asparagin	K	Lysin
D	Asparaginsäure	M	Methionin
C	Cystein	F	Phenylalanin
Q	Glutamin	P	Prolin
E	Glutaminsäure	S	Serin
G	Glycin	T	Threonin
H	Histidin	W	Tryptophan
I	Isoleucin	Y	Tyrosin
		X	jede proteinogene Aminosäure

Einbuchstaben-Kode für Nukleinsäuren

nach IUPAC-IUB Kommission der biochemischen Nomenklatur (CBN)
(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83, 4)

A	Adenin	S	C oder g
C	Cytosin	W	A oder T
g	Guanin	H	alle Basen außer g
T	Thymin	B	alle Basen außer A
U	Uracil	D	alle Basen außer C
R	Purine (g oder A)	V	alle Basen außer T,U
Y	Pyrimidine (T, U oder C)	N	alle Basen
M	Basen mit Aminogruppen (A oder C)		
K	Basen mit Ketogruppen (T,U oder g)		

Glossar

(einige Worterklärungen für molekularbiologische Fachbegriffe im Sinne der Verwendung in der vorliegenden Dissertation)

Alignment	Ausrichtung von Aminosäuresequenzen gemäß ihren Identitäten
Amplifikat	über PCR vervielfältigte DNA
Annealing	Anlagern von Primern an komplementäre einzelsträngige DNA
Blot	Transfer von Molekülen (Proteinen, Nukleinsäuren) auf Filterträger
Eluat	Molekülgemisch, was in einem chromatographischen Reinigungsschritt von einer Säule gelöst wird
Exon Shuffling	Vorgang bei dem Exons nicht verwandter Gene neu kombinieren
Excision	Ausschneiden von DNA-Inserts aus Bakteriophagen
Flow-through	Anteil eines Molekülgemisches, der bei einer chromatographischen Aufreinigung nicht an die Säule bindet
His-Tag	N- oder C-terminal an Proteine angeheftetes Ende aus 6-10 Histidinresten
Homologie	Gleichartigkeit von Protein- oder Nukleinsäuresequenzen, die einen gemeinsamen entwicklungsgeschichtlichen Ursprung widerspiegelt
Insert	Klonierte DNA in einem Vektor
Peak	„Gipfel“ einer chromatographischen Molekülaufreinigung
Poolen	Vereinigung von Fraktionen eines Eluates
Precursor	Vorläuferprotein
Primer	Oligonukleotid mit einer freien 3'-OH-Gruppe, welches mit einzelsträngigen DNA-Matrizen hybridisiert und als Start für die Verlängerung von DNA-Ketten durch DNA-Polymerasen dient
Prozessierung	„Reifung“ eines Vorläuferproteins (Abtrennen der Leitsequenz)
Screening	Durchsuchen einer Genbank
Spacer	Abstandhalter
Spot	angefärbte Proteinbande in einer Gelmatrix oder auf einem Filterträger
Template	DNA-Matrize

Lebenslauf

Name:	Stefanie Marx, geb. Brumme
Geburtsdatum und Ort:	18. September 1970 in Sangerhausen
Familienstand:	verheiratet
Ein Kind:	Benjamin, geb. 6. Oktober 1998 in Hannover
Schulbildung:	
1977-1987	Allgemeinbildende Oberschule in Sangerhausen
1987-1989	Erweiterte Oberschule „Geschwister Scholl“ in Sangerhausen
Juni 1989	Abitur
Berufsausbildung:	
1989-1990	Ausbildung als Biologielaborantin in Quedlinburg
Studium:	
1990-1995	Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1994-1995	Diplomarbeit am Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung in Gatersleben zum Thema: „Gynoeceum-spezifische Genexpression in parthenogenetischen und sexuellen Weizenlinien: molekularbiologische und histologische Untersuchungen“
September 1995	Abschluß des Studiums als Diplom-Biochemikerin
1995-1996	Beginn eines Promotionsstudiums am Institut für Biochemie und Molekulare Physiologie der Universität Potsdam zum Thema: „Physiologie und Molekularbiologie des pflanzlichen Eisen- und Kupferstoffwechsels“
1996-2000	Promotionsstudium am Institut für Angewandte Genetik der Universität Hannover