

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Dr. von Haunerschen Kinderspital der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. D. Reinhardt

**Identifizierung und molekulare Charakterisierung  
mitochondrialer Signalpeptide  
der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von  
Roman Hannes Polanetz

aus München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

1. Berichterstatter: PD Dr. A. Holzinger  
2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. W. Neupert

Mitberichterstatter: Prof. Dr. W. Zimmermann  
PD Dr. G. Längst

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. W. Röschinger

Dekan: Prof. Dr. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 16. 02. 2006

**Inhaltsverzeichnis**

1	Einleitung.....	1
1.1	Der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel .....	1
1.1.1	Klinik und Epidemiologie .....	1
1.1.2	Diagnostik .....	2
1.1.3	Therapie.....	2
1.2	Grundlagen zur 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase.....	3
1.2.1	Vom Protein zu den Genen der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase.....	3
1.2.2	Biochemische Grundlagen .....	3
1.2.3	Molekulare Grundlagen .....	5
1.2.4	Mutationsspektrum.....	5
1.3	Mitochondriale Proteine und deren Import.....	6
1.4	Fluoreszierende Proteine als zelluläre Lokalisationsmarker .....	9
2	Zielsetzung .....	11
3	Material und Methoden .....	12
3.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren .....	12
3.1.1	Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	12
3.1.1.1	Generierung von Oligonukleotiden für Targetingkonstrukte .....	12
3.1.1.2	Generierung von Oligonukleotiden für Mutationskonstrukte.....	13
3.1.1.3	Amplifikation von cDNA zur Konstrukterstellung.....	13
3.1.1.4	PCR zur Identifizierung korrekt transformierter Klone .....	14
3.1.2	Sequenzierung von klonierter cDNA.....	14
3.1.3	Reinigung von DNA und Extraktion von Plasmiden aus Bakterien.....	15
3.1.4	Restriktionsverdau von DNA .....	16
3.1.4.1	Restriktionsverdau zur Vorbereitung der Ligation .....	16
3.1.4.2	Restriktionsverdau zur Identifizierung transformierter Klone .....	17
3.1.5	Horizontale Gelelektrophorese von Nukleinsäuren .....	17
3.1.6	Generierung eines rekombinanten Plasmids .....	18
3.1.7	Ligation des Inserts in den Vektor pEYFP-N1.....	19
3.1.8	Transformation der <i>E.coli</i> Stämme DH5 $\alpha$ und XL1-Blue.....	20
3.2	Arbeiten in der Zellkultur .....	21
3.2.1	Transiente Zelltransfektion .....	22
3.2.1.1	Lipofektion.....	22
3.2.1.2	Magnetofektion.....	23
3.2.2	Mitochondriale Gegenfärbung mit MitoTracker <sup>®</sup> Red und pECFP-mito .....	24
3.2.3	Fluoreszenzmikroskopie.....	25
3.3	Proteinanalytik .....	26

3.3.1	Polyacrylamidgelelektrophorese von Fusionsproteinen .....	26
3.3.2	Western Blot.....	27
3.4	Bioinformatische Methoden.....	28
3.4.1	Programme zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation .....	28
3.4.2	Interspezies-Alignments .....	28
4	Ergebnisse.....	29
4.1	Strategie .....	29
4.2	Bioinformatische Untersuchungen.....	31
4.2.1	Identifizierung möglicher Targetingmotive und Vorhersage ihrer Lokalisation am Aminoterminus.....	31
4.2.2	Vergleiche der Primärstruktur mit Orthologen anderer Spezies deuten auf ein aminoterminalen Signalpeptid hin.....	31
4.3	Kolokalisationsstudien zur Identifizierung des Signalpeptids .....	33
4.3.1	Natives YFP ist cytoplasmatisch lokalisiert .....	33
4.3.2	Beide Untereinheiten - MCC $\alpha$ und MCC $\beta$ - besitzen ein mitochondriales Targetingsignal .....	33
4.3.3	Aminoterminalen Signalpeptide von MCC $\alpha$ und MCC $\beta$ .....	34
4.3.3.1	MCC $\alpha$ besitzt ein Targetingsignal innerhalb der aminoterminalen 39 AS .	34
4.3.3.2	MCC $\beta$ besitzt ein Targetingsignal innerhalb der aminoterminalen 20 AS..	35
4.3.4	Ausschluss weiterer Targetingsignale in den Untereinheiten .....	36
4.3.4.1	Die $\alpha$ -Untereinheit besitzt kein zusätzliches Signalpeptid .....	36
4.3.4.2	Die $\beta$ -Untereinheit besitzt kein zusätzliches Signalpeptid .....	37
4.4	Proteinanalytik von Fusionskonstrukten .....	38
4.5	Strukturelle Erfordernisse der Signalpeptide .....	39
4.5.1	Mutationen im Signalpeptid der $\alpha$ -Untereinheit können zu fehlendem mitochondrialen Import führen .....	39
4.5.2	Mutationen von Argininresten in der $\beta$ -Untereinheit führen zum Importverlust.....	40
5	Diskussion .....	42
6	Zusammenfassung .....	49
7	Literaturverzeichnis.....	50
8	Anhang .....	56
9	Abkürzungsverzeichnis .....	59
10	Danksagung.....	60
11	Publikationen .....	61
12	Lebenslauf .....	62

**Abbildungsverzeichnis**

Abbildung 1.1 Der Leucin-Abbau.....	4
Abbildung 1.2 Potentielle Domänen der Untereinheiten MCC $\alpha$ und MCC $\beta$ . ....	6
Abbildung 1.3 Import von Präproteinen in das Mitochondrium.....	8
Abbildung 3.1 Multiple Klonierungsstelle des pEYFP-N1 Vektors.....	18
Abbildung 3.2 Vereinfachte Vektorkarte des N-terminalen Proteinfusionsvektors pEYFP-N1...	19
Abbildung 4.1 Fusionsproteine, die zur Bestimmung der mitochondrialen Signalpeptide von MCC $\alpha$ und MCC $\beta$ generiert wurden.....	30
Abbildung 4.2 Aminoterminal Abschnitte orthologer Proteine der $\alpha$ -Untereinheit verschiedener Spezies .....	32
Abbildung 4.3 Aminoterminal Abschnitte orthologer Proteine der $\beta$ -Untereinheit verschiedener Spezies .....	32
Abbildung 4.4 Mitochondriale Signalpeptide von MCC $\alpha$ und MCC $\beta$ . ....	33
Abbildung 4.5 Der kürzeste Abschnitt von MCC $\alpha$ , der für einen mitochondrialen Import ausreichend ist, sind die AS 1-39 (1-39 MCC $\alpha$ -YFP).....	34
Abbildung 4.6 Der kürzeste Abschnitt von MCC $\beta$ , der für einen mitochondrialen Import ausreichend ist, sind die AS 1-20 (1-20 MCC $\beta$ -YFP).....	36
Abbildung 4.7 MCC $\alpha$ besitzt keine zusätzlichen mitochondrialen Targetingsignale.....	37
Abbildung 4.8 MCC $\beta$ besitzt keine zusätzlichen mitochondrialen Targetingsignale. ....	37
Abbildung 4.9 Western Blot der beiden kürzesten mitochondrialen Konstrukte. ....	39
Abbildung 4.10 Kolokalisationsstudien zur Auswirkung von Mutationen im Signalpeptid von MCC $\alpha$ .....	40
Abbildung 4.11 Kolokalisationsstudien zur Auswirkung von Mutationen im Signalpeptid von MCC $\beta$ . ....	41
Abbildung 8.1 Vereinfachte Vektorkarte des pECFP-mito Vektors. ....	58

**Tabellenverzeichnis**

Tabelle 4.1 Bioinformatische Ergebnisse für MCC $\alpha$ .....	31
Tabelle 4.2 Bioinformatische Ergebnisse für MCC $\beta$ .....	31
Tabelle 4.3 Fusionskonstrukte beider Untereinheiten mit Lokalisation.....	34
Tabelle 4.4 Sukzessiv verkürzte Konstrukte der $\alpha$ -Untereinheit mit zellulärer Lokalisation.....	35
Tabelle 4.5 Sukzessiv verkürzte Konstrukte der $\beta$ -Untereinheit mit zellulärer Lokalisation. ....	35
Tabelle 4.6 Konstrukte zum Ausschluss weiterer Signalpeptide in der $\alpha$ -Untereinheit.....	37
Tabelle 4.7 Konstrukte zum Ausschluss weiterer Signalpeptide in der $\beta$ -Untereinheit .....	38
Tabelle 4.8 Konstrukte zur Untersuchung von Mutationen in der Signalsequenz von MCC $\alpha$ ....	40
Tabelle 4.9 Konstrukte zur Untersuchung von Mutationen in der Signalsequenz von MCC $\beta$ ....	41
Tabelle 8.1 Forward-Primer für die Erstellung von <i>MCCA</i> -Konstrukten. ....	56
Tabelle 8.2 Reverse-Primer für die Erstellung von <i>MCCA</i> -Konstrukten. ....	56
Tabelle 8.3 Forward-Primer für die Erstellung von <i>MCCB</i> -Konstrukten. ....	56
Tabelle 8.4 Reverse-Primer für die Erstellung von <i>MCCB</i> -Konstrukten. ....	57
Tabelle 8.5 Forward-Primer für die Erstellung von <i>MCCA</i> -Mutagenesekonstrukten. ....	57
Tabelle 8.6 Forward- und Reverse-Primer für die Erstellung von <i>MCCA</i> -Mutagenesekonstrukten.....	57
Tabelle 8.7 Oligonukleotide, die zur Sequenzierung verwendet wurden.....	58

## 1 Einleitung

### 1.1 Der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel

1982 wurde über einen vietnamesischen Jungen berichtet, der im fünften Lebensjahr nach Immigration in die Niederlande mit rezidivierendem Erbrechen auffällig wurde. Im Rahmen der diagnostischen Abklärung konnten keine Anzeichen einer Infektion festgestellt werden. Der Zustand des Patienten besserte sich unter Flüssigkeits- und Kohlenhydratzufuhr. Als allerdings die Ernährung um Proteine ergänzt wurde, setzte das Erbrechen erneut ein. Nach diesem Ereignis konnte sein Zustand durch eine Proteinrestriktion stabilisiert werden.

Eine zu diesem Zeitpunkt durchgeführte gaschromatographisch/massenspektrometrische Untersuchung des Urins auf organische Säuren mit dem Nachweis von 3-Hydroxyisovaleriansäure und 3-Methylcrotonylglycin führte zu der Verdachtsdiagnose eines 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCC)-Mangels (OMIM: 210200), der enzymatisch bestätigt werden konnte. Die Substitution mit Biotin, einem essentiellen Kofaktor der MCC, führte zu keiner biochemischen Veränderung der Laborparameter. Damit wurde erstmals ein klinisch auffälliger Patient mit isoliertem MCC-Mangel beschrieben [7]. Hierbei handelt es sich um einen autosomal rezessiv vererbten Defekt im Abbau der Aminosäure (AS) Leucin.

#### 1.1.1 Klinik und Epidemiologie

Innerhalb der letzten 20 Jahre wurden 40 Patienten mit MCC-Mangel beschrieben. Das klinische Bild ist dabei sehr heterogen und reicht von asymptomatisch [7, 20, 31, 33, 38, 50, 59, 70, 73] bis zu unterschiedlicher Entwicklungsretardierung [2, 6, 16, 45, 50, 52, 69, 78] und in vier Fällen sogar zum Tod [2, 6, 16, 33, 38]. Die Erstmanifestation lag zwischen dem ersten Lebenstag und dem Alter von 4,7 Jahren. Katabole Stoffwechsellagen wie Fastenperioden, fieberhafte Infekte, oder Gastroenteritiden führten bei den Betroffenen zu Hypoglykämie [3, 6, 21, 38, 44, 69, 70], metabolischer Azidose [3, 6, 7, 21, 38, 44] und gelegentlich zu mäßiger Hyperammonämie [44, 70]. Überwiegend wurden allerdings neurologische Symptome wie muskuläre Hypotonie und Krampfanfälle beobachtet [2, 3, 6, 7, 16, 21, 38, 45, 52, 59, 63, 69-71, 73, 76].

Bis 1999 erfasste das Neugeborenen-Screening (NGS) in Deutschland die Erkrankungen Galaktosämie, Phenylketonurie und Hypothyreose. Durch die Erweiterung des NGS können zusätzlich bis zu 30 angeborene Stoffwechselerkrankungen diagnostiziert werden. Dazu zählen Störungen der Fettsäureoxidation, Aminosäurestoffwechselstörungen und organische Azidämien. Zu letzterer Gruppe wird der MCC-Mangel gezählt. Die meisten der organischen Azidämien gehen mit einem schweren Krankheitsbild einher und haben eine hohe Penetranz.

Im Gegensatz dazu konnte der MCC-Mangel zwar häufig diagnostiziert werden, allerdings wurden keine klinisch auffälligen Patienten beobachtet. Mit einer Inzidenz von 1:40.000 Neugeborenen galt der MCC-Mangel bis vor kurzem als die häufigste organische Azidämie des Menschen. Im Laufe der letzten Jahre wurde diese Zahl der im Screening neu aufgefallenen Patienten aber auf 1:64.000-1:250.000 korrigiert [10, 39, 67, 77, 79]. Die im Rahmen des erweiterten NGS in Bayern untersuchten Neugeborenen waren mit einer Frequenz von 1:84700 betroffen.

### 1.1.2 Diagnostik

Zur Behandlung vieler Stoffwechselerkrankungen ist die frühest mögliche Diagnosestellung essentiell, da sich lebenswichtige Entscheidungen für die weitere Therapie, speziell für die richtige Diät, ableiten. Im Rahmen des erweiterten Neugeborenen-Screenings wird nach verschiedenen Stoffwechselstörungen, darunter neun organischen Azidämien, gesucht. Zur Diagnosestellung des MCC-Mangels werden 48 Stunden nach Geburt im Vollblut Acylcarnitine mittels Tandem-Massenspektrometrie (MS/MS) bestimmt. 3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin (3-HIVA-C) wird als sensitiver, diagnostischer Markermetabolit verwendet [64, 72]. Die Entwicklung der MS/MS erlaubt eine schnelle, zuverlässige und kostengünstige Diagnostik. Für die Konfirmation werden die organischen Säuren 3-Hydroxyisovaleriansäure und 3-Methylcrotonylglycin im Urin bestimmt.

Biotin ist ein essentieller Kofaktor der MCC. Biotinmangel, oder Störungen im Biotin-Metabolismus (Biotinidase-Mangel, Holocarboxylase-Synthetase-Defekt) führen zu einem multiplen Carboxylase-Mangel mit Funktionsausfall der MCC und drei weiteren biotinabhängigen Carboxylasen (siehe 1.2.2). Zum Ausschluss eines solchen Defekts wird zunächst nach typischen pathologischen Metaboliten gesucht gefolgt von enzymatischer Diagnostik. Zur Konfirmationsdiagnostik werden in unserem Stoffwechselzentrum Mutationsanalysen und Enzymaktivitätsmessungen der MCC in Hautfibroblasten von Patienten durchgeführt.

### 1.1.3 Therapie

Wichtigstes Therapieziel ist die Vermeidung einer metabolischen Krise. Diese kann durch einen erhöhten Abbau von körpereigenem Eiweiß und damit auch der AS Leucin hervorgerufen werden. Insbesondere katabole Stoffwechsellagen, wie sie im Rahmen von Infekten, Fastenperioden oder Operationen entstehen, können eine solche Krise triggern. Die Vermeidung von Eiweißexzessen, zum Beispiel durch überhöhte Aufnahme von Milch oder Fleisch ist ein weiteres Ziel. Eine angepasste Diät mit einer Proteinrestriktion von 1,5 g/kg x d sollte eingehalten werden. Gleichzeitig muss eine kontinuierliche kalorische Zufuhr sichergestellt



werden. Die renale Eliminierung von akkumulierendem 3-HIVA-C führt regelmäßig zu einem sekundären Carnitin-Mangel; daher wird dessen Substitution empfohlen. Bisher wurden zwei Individuen mit isoliertem MCC-Mangel beschrieben, bei denen die Gabe des Kofaktors Biotin in pharmakologischer Dosierung zu einem Abfall der akkumulierenden Metabolite und in einem Fall auch zur Besserung der Symptomatik führte [5].

Trotz der Gefahr eines potentiell schwerwiegenden Verlaufs bei metabolischer Dekompensation erscheint die Prognose insgesamt sehr gut. Allerdings bleibt auch weiterhin die Beratung von Patienten schwierig, da keine Daten über die Langzeitprognose vorliegen.

## 1.2 Grundlagen zur 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase

### 1.2.1 Vom Protein zu den Genen der 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase

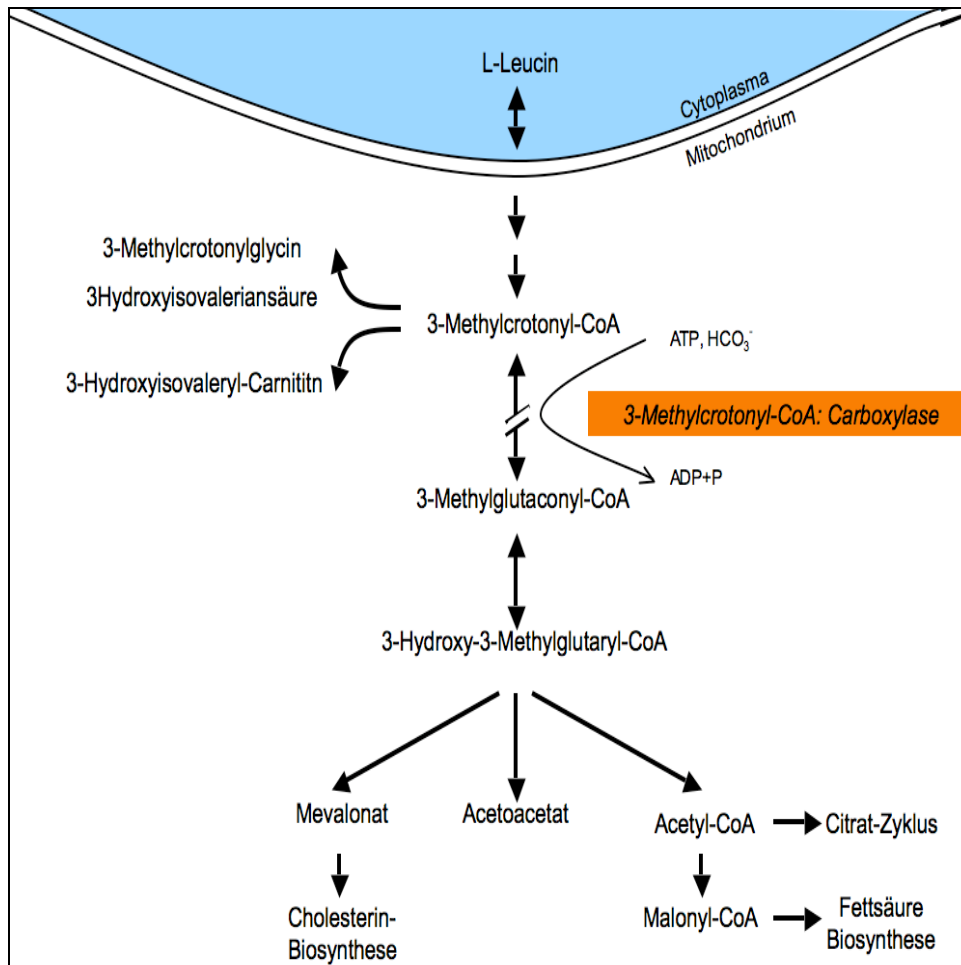
Nachdem MCC 1959 erstmals als Enzym, das an der Degradation der Aminosäure Leucin beteiligt ist, in der Hühnerleber identifiziert werden konnte [14], beschrieben bereits zwei Jahre später Lynen et al. die MCC als zu einer Gruppe von Enzymen gehörig, welche Biotin als Kofaktor benötigen [47]. Die subzelluläre Lokalisation wurde erstmals 1979 beschrieben, als über die bovine Niere als gute Quelle zur Gewinnung des mitochondrialen Enzyms MCC berichtet wurde. Des Weiteren wurde MCC erstmals als ein Enzym beschrieben, das aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht [41]. 1987 wurde die cDNA für die biotinbindende Untereinheit in der Tomate (*Lycopersicon esculentum*) kloniert [29, 75]. Später wurden die Gene in der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*) kloniert, nachdem deren Genom im Jahr 2000 vollständig aufgeklärt werden konnte [48]. Schließlich gelang es im Jahr 2001 die humanen Gene beider Untereinheiten zu klonieren [4, 18, 30]. Diese Entwicklung war die Grundlage für funktionelle Untersuchungen der humanen MCC.

### 1.2.2 Biochemische Grundlagen

MCC ist am Abbau der essentiellen verzweigtkettigen Aminosäure Leucin beteiligt. Leucin wird zunächst reversibel zu 2-Oxoisocaproinsäure desaminiert, um dann in zwei irreversiblen Schritten decarboxyliert und zweimal dehydriert zu werden. MCC katalysiert den folgenden 4. Schritt von 3-Methylcrotonyl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA. Bei dieser energieabhängigen Reaktion wird unter Verbrauch von ATP und Bikarbonat 3-Methylcrotonyl-CoA carboxyliert. Das Produkt 3-Methylglutaconyl-CoA wird entweder zum Ketonkörper Acetoacetat, zu Acetyl-CoA oder zu Mevalonat weiter abgebaut. Diese Metabolite fließen dann in den Citratzyklus, die Cholesterin- oder Fettsäuresynthese ein (Abbildung 1.1). Nur der erste Schritt der Leucin-

Degradierung findet im Cytosol der eukaryotischen Zelle statt. Der weitere enzymatische Abbau ist mitochondrial lokalisiert.

Kommt es zu einem Funktionsverlust des Enzyms MCC, so werden charakteristische Stoffwechselmetabolite akkumuliert. Es entstehen dabei 3-Methylcrotonylglycin, 3-Hydroxyisovaleriansäure und 3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin aus den sich intramitochondrial anreichernden Acyl-CoA Verbindungen.



**Abbildung 1.1 Der Leucin-Abbau.** Im 4. Schritt des Leucin-Abbaus wird 3-Methylcrotonyl-CoA zu 3-Methylglutaconyl-CoA umgewandelt. Diese mitochondriale Reaktion wird unter Bicarbonat- und ATP-Verbrauch durch das Enzym 3-Methylcrotonyl-CoA Carboxylase katalysiert. Im weiteren Abbau entstehen Produkte für die Cholesterin- und Fettsäure-Biosynthese, sowie für den Citrat-Zyklus. Bei Funktionsausfall der MCC kommt es zur Ansammlung von pathologischen Stoffwechselmetaboliten.

Die MCC gehört zu einer Gruppe von vier biotinabhängigen Carboxylasen. Nur eine, die Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC) ist cytosolisch lokalisiert und besteht aus einem Polymer einer Untereinheit. Demgegenüber sind Pyruvat-Carboxylase (PC) und Propionyl-CoA-Carboxylase (PCC) wie MCC mitochondrial lokalisiert. PCC ist dabei der MCC strukturell am ähnlichsten;

beide setzen sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die ein Heteropolymer bilden. Die mitochondriale PC besteht aus einem Homopolymer.

Die Funktionstüchtigkeit aller vier Carboxylasen ist von der Bereitstellung des Kofaktors Biotin abhängig. Biotin dient als Überträger der Carboxylgruppe auf das Substrat. Am Stoffwechsel der Biotinylierung und Abspaltung des Biotins bei der Degradation der Carboxylasen sind zwei Enzyme beteiligt: Holocarboxylase-Synthetase ist für die kovalente Bindung des Biotins an eine auf allen vier Carboxylasen konservierte Region verantwortlich.

Das Enzym Biotinidase katalysiert die Abspaltung von Protein-gebundenem Biotin und spielt eine zentrale Rolle bei der Wiederverwertung von Biotin durch Spaltung von Biocytin (Lysin-gebundenes Biotin). Besteht bei einer der beiden Enzyme ein Funktionsverlust, so kommt es zur Anhäufung von pathologischen Stoffwechselmetaboliten durch den Ausfall aller vier biotinabhängigen Carboxylasen und zum klinischen Bild des multiplen Carboxylase-Mangels.

### 1.2.3 Molekulare Grundlagen

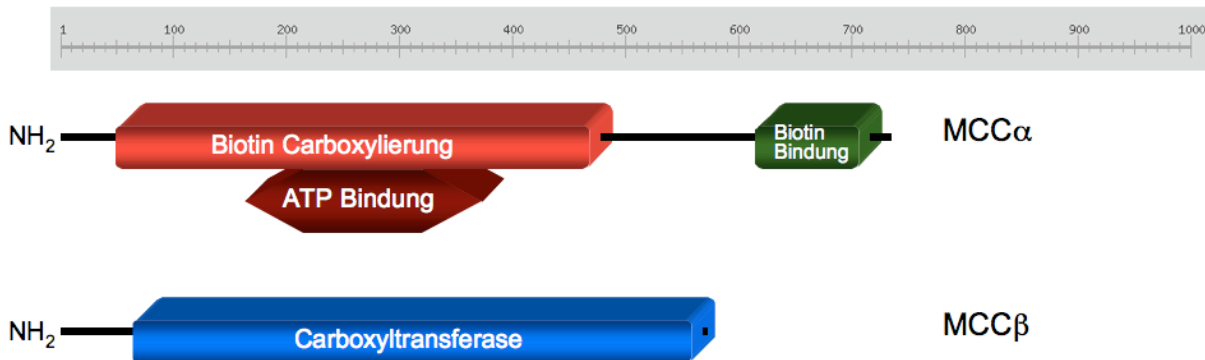
Die MCC besteht aus einer größeren  $\alpha$ -Untereinheit,  $MCC\alpha$ , mit einer Länge von 725 Aminosäuren und einer kleineren  $\beta$ -Untereinheit,  $MCC\beta$  mit 563 Aminosäuren. Das Gen *MCCA* codiert für die  $\alpha$ -Untereinheit und ist auf Chromosom 3q26-q28 lokalisiert. *MCCB* codiert für die  $\beta$ -Untereinheit und ist auf Chromosom 5q13 lokalisiert.

Bisher wurde keine Domäne auf beiden Untereinheiten experimentell aufgeklärt. Als funktionelle Bereiche kommen für  $MCC\alpha$  eine ATP Bindungsstelle (AS 167-364) und das katalytische Zentrum für die Carboxylierung von Biotin (AS 48-494) in Frage. Der biotinbindende Bereich wird zwischen AS 629 und 714 vermutet. Biotin soll dabei kovalent an die Aminosäure Lysin an Position 681 binden. Für die  $\beta$ -Untereinheit wird eine Carboxyltransferase-Domäne zwischen den Aminosäuren 69-561 angenommen (<http://www.expasy.org/prosite>) (Abbildung 1.2). Diese ist für die Übertragung der Carboxyl-Gruppe von Biotin auf 3-Methylcrotonyl-CoA verantwortlich. Mitochondriale Signalpeptide in den Untereinheiten wurden bisher nicht nachgewiesen, allerdings am Aminoterminus vermutet [4, 30].

### 1.2.4 Mutationsspektrum

Bisher wurden insgesamt 47 Mutationen in der Literatur beschrieben. Diese stellen sich ohne punktuelle Häufung, weder auf *MCCA* noch auf *MCCB* dar [13]. Ferner lässt sich auch keine Aussage über Genotyp-Phänotyp-Korrelationen machen. Zum Beispiel wurde für eine Mutation

sowohl ein letaler [2], als auch ein klinisch unauffälliger Verlauf [20] in unterschiedlichen Familien beschrieben.



**Abbildung 1.2 Potentielle Domänen der Untereinheiten MCC $\alpha$  und MCC $\beta$ .** Die beiden Untereinheiten der MCC sind an einer Skala, die die Anzahl der Aminosäuren beschreibt, dargestellt. Mitochondriale Signalpeptide werden am Aminoterminus (NH<sub>2</sub>) vermutet, wurden allerdings noch nicht nachgewiesen.

### 1.3 Mitochondriale Proteine und deren Import

Zahlreiche Substrate, beispielsweise aus der Glykogenolyse, dem Abbau von Fettsäuren, oder, wie im Fall der Aminosäure Leucin aus der Degradation von Aminosäuren, gelangen in das Mitochondrium, um dort in weiteren Schritten enzymatisch zur Energiegewinnung abgebaut zu werden. Um diese Stoffwechselleistung zu bewerkstelligen, ist eine Vielzahl von Proteinen bzw. Enzymen notwendig, die in das Mitochondrium gelangen müssen.

Das Mitochondrium, welches nach der Endosymbiontentheorie aus der Fusion von Prokaryonten mit einer eukaryotischen Zelle entstanden ist, besitzt ein eigenes Genom, das für einen geringen Teil mitochondrialer Proteine kodiert. Die meisten der mitochondrial lokalisierten Proteine werden im Zellkern kodiert und von freien Ribosomen synthetisiert. Diese Proteine müssen wie im Fall der MCC nach der Translation in das Mitochondrium gelangen. Das Mitochondrium besitzt eine äußere und eine innere Membran, die Proteine je nach ihrem Bestimmungsort überwinden müssen. Nukleär kodierte Proteine können in der äußeren oder inneren Membran lokalisiert sein, im Intermembranraum oder in der mitochondrialen Matrix. Zu diesem Zweck besitzen mitochondriale Enzyme Targetingsequenzen, also Signalpeptide, welche sie zu ihrem Bestimmungsort, dem Mitochondrium, dirigieren [8]. Diese Signalsequenzen sind auch für die Verteilung in die mitochondrialen Kompartimente verantwortlich.

Die Targetingsignale können im Inneren des Proteins, am Carboxyl-Ende (carboxyterminal, C-terminal) oder am Amino-Ende (aminoterminal, N-terminal) liegen. Die Mehrheit

mitochondrialer Proteine ist in der mitochondrialen Matrix lokalisiert und trägt ihre Signalsequenz N-terminal. Diese Präsequenz ist meist zwischen 20 und 80 Aminosäuren lang, obwohl in einem Fall 12 Aminosäuren als ausreichend beschrieben wurden, um ein Protein in das Mitochondrium zu importieren [23]. Die Targetingsequenz besteht zu einem großen Teil aus hydrophoben Aminosäuren (z.B.: Alanin, Leucin) und positiv geladenen Aminosäuren, hauptsächlich Arginin. Negativ geladene Aminosäuren hingegen finden sich selten. Typischerweise bildet die Präsequenz eine  $\alpha$ -Helix, bei der eine Windung 3,6 Aminosäuren beinhaltet. Durch die Wiederholung positiv geladener Aminosäuren einerseits und hydrophober Aminosäuren andererseits in eben diesem Abstand, kommt es zur Ausbildung einer amphipathischen Struktur [9]. Diese Struktur, bei der sich die positiv geladenen und hydrophoben Aminosäuren auf je einer Seite der Helix befinden, ist ein wesentlicher Bestandteil zur Erkennung des Signals [54]. Im Gegensatz zu Targetingsignalen für andere zelluläre Kompartimente, gibt es bei mitochondrialen Proteinen kein einheitliches Aminosäuremotiv, das als Erkennungssignal dient.

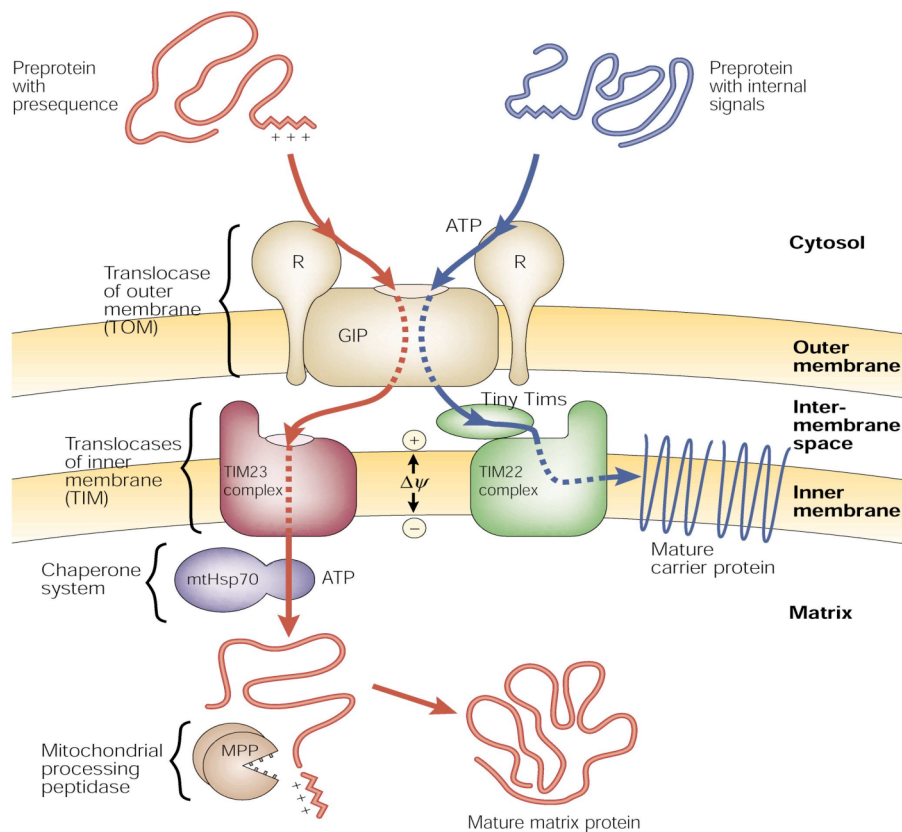
Proteine, die in den Membranen oder im Intermembranraum lokalisiert sind, tragen ihr Signal teilweise auch innerhalb des Proteins und besitzen zumeist zusätzlich einen hydrophoben Abschnitt. Bei Proteinen, die in die Matrix importiert werden, wird die Präsequenz regelmäßig nach dem Import abgespalten. Dies ist eine Voraussetzung, damit das Protein gefaltet und in seinen aktiven Zustand überführt werden kann. Bei Proteinen, die in den anderen mitochondrialen Subkompartimenten lokalisiert sind, wird das Signalpeptid nicht immer entfernt.

Nach der Synthese an freien Ribosomen werden mitochondriale Präproteine, also Proteine die zusätzlich noch ein Signalpeptid besitzen, in ungefaltetem Zustand zum Mitochondrium geleitet. Dabei sind Hilfsmoleküle beteiligt, die eine Degradation oder spontane Faltung im Cytosol verhindern und zu einer Hinführung an das Mitochondrium beitragen. Diese Chaperone, zu denen das cytosolische Hsp70 (Heat shock protein 70) und MSF (Mitochondrial import Stimulating Factor) gehören, tragen zur Stabilität des Präproteins und so zu einer erhöhten ‚Import-Kompetenz‘ bei [46]. Alle Signale werden von dem Komplex der Translokasen an der äußeren Membran (Translocase of the Outer Membrane, TOM) erkannt und über diese geleitet. Dabei sind im TOM Komplex verschiedene Komponenten vorhanden, die N-terminale, innere, oder C-terminale Signale erkennen können und das Präprotein durch die Membran führen [54]. Es wird postuliert, dass negativ geladene Aminosäurereste im TOM Komplex mit den positiv geladenen Aminosäuren in der Targetingsequenz interagieren [37].

Die innere Membran hält einen elektrochemischen Gradienten aufrecht, um Energiegewinnungsprozesse über die Membran leisten zu können. Dieser Gradient soll einerseits als treibende Kraft für den Import in die mitochondriale Matrix eine Rolle spielen und andererseits bedeutend für das Öffnungs- und Schließvermögen der Kanäle sein [54]. An der

inneren Membran gibt es unterschiedliche Translokasen (Translocase of the Inner Membrane, TIM), die je nach Bestimmungsort, in einer Energie-abhängigen Reaktion das Präprotein in die Matrix importieren, beziehungsweise an die innere Membran leiten.

Hat das Präprotein die Matrix erreicht, wird es dort von mitochondrialen Chaperonen, wie dem mt-Hsp70 (mitochondrial Heat shock protein 70) übernommen und die Präsequenz der meisten Proteine von der mitochondrialen Prozessierungspeptidase (Mitochondrial Processing Peptidase, MPP) abgespalten [51, 58] (Abbildung 1.3). Bei manchen Proteinen ist zusätzlich eine weitere Peptidase an der Abspaltung beteiligt (Mitochondrial Intermediate Peptidase, MIP) [35]. Interessanterweise gibt es trotz der Vielfalt mitochondrialer Signale nur eine MPP.



**Abbildung 1.3 Import von Präproteinen in das Mitochondrium.** Die Abbildung zeigt exemplarisch den Translokationsprozess eines Präproteins, das in die mitochondriale Matrix geleitet wird (rot) und eines, das in die innere Membran geführt werden soll (blau). Die Proteine gelangen, nach Erkennung der Targetingsequenz über den TOM Komplex (Translocase of the outer membrane) in den Intermembranraum, um von dort über spezifische TIM Komplexe (Translocase of the inner membrane) in die Matrix, bzw. die innere Membran transportiert zu werden. Nach Überwindung des elektrochemischen Gradienten ( $\Delta\psi$ ), wird das in der Matrix lokalisierte Protein von Chaperonen, wie z.B. mtHsp 70

(mitochondrial heat shock protein 70) stabilisiert und die Präsequenz durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten.

Pfanner, N., and Geissler, A. (2001) Nat Rev Mol Cell Biol 2, 339-49

Durch statistische Auswertung konnten mehrere Abfolgen von vier bis fünf Aminosäuren identifiziert werden, die von der MPP häufig gespalten werden. Besonders wichtig scheint dabei die Lokalisation der AS Arginin zwei bis drei Positionen vor der Spaltstelle (Cleavage site) zu sein. Oftmals befindet sich ein Serinrest an erster Stelle nach der Spaltstelle [19, 28, 66]. Es konnte gezeigt werden, dass die Abspaltung nicht nur von der Aminosäureabfolge vor der Spaltstelle abhängig ist, sondern auch Veränderungen am Aminoterminus des reifen Proteins die Abspaltung beeinflussen können [1].

Die Abspaltung des Signalpeptids ist für die Funktionstüchtigkeit reifer Proteine von entscheidender Bedeutung.

#### **1.4 Fluoreszierende Proteine als zelluläre Lokalisationsmarker**

Das Problem der subzellulären Lokalisationsbestimmung kann durch den Einsatz von Immunfluoreszenztechniken oder rekombinanten Reportergenen gelöst werden, die sich durch einfache biochemische oder histochemische Methoden nachweisen lassen. Reporter gene, wie Galactosidase,  $\beta$ -Glucuronidase, oder Luziferase benötigen exogene Substrate, Co-Faktoren oder Antikörper, um nachgewiesen werden zu können [27, 32, 49]. Eine Alternative zu diesen Reporter genen ist das grün fluoreszierende Protein GFP. 1962 berichtete Shimomura erstmals über ein Protein, das durch Anregung mit Licht grün fluoresziert (green fluorescent protein, GFP). Dieses Photoprotein war bei der biolumineszenten Tiefseequalle *Aequorea victoria* gefunden worden. 30 Jahre später wurde das Gen für GFP entschlüsselt. Das 27 kDa große GFP besteht aus 238 Aminosäuren und benötigt keine Substrate oder Kofaktoren. Dabei ist das eigentliche Chromophor ein Peptidtriplett der Aminosäuren Serin, Tyrosin und Glycin [11, 25, 61]. Durch spontane Ringbildung und Oxidation kommt es dabei zur Fluoreszenz. Mutationen in der Umgebung dieses Tripeptids führten zur Entwicklung von GFP-Varianten mit signifikanten Steigerungen der Translationshäufigkeit und Fluoreszenzintensität des Proteins [12, 15, 24]. Die Exzitations- und Emissionsmaxima gegenüber dem Wildtyp-GFP konnten durch Mutationen ebenfalls verändert werden, wodurch Proteine wie das gelbgrün fluoreszierende Protein YFP (yellow fluorescent protein) entstanden [57].

Die Anwendungsmöglichkeiten der fluoreszierenden Proteine als Reporterprotein sind vielseitig, da die Fähigkeit zur Fluoreszenz nach N- oder C-terminaler Fusion mit anderen Proteinen nicht beeinflusst wird. Es kann für *in vivo*-Studien mit verschiedenen Fragestellungen eingesetzt werden: Grad einer Genexpression, Darstellung von Protein-Transportvorgängen und Protein-Protein-Interaktionen sowie Lokalisation einzelner Proteine in lebenden Zellen. Dies

ist möglich, da die Funktion des fusionierten Fremdproteins auch in heterologen Systemen erhalten bleibt [11, 26, 34]. Nach Expression der Fusionsproteine können die Zellen im Mikroskop mit speziellen Fluoreszenzfiltern untersucht werden. Dabei kann durch das Fluoreszenzmuster auf eine subzelluläre Lokalisation geschlossen werden. Werden die Zellen zusätzlich mit einem zweiten fluoreszierenden Protein mit anderen Anregungs- und Emissionseigenschaften markiert, dessen subzelluläre Lokalisation bekannt ist, kann bei deckungsgleichem Fluoreszenzmuster in derselben Zelle die Lokalisation des Fusionsproteins bewiesen werden.



## 2 Zielsetzung

Der Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase-Mangel stellt eine der häufigsten organischen Azidämien des Menschen dar. Die Auswirkungen von Mutationen auf die Untereinheiten  $MCC\alpha$  und  $MCC\beta$  und damit auf die Funktionalität der MCC sind noch weitgehend unverstanden. Zur molekularen Charakterisierung der MCC ist es notwendig, die reifen Proteine beider Untereinheiten in einem künstlichen Expressionssystem zu generieren. Dies setzt die Kenntnis der Lokalisation der Proteinabschnitte, die für den mitochondrialen Import verantwortlich sind, voraus, da diese Abschnitte bei der Entstehung des reifen, funktionsfähigen Enzyms abgespalten werden.

Im Rahmen dieser Dissertation sollten die mitochondrialen Signalpeptide der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit identifiziert und charakterisiert, und somit das reife Protein definiert werden.

Im Einzelnen wurden folgende Fragestellungen bearbeitet:

- Es sollte geklärt werden, ob sowohl  $MCC\alpha$  als auch  $MCC\beta$  über ein eigenständiges Signal verfügen, das sie an das Mitochondrium leitet.
- Die Lokalisation des mitochondrialen Signals auf beiden Untereinheiten sollte identifiziert werden.
- Es sollte sowohl für  $MCC\alpha$  als auch für  $MCC\beta$  die kürzeste Proteinsequenz, die für den mitochondrialen Import ausreichend ist, definiert werden.
- Für beide Untereinheiten sollte gezeigt werden, dass es zu einer Abspaltung der Signalsequenz kommt.
- Ferner sollten die strukturellen Erfordernisse der Signalpeptide für einen funktionierenden mitochondrialen Import untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

##### 3.1.1 Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Taq-Polymerase 5 U/ $\mu$ l + 10x Puffer	Roche, Mannheim
Expand-High-Fidelity-Polymerase 3,5 U/ $\mu$ l + 10x Puffer	Roche, Mannheim
dNTP 20 mM	Roche, Mannheim
Primer	Metabion, München

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion lassen sich ausgewählte DNA-Sequenzen definierter Länge innerhalb kurzer Zeit effizient vervielfältigen. Die Doppelstrang-DNA, welche als Vorlage (Template) dient, wird bei einer Temperatur von 94° C getrennt (Denaturierung), sodass DNA-Einzelstränge als Matrize für die Amplifikation zur Verfügung stehen. Um eine spezifische Bindung mit DNA-Oligonukleotiden (Primer) zu erreichen, wird die Temperatur reduziert, sodass sich die Primer dem komplementären DNA-Abschnitt anlagern können (Annealing). Die Primer definieren dabei durch ihre Bindung an den codierenden und gegenläufigen DNA-Einzelstrang (Forward-, Reverse-Primer) das zu amplifizierende Fragment. Nach Erhitzen wird es durch die freien 3'-Enden der Primer der Polymerase möglich, einen komplementären Doppelstrang zu synthetisieren (Extension). Dabei variiert die Extensionszeit entsprechend dem verwendeten Enzym und der Länge des Produkts. Insgesamt werden 20-30 Amplifikationszyklen (Denaturierung, Annealing, Extension) durchgeführt. Für einfache Test-PCRs (Screening von Bakterienklonen) und Amplifikation von kurzen Fragmenten wurde die Taq-Polymerase verwendet. Auf Grund der Leseungenaugigkeit der Taq-Polymerase wurde für längere Abschnitte die Expand-High-Fidelity-Polymerase gewählt. Diese besitzt eine Proofreading-Funktion, die die Fehlerquote von falsch eingebauten Desoxynukleotiden um den Faktor zehn reduziert. Die Expand-High-Fidelity-Polymerase kam auch für die Amplifikation von Mutationskonstrukten zur Anwendung.

##### 3.1.1.1 Generierung von Oligonukleotiden für Targetingkonstrukte

Als Primer wurden ca. 20 Nukleotide komplementär zum 3'-Strang bzw. zum 5'-Strang der verwendeten cDNA generiert. Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen den Primern und innerhalb der Primer keine Komplementarität besteht, um so eine Dimerisierung zu verhindern. Des Weiteren wurde ein Guanin/Cytosin-Gehalt von 40-60% angestrebt. Um eine Basenfehlpaarung zu vermeiden, wurde ein Thyminrest am 3'-Ende vermieden. Für alle Amplifikationen musste die unter 3.1.1.3 aufgeführte Annealing Temperatur nicht verändert werden. Zusätzlich wurden im Rahmen des Primerdesigns Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen eingeführt. Die Forward-Primer wurden mit einer Nukleotidsequenz für das Enzym *EcoR* I, die Reverse-Primer mit einer Schnittstelle für *BamH* I versehen. Wenn nicht bereits in der cDNA enthalten,

wurde der Forward-Primer um ein ATG als Initiator der Translation ergänzt. Das Leseraster für die Translation wurde dabei beachtet. Die Liste der Primer ist im Anhang einzusehen.

### 3.1.1.2 Generierung von Oligonukleotiden für Mutationskonstrukte

Zu amplifizierende cDNA-Fragmente wurden mittels der ‚Site directed mutagenesis‘ verändert. Hierbei wurden durch Austausch von Nukleotiden Basentriplets derart verändert, dass diese für andere Aminosäuren kodieren. In dieser Arbeit wurden kodierende Triplets in der Targetingsequenz derart ausgetauscht, dass sie anstelle von Arginin für Glutamin kodieren. Durch die entstehenden nicht-komplementären Abschnitte zwischen Primer und Template können sich bei der Anlagerung so genannte Loops bilden. Die korrekte Flankierung des Templates wurde durch eine ausreichende Länge der Primer in der Umgebung des Basenaustauschs erreicht. Die Sequenzen der verwendeten Primer befinden sich im Anhang.

### 3.1.1.3 Amplifikation von cDNA zur Konstrukterstellung

Als Vorlage für die Konstrukterstellung wurden *MCCA* im Plasmidvektor pOTB7 und *MCCB* im Plasmidvektor pGEM-T Easy verwendet. Diese lagen als gereinigte cDNA in einer Konzentration von ca. 0,13 ng/µl vor. Das PCR-Produkt diente als Insert für die spätere Klonierung.

Plasmid	Größe (kb)	Resistenz <i>E.coli</i>	Herkunft
pGEM-T Easy	3,0	Ampicillin	Promega, Madison, WI,USA
pOTB7	1,8	Chloramphenicol	Deutsches Ressourcenzentrum für Genomforschung, Berlin

#### Ansatz der PCR Reaktion :

1 µl *MCCA*-cDNA oder *MCCB*-cDNA  
 1 µl Primer (10pmol)  
 0,5 µl dNTP's  
 X µl Polymerase (nach Herstellerangaben eingesetzt)  
 5 µl 10 x Enzympuffer

Ad 50 µl H<sub>2</sub>O bidest.

#### PCR Programme zur Konstruktgenerierung:

Taq				Expand-High-Fidelity			
1	Premelt	94° C	5 min	1	Premelt	94° C	5 min
2	Melt	94° C	45 s	2	Melt	94° C	45 s
3	Annealing	53° C	30 s	3	Annealing	53° C	45 s
4	Extension	72° C	30 s	4	Extension	68° C	45 s
2-4	Repeat	x 30		2-4	Repeat	X 30	
5	Hold	4° C		5	Hold	4° C	

### 3.1.1.4 PCR zur Identifizierung korrekt transformierter Klone

Um die erfolgreiche Ligation des Inserts in den Vektor zu überprüfen, wurden von der Agarplatte Bakterienklone mit einer sterilen Pipettenspitze aufgenommen und in 10 µl H<sub>2</sub>O bidest. suspendiert. Bei der PCR zum Clonescreen wurde lediglich ein 20 µl Ansatz benötigt und alle Volumina außer der des Primers entsprechend angeglichen. Es wurden jeweils ein Vektor-Primer und ein Insert-spezifischer Primer benutzt. Als Template diente 1 µl der suspendierten Bakterien. Bei dieser PCR kam die Taq-Polymerase zur Anwendung. In der ersten Phase der PCR wird bei 96° C die bakterielle Membran zerstört. Danach wird die DNA der PCR zugänglich. Das Vorhandensein eines PCR-Produkts wurde in einer Agarosegelelektrophorese überprüft (siehe 3.1.5).

#### Ansatz der PCR Reaktion:

1 µl Suspendierter Klon  
 1 µl Primer (10 pmol)  
 0,2 µl dNTP's  
 2 µl 10 x Enzympuffer  
 0,5 µl Taq-Polymerase

Ad 20 µl H<sub>2</sub>O bidest.

#### Clonescreen PCR:

1	Premelt	94° C	6 min
2	Melt	94° C	40 s
3	Annealing	55° C	40 s
4	Extension	72° C	40 s
2-4	Repeat	x 24	
5	Hold	4° C	

### 3.1.2 Sequenzierung von klonierter cDNA

Primer	Metabion, München
Rhodamin dye terminator Kit	Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt
Ethanol	Klinikapotheke, Klinikum Innenstadt, München
Na-Acetat, 3 M, pH 5.2	Sigma, Steinheim
ABI 377 Sequencer	Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt
Computerprogramm „Sequence Navigator“	Applied Biosystems/Perkin Elmer, Weiterstadt

Alle Konstrukte wurden vor Transfektion auf die Korrektheit der DNA-Sequenz hin untersucht. In dieser Arbeit wurde zu diesem Zweck die nicht-radioaktive Kettenabbruchmethode (modifiziert nach Sanger et al., 1977) verwendet. Dabei kommt es in einer PCR-ähnlichen Reaktion, bei der ein Primer, Desoxynukleotide (dNTP's) und Didesoxynukleotide (ddNTP's) eingesetzt werden,

zu Kettenabbrüchen. Dies geschieht, da die Polymerase den DNA-Strang aufgrund der fehlenden 3'-OH Gruppe des ddNTP's nicht verlängern kann. Um bei der Auftrennung im Agarosegel die Basen unterscheiden zu können, sind die ddNTP's mit verschiedenen Rhodamin-Farbstoffen markiert (Rhodamin dye terminator Kit). Mit dieser Methode ist eine Länge von 500-600 bp in guter Qualität zu sequenzieren. Es wurden entweder Insert-spezifische oder Vektor-spezifische Primer benutzt, die ca. 40 bp vor der zu sequenzierenden Stelle liegen.

Die verwendete Plasmid-DNA lag in einer Konzentration von ca. 150 ng/µl vor.

#### Sequenzieransatz:

0,5 µl Gereinigte Plasmid-DNA

1 µl Primer (10pmol)

2 µl Ready Reaction Mix

---

Ad 5 µl H<sub>2</sub>O bidest.

#### Sequenzierungsprogramm:

1	Melt	94° C	15 s
2	Annealing	53° C	15 s
3	Extension	60° C	240 s
1-3	Repeat	x 24	
4	Hold	4° C	

Das Produkt wurde mit 0,5 µl 3M Na-O-Acetat (pH 5,2) und 12,5 µl 98 %-igem Ethanol gefällt und danach zentrifugiert (20000 g, 20 min, 4° C). Nach Abnehmen des Überstands wurde das Pellet mit 90 µl 70 %-igem Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (20000 g, 20 min, 4° C) auf den Boden eines Eppendorfgefäßes präzipitiert. Im Wärmeschrank wurde das Präzipitat, nach Abnehmen des Überstands über Nacht bei 37° C getrocknet. Die Proben wurden auf einem ABI 377 Sequencer analysiert. Die Rohdaten wurden mit dem Computerprogramm „Sequence Navigator“ ausgewertet.

### **3.1.3 Reinigung von DNA und Extraktion von Plasmiden aus Bakterien**

QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep miniprep	Qiagen, Hilden
Clontech Midi	BD Clontech, San Diego, USA

In dieser Arbeit wurde für verschiedene Versuchsschritte (Amplifikation von cDNA, Clonescreen, Plasmidtransfektion) DNA gereinigt. Dabei wurde jeweils eine Methode verwendet, die DNA an eine spezielle Silikatmatrix bei hoher Salzkonzentration adsorbiert

(QIAquick PCR Purification Kit, QIAprep miniprep, Clontech Midi). Die Größe der DNA-Fragmente, die aufgenommen werden kann, ist dabei pufferabhängig. Nach Reinigung wurde die cDNA in H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Das PCR-Produkt wurde zur Vorbereitung des enzymatischen Verdau mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kits gereinigt und mit 30 µl H<sub>2</sub>O bidest. eluiert. Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurde mit der Eluierung in 50 µl H<sub>2</sub>O bidest. abgeschlossen und führte zu einer Konzentration der Plasmid-DNA von 120-150 ng/µl im QIAprep miniprep.

Für die Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde die Methode der alkalischen Lyse verwendet: Die bakterielle Zellwand wird unter alkalischen Bedingungen zerstört, die Reaktion neutralisiert und auf optimale Bedingungen für ein hohes Salzmilieu eingestellt, um eine Reinigung des Plasmids zu ermöglichen (QIAprep miniprep, Clontech Midi).

### 3.1.4 Restriktionsverdau von DNA

<i>Bam</i> H I 10 U/µl	Roche, Mannheim
<i>Eco</i> R I 10 U/µl	Roche, Mannheim
Restriktionspuffer 10x	Roche, Mannheim
CIP, Calf intestine phosphatase 10 U/µl	New England Biolabs, Ipswich, MA, USA

#### 3.1.4.1 Restriktionsverdau zur Vorbereitung der Ligation

Um ein amplifiziertes cDNA-Fragment in einen Vektor zu klonieren, müssen beide mit zwei unterschiedlichen Restriktionsendonukleasen verdaut werden. Dabei wird die palindromische Struktur an den 5'- und 3'-Enden durch die Enzyme *Eco*R I und *Bam*H I erkannt. Durch die spezifische Verdauung entsteht nun auf jeder Seite der DNA-Stränge des PCR-Produkts und des Vektors ein kurzer Abschnitt von vier Basen einzelsträngiger DNA. Diese überhängenden Enden (sticky ends) sind die Voraussetzung für die spätere passgenaue Klonierung des Inserts in den Vektor.

#### Ansatz zum Verdau des Inserts und des Vektors:

5-10 µg	DNA (Plasmidvektor oder gereinigtes PCR-Produkt)
3 µl	10 x Reaktionspuffer
0,5 µl	<i>Eco</i> R I
0,5µl	<i>Bam</i> H 1
<hr/>	
Ad 40 µl	H <sub>2</sub> O bidest.

Nach vier Stunden wurde zum Vektorverdau 0,5 µl Phosphatase (CIP) zugegeben und nochmals eine halbe Stunde inkubiert. Die alkalische Phosphatase verhindert durch Dephosphorylierung die Religation des Vektors mit der abgespaltenen Nukleotidsequenz.

Danach wurden beide Ansätze nochmals gereinigt, um Enzyme zu entfernen und das Puffersystem zu neutralisieren. 5 µl wurden danach auf ein DNA-Agarosegel aufgetragen (siehe 3.1.5)

### 3.1.4.2 Restriktionsverdau zur Identifizierung transformierter Klone

Nachdem ein Bakterienklon in einer Test-PCR als positiv erkannt wurde, wurde er in 4 ml LB-Medium kultiviert. Danach wurde das Plasmid präpariert (QIAprep miniprep) und enzymatisch verdaut. Hierbei kamen Restriktionsendonukleasen, die bei der Klonierung verwendet wurden zur Anwendung.

#### Ansatz zum Verdau transformierter Klone:

5 µl	Gereinigtes Plasmid
0,5 µl	<i>EcoR</i> I
0,5 µl	<i>BamH</i> I
2 µl	10 x Puffer
<hr/>	
Ad 20 µl	H <sub>2</sub> O bidest.

Der Ansatz wurde für vier Stunden im 37° C warmen Wasserbad inkubiert. 5 µl wurden danach auf ein DNA Agarosegel aufgetragen (siehe 3.1.5)

### 3.1.5 Horizontale Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

DNA Agarose	Biozym Diagnostics, Hessisch Oldendorf
Ethidium Bromid 500 µg/ml	Sigma, Steinheim
Gel Loading Solution	Sigma, Steinheim
Marker 1kb	Invitrogen, Karlsruhe
Marker V	Roche, Mannheim
EDTA	Sigma, Steinheim
Borsäure	Sigma, Steinheim
Tris Base	Sigma, Steinheim

	Bestandteil	Anmerkung
TBE-Puffer	54 g Tris Base, 27,5 g Borsäure, 20 ml 0,5 M EDTA	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest., einstellen auf pH 8,0
Agarosegel	0,75-2,5g Agarose	Ad 100 ml TBE-Puffer; aufkochen, nach Auskühlen Ethidiumbromid zugeben, ausgießen

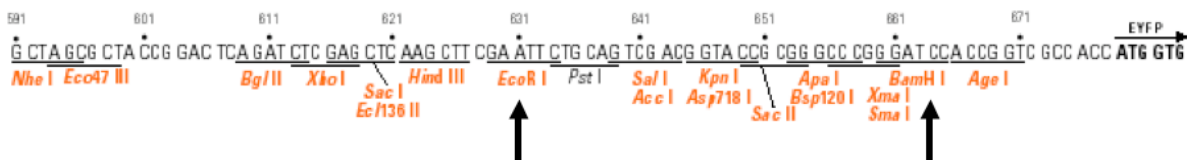
Die PCR-Produkte sowie Ansätze des Restriktionsverbaus wurden auf ein Agarosegel aufgetragen, um das Vorhandensein sowie die korrekte Größe der cDNA-Fragmente zu bestimmen. Dabei wird der Effekt ausgenutzt, dass DNA im elektrischen Feld je nach Größe unterschiedlich schnell wandert und somit Fragmente verschiedener Größe aufgetrennt werden können. Um die DNA sichtbar zu machen, wurde das Agarosegel mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid

versetzt. Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basen der Nucleinsäuren und wird nach Anregung mit UV-Licht (254, 302 oder 366 nm) als rot-orange Bande sichtbar. Der Gehalt an Agarose wurde je nach Größe des erwarteten Produkts gewählt und lag zwischen 0,75 % und 2,5 %. Die Gelelektrophorese wurde in TBE-Puffer bei 80 bis 100 V durchgeführt. Als Längenstandard wurden der Marker 1kb und der Marker V verwendet.

### 3.1.6 Generierung eines rekombinanten Plasmids

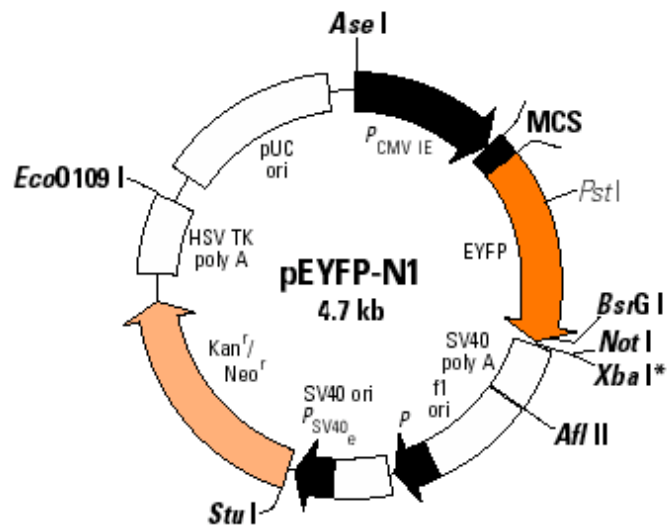
Plasmid	Größe (kb)	Resistenz <i>E. coli</i>	Selektionsagens für Eukaryonten	Herkunft
pEYFP-N1	4,7	Kanamycin	Neomycin	BD Clontech, San Diego, USA

Als visueller Marker der Genexpression und Proteinlokalisierung in eukaryotischen Zellen diente der N-terminale Protein-Fusions-Vektor pEYFP-N1. Dieser Vektor kodiert für die gelb-grüne Variante des grün fluoreszierenden Proteins (GFP). Die Sequenz des EYFP-Gens enthält mehr als 190 stille Basensubstitutionen zur Angleichung an die menschliche Codon-Präferenz [22]. Zur Verbesserung der Translationseffizienz in eukaryotischen Zellen befindet sich vor der kodierenden EYFP-Sequenz eine Kozak Consensus-Sequenz. pEYFP-N1 enthält außerdem das Resistenzgen für Kanamycin, welches das Wachstum transformierter Wirtszellen auf Selektivagar zulässt. Ein SV40-Polyadenylierungssignal nach der EYFP-Sequenz sorgt für eine Prozessierung des 3'-Endes der EYFP-mRNA. Zur prokaryotischen Expression ist eine pUCori Stelle vorhanden. Eine multiple Klonierungsstelle befindet sich zwischen dem CMV-Promotor ( $P_{CMVIE}$ ), der die transiente Expression in Säugetierzellen kontrolliert, und der EYFP-kodierenden Sequenz. Die amplifizierte cDNA wurde in die multiple Klonierungsstelle mit den Schnittstellen *EcoR* I und *BamH* I kloniert (Abbildung 3.1, 3.2).



**Abbildung 3.1 Multiple Klonierungsstelle des pEYFP-N1 Vektors.** Unterstrichen sind die palindromischen Nukleotidsequenzen, die von den darunter in orange dargestellten Restriktionsendonukleasen gespalten werden. Die Pfeile zeigen die Schnittstellen an, die für die Klonierung verwendet wurden: *EcoR* I und *BamH* I.





**Abbildung 3.2 Vereinfachte Vektorkarte des N-terminalen Proteinfusionsvektors pEYFP-N1.** Fremdgene können über die multiple Klonierungsstelle (MCS) am N-Terminus der EYFP-Sequenz inseriert werden und müssen ein Startcodon zur Expression als EYFP-Fusionsprotein enthalten. Abgebildet sind relevante Restriktionsenzymstimmstellen, sowie Abschnitte für Antibiotika-Resistenzen ( $Kan^r / Neo^r$ ). Der für die eukaryotische Expression wichtige Viruspromotor wird durch  $P_{CMV IE}$  angezeigt.

### 3.1.7 Ligation des Inserts in den Vektor pEYFP-N1

T4 DNA Ligase	Invitrogen, Karlsruhe
T4 DNA Ligase 5x Puffer	Invitrogen, Karlsruhe

Bei der Ligation gehen die 3'-Hydroxylgruppen und die 5'-Phosphatgruppen des Inserts und des verdauten Vektors eine Bindung ein. Diese energieabhängige Reaktion wird von dem Enzym T4 DNA Ligase katalysiert. Die Edukte, Vektor und Insert, müssen bei dieser Reaktion in einem Verhältnis von eins zu fünf vorliegen, um eine Inhibition der Reaktion zu vermeiden. Um dies zu bestimmen, werden Vektor und Insert auf ein Agarosegel aufgetragen und die Signalintensität abgeschätzt. Dabei muss die Länge der DNA-Fragmente miteinbezogen werden, da diese die Interkalierung von Ethidiumbromid mit dem Nukleinsäuremolekül und somit die Signalintensität proportional beeinflusst.

#### Allgemeiner Reaktionsansatz zur Ligation:

$x$ =Volumen an Vektor entsprechend 0,2-0,6  $\mu$ g;  $y$ =Volumen an Insert entsprechend der fünffachen Menge des eingesetzten Vektors.

x µl	Plasmidvektor
y µl	Insert
1 µl	T4 DNA-Ligase
2 µl	T4 DNA-Ligase 5 x Puffer
Ad 10 µl	H <sub>2</sub> O bidest.

Das Reaktionsgemisch wurde auf Eis pipettiert und 18 Stunden in einem Wasserbad bei 17° C inkubiert.

### 3.1.8 Transformation der *E.coli* Stämme DH5 $\alpha$ und XL1-Blue

Mercaptoethanol	Stratagene La Jolla, CA, USA
Kanamycin	Sigma, Steinheim
Tryptone	Oxoid, Basingstone, Hampshire, U.K.
Select Yeast Extract	Sigma, Steinheim
Agar	Invitrogen, Karlsruhe
NaCl	Merck, Darmstadt
CaCl <sub>2</sub>	Merck, Darmstadt

	Bestandteil	Anmerkung
LB (Luria-Bertani) –Medium	10 g Tryptone, 5 g Select Yeast Extract, 10 g NaCl	Ad 950 ml H <sub>2</sub> O bidest., auf pH 7,4 einstellen, autoklavieren
CaCl <sub>2</sub> 0,1 M	14,7 g CaCl <sub>2</sub>	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest., eisgekühlt verwenden
Selektive LB Festagarplatte	15 g Agar, 30 mg Kanamycin	Ad 1000 ml LB-Medium; autoklavieren, danach Kanamycin unter 50° C zugeben

Stamm	Relevanter Genotyp	Herkunft/Referenz
<i>Escherichia coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44</i> , $\Delta$ <i>lacU169</i> ( $\phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15), <i>hsdR17</i> , <i>recA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>relA1</i>	Hanahan 1983; Bethesda Research Lab. 1986
<i>Escherichia coli</i> XL1-Blue Supercompetent Cells	<i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>thi-1</i> , <i>hsdR17</i> , <i>supE44</i> , <i>relA1</i> , <i>lac</i> [F' <i>proAB</i> , <i>lacZ</i> $\Delta$ M15, Tn10, (Tet')]	Stratagene La Jolla, CA, USA Bullock 1987

Das rekombinante Plasmid wurde durch Transformation von *E.coli* Stämmen kloniert und exponentiell vervielfältigt. Zum Zweck der Transformation wurden die Bakterien des Stamms DH5 $\alpha$  chemisch ‚kompetent‘ gemacht. Hierbei wird die bakterielle Zellwand derart vorbehandelt, dass das Eindringen eines Plasmids erleichtert wird.

Zusätzlich wurden XL1-Blue Supercompetent Cells verwendet, die bereits kompetent sind. *E. coli* DH5 $\alpha$  wurde folgendermaßen chemisch kompetent gemacht:

1. 500 µl einer Vorkultur mit *E. coli* DH5 $\alpha$  werden mit 25 ml LB-Medium bei 37° C in einem Schüttler inkubiert, bis die optische Dichte bei 600 nm 0,6 bis 0,8 beträgt.
2. Die Kultur wird bei 3000 g für 15 Minuten bei 4° C zentrifugiert.

3. Nach Abnahme des Überstands wird das Pellet in 2 ml  $\text{CaCl}_2$  (0,1 M, eisgekühlt) resuspendiert und danach mit  $\text{CaCl}_2$  auf 10 ml aufgefüllt.
4. Nach einer weiteren Zentrifugation (3000 g, 15 min, 4° C) wird das Pellet nach Entfernung des Überstands in 1 ml  $\text{CaCl}_2$  (0,1 M, eisgekühlt) resuspendiert.

Die Zellen sind nun bei 4° C für maximal 24 Stunden kompetent.

Für die Transformation wurde folgendes Protokoll verwendet:

1. 5-10  $\mu\text{l}$  des Ligationsgemisches werden mit 100  $\mu\text{l}$  kompetenten *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen auf Eis gemischt und 30 Minuten auf Eis inkubiert.
2. Um die kompetenten Zellen für das Plasmid zugänglich zu machen, werden die Zellen in einem Wasserbad bei 42° C für eine Minute einem Hitzeschock unterzogen.
3. Nachdem der Ansatz 2 Minuten auf Eis abgekühlt wird, wird er mit 100  $\mu\text{l}$  LB-Medium versetzt.
4. Zur Expression des Resistenzgens werden die transformierten Bakterien 30 bis 60 Minuten in einem Schüttler bei 37° C inkubiert.
5. Die Bakteriensuspension wird auf einer selektiven Agarplatte unter sterilen Bedingungen ausplattiert und über Nacht bei 37° C im Wärmeschrank inkubiert.

Mit den XL1-Blue Supercompetent Cells wurde analog verfahren, mit dem Unterschied, dass die Zellen vor Zugabe des Ligationsansatzes mit 1,7  $\mu\text{l}$  Mercaptoethanol für 10 Minuten inkubiert wurden. Ferner betrug der Hitzeschock 45 Sekunden.

### 3.2 Arbeiten in der Zellkultur

Dulbecco's modifiziertes Minimal Eagle's Medium (D-MEM)	Biochrom AG, Berlin
Fetal bovine Serum (FBS)	Biochrom AG, Berlin
Antibiotic-Antimycotic (Streptomycin 10000 $\mu\text{g/ml}$ , Penicillin G 10000 U/ml, Amphotericin B 25 $\mu\text{g/ml}$ )	Gibco, Paisley, Scotland, U.K.
L-Glutamin 200 mM	Biochrom AG, Berlin
Dulbecco's Phosphate buffered Saline (PBS)	Sigma, Steinheim
Trypsin/EDTA x1 0,5 g/l Trypsin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich

	Bestandteil	Anmerkung
Kulturmedium:	50 ml FBS, 5 ml L-Glutamin, 5 ml Antibiotic-Antimycotic	Ad 500 ml D-MEM

Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit wurde mit zwei adhärenenten eukaryotischen Zelllinien gearbeitet. Bei der Cos7-Linie handelt es sich um immortalisierte Affennierenzellen. HF1/D3 Zellen sind immortalisierte humane Hautfibroblasten. Beide wurden im Wärmebrutschrank bei 37° C und unter 5 %CO<sub>2</sub> kultiviert. Unter sterilen Bedingungen wurde das Kulturmedium alle 48 Stunden gewechselt. Die Passagierung erfolgte bei einer Konfluenz von ca. 80 %. Dazu wurden

die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen und mit Trypsin für fünf Minuten inkubiert, um die Zellen vom Boden der Kulturflasche zu lösen. Danach wurde die Reaktion durch Zugabe von Kulturmedium gestoppt und die Zellen erneut ausgesät.

Stamm	Zellart	Herkunft/Referenz
Cos7	Immortalisierte Affenierenzellen	Hofman, Sodroski, Dana-Faber Cancer Institute, Harvard University
HF1/D3	Immortalisierte humane Fibroblasten	Universität für Bodenkultur, Wien Department für Biotechnologie

### 3.2.1 Transiente Zelltransfektion

Transfektionsmedium:	D-MEM	Biochrom AG, Berlin
Lipofectamine Reagent		Invitrogen, Karlsruhe
PolyMAG B1 16/1B1	1 µg/µl	Chemicell, Berlin

Um in einem eukaryotischen Expressionssystem Plasmide zur Expression zu bringen, müssen diese in die Zielzellen transportiert werden. Durch die Lipiddoppelschicht wird das Überwinden der Zellmembran normalerweise verhindert. In dieser Arbeit wurden zwei Mechanismen zur Einschleusung von Plasmiden in Zellen verwendet, die Lipo- und die Magnetofektion. Als adhärente Zellen wurden Affenierenzellen der Zelllinie Cos7 und humane Fibroblasten (Wildtyp-Fibroblasten) der Zelllinie HF1/D3 verwendet.

#### 3.2.1.1 Lipofektion

Bei der Lipofektion wird durch Komplexierung das Plasmid ionisch an die Oberfläche von Liposomen gebunden. Der Komplex, der eine positive Nettoladung aufweist, wird an negativ geladene Sialinreste gebunden und in die Zelle aufgenommen.

Folgendes Protokoll kam zur Anwendung:

1. Deckgläser werden mit 70 % Ethanol desinfiziert und danach in die Vertiefungen der 6-fach Kultivierungsschale (6-well) gelegt. Danach werden die Vertiefungen zweimal mit PBS ausgewaschen.
2. 200000 Cos7 Zellen werden je Vertiefung des 6-wells ausgesät und mit Kulturmedium im Wärmeschrank (37° C, 5 %CO<sub>2</sub>) inkubiert, bis die Zellen 70-80 % konfluent sind.
3. Es werden zwei Lösungen hergestellt:
  - Lösung A: 2 µg Plasmid-DNA in 375 µl Transfektionsmedium
  - Lösung B: 6 µl Lipofectamine Reagent in 375 µl Transfektionsmedium
4. A und B werden miteinander vereint und bei Raumtemperatur für 30 Minuten inkubiert. Danach werden 750 µl Transfektionsmedium zugegeben.

5. Die Zellen werden einmal mit Transfektionsmedium und einmal mit PBS gewaschen, danach wird der Überstand abgenommen.
6. Nun wird das Transfektionsgemisch zugegeben und für fünf Stunden im Kulturschrank inkubiert. Dann wird das Transfektionsgemisch abgenommen und durch Kulturmedium ohne Antibiotika ersetzt.
7. Das Medium wird nach 24 Stunden ersetzt.
8. Nach 24 bis 48 Stunden werden die Zellen zur Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

### 3.2.1.2 Magnetofektion

Die Magnetofektion beruht auf dem Prinzip der elektrostatischen Bindung von DNA an supraparamagnetische Nanopartikel. Diese sind an einen nicht-viralen Transfektionsvektor PEI (Polyethylenimin) gekoppelt. Nach Anlegen eines magnetischen Feldes wird die komplexierte DNA in den Zielzellen angereichert [65]. Zum Aufbau eines magnetischen Feldes wurden Stabmagneten verwendet, welche an der Unterseite von 12-well Platten angelegt wurden. Um einen genügend großen Abstand zwischen den einzelnen Magneten zu haben, wurde nur jede zweite Kultivierungsschale eines 12-wells transfiziert.

1. Deckgläser werden mit 70 % Ethanol desinfiziert und danach in die Vertiefungen der 12-fach Kultivierungsschale (12-well) gelegt. Danach werden die Vertiefungen zweimal mit PBS ausgewaschen.
2. 120000 Zellen werden in jede zweite Vertiefung eines 12-wells ausgesät und mit Kulturmedium im Brutschrank (37° C, 5 %CO<sub>2</sub>) inkubiert, bis die Zellen 60 % konfluierend sind.
3. Es werden zwei Lösungen hergestellt:

Lösung A: 1 µg Plasmid-DNA in 250 µl Transfektionsmedium

Lösung B: 1 µl PolyMAG B1 16/1B1 in 250 µl Transfektionsmedium

4. Beide Lösungen werden für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert
5. Lösung A wird mit B vereint und unter gelegentlichem Schütteln bei Raumtemperatur für weitere 15 Minuten inkubiert.
6. Die Zellen werden zweimal mit warmem PBS gewaschen.
7. Der Transfektionsansatz wird zugegeben und die Kultivierungsschale mit Magnetplatte im Kulturschrank für 15 Minuten inkubiert.
8. Das Transfektionsgemisch wird abgenommen und die Zellen mit 1 ml Kulturmedium ohne Antibiotika versorgt.
9. Nach 24 Stunden wird die Fluoreszenzmikroskopie vorbereitet.

### 3.2.2 Mitochondriale Gegenfärbung mit MitoTracker® Red und pECFP-mito

Formalin	Sigma, Steinheim
Chloromethyl-X-Rosamine, MitoTracker® Red	Molecular Probes, Eugene, OR, USA
Dimethylsulfoxid DMSO	Sigma, Steinheim
Vectashield	Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA

Plasmid	Größe (kb)	Resistenz <i>E.coli</i>	Selektionsagens für Eukaryonten	Herkunft
pECFP-N1	4,8	Kanamycin	Neomycin	BD Clontech, San Diego, USA

Bei der Fluoreszenzmikroskopie soll durch das Fluoreszenzsignal des exprimierten Konstrukts auf die subzelluläre Lokalisation im Mitochondrium geschlossen werden. Zu diesem Zweck müssen die Mitochondrien durch eine zweite Methode sicher dargestellt werden. Hierfür stehen die Immunfixation mit spezifischen Antikörpern gegen mitochondriale Strukturen, eine Kotransfektion mit einem zweiten fluoreszierenden Protein, sowie die Anfärbung mit einem Farbstoff, der von den Zellen in Mitochondrien angereichert wird, zur Verfügung. Für alle Methoden ist Voraussetzung, dass das Absorptionsspektrum der Gegenfärbung nicht mit dem fluoreszierenden Protein YFP, welches an das Konstrukt gekoppelt ist, interferiert.

In dieser Arbeit wurde sowohl mit der Kotransfektion von pECFP-mito als auch mit MitoTracker® Red gearbeitet.

- Bei MitoTracker® Red handelt es sich um einem Farbstoff, der bei Akkumulation im Mitochondrium eine Bindung mit Thiolgruppen mitochondrialer Proteine eingeht und bei Exzitation rot fluoresziert.
- Der pECFP-mito Vektor kodiert für ein blau fluoreszierendes (cyan fluorescent protein, CFP) Protein, allerdings mit einem anderen Exzitations- und Emissionsspektrum als YFP (Vektorkarte im Anhang). Zusätzlich besitzt dieser Vektor eine mitochondriale Signalsequenz am Aminoterminus von CFP, sodass dieses in das Mitochondrium importiert werden kann und als mitochondrialer Marker dient [62].

Der Vektor pECFP-mito wurde wie die erstellten Fusionskonstrukte mittels Lipofektion bzw. Magnetofektion in die eukaryotische Zelle eingebracht (siehe 3.2.1). Dabei wird die eingesetzte Menge des Fusionsproteins mit YFP halbiert, und die andere Hälfte durch das Plasmid pECFP-mito ersetzt.

	Bestandteil	Anmerkung
Fixierlösung:	PBS	
	Formalin	Auf 1,75 % Formalin einstellen
Markerlösung:	MitoTracker® Red	5 µg
	DMSO	20 µl
	DMEM	Ad 10 ml (0,5 µg MitoTracker® /ml DMEM)

1. Die transfizierten Zellen werden nach 24 bis 48 Stunden zweimal mit warmem PBS gewaschen.
2. Die Markerlösung wird auf die transfizierten Zellen gegeben; diese wird im Kulturschrank für 30 Minuten inkubiert.
3. Nach Dekantierung des Überstands werden die Zellen fünfmal mit warmem PBS gewaschen.
4. Danach werden die Zellen für 15 Minuten mit der Fixierlösung bei Raumtemperatur inkubiert.
5. Die Fixierlösung wird abgenommen und die Zellen zweimal mit warmen PBS gewaschen.
6. Die Zellen werden auf Objektgläsern in 5  $\mu$ l eines Einbettungsmediums (Vectashield) überführt und mit Nagellack abgeschlossen.

Bei Versuchen, bei denen als Kofärbung CFP-mito verwendet wurde, wurde entsprechend ab Protokollpunkt 3. vorgegangen.

### **3.2.3 Fluoreszenzmikroskopie**

Die Fluoreszenzmikroskopie wurde mit einem Zeiss Axiovert 135 invertierten Mikroskop (Zeiss, Göttingen) mit entsprechenden Fluoreszenzfiltern durchgeführt. Dabei liegt für YFP das Exzitationsmaximum bei 513 nm, für CFP bei 433 nm, für MitoTracker<sup>®</sup> Red bei 579 nm. Die Emissionswellenlängen liegen bei 527 nm (YFP), 475 nm (CFP) und 599 nm (MitoTracker<sup>®</sup> Red). Zur Dokumentation wurde eine Digitalkamera der Firma Zeiss mit der Software Axiovision benutzt.

### 3.3 Proteinanalytik

Zur Untersuchung von Fusionskonstrukten auf Proteinebene wurde eine Polyacrylamidgelelektrophorese und eine Immundetektion angeschlossen. Hierbei wurden Antikörper gegen das fluoreszierende Protein YFP verwendet.

#### 3.3.1 Polyacrylamidgelelektrophorese von Fusionsproteinen

NuPAGE <sup>®</sup> Bis Tris Gel 4-12 %	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE <sup>®</sup> LDS Sample Buffer 4 x	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE <sup>®</sup> Reducing Agent 10 x	Invitrogen, Karlsruhe
See Blue Marker	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE <sup>®</sup> MOPS SDS Running Buffer 20 x	Invitrogen, Karlsruhe
Antioxidant Agent	Invitrogen, Karlsruhe
Complete Mini Proteinase Inhibitor	Roche, Mannheim
Mannitol	ICN Biomedical, Aurora, OH, USA
Sucrose	Sigma, Steinheim
Hepes	Sigma, Steinheim
NaCl	Merck, Darmstadt
Tris	Sigma, Steinheim
Tween 20	Sigma, Steinheim

Puffer	Bestandteil	Anmerkung
MSH Puffer:	210 mM Mannitol, 70 mM Sucrose, 5 mM Hepes, 1 Tabl. Proteinase Inhibitor	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest., auf pH 7,5 einstellen
Laufpuffer 1:	50 ml NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest.
Laufpuffer 2:	50 ml NuPAGE MOPS SDS Running Buffer 20x, 500 µl Antioxidant Agent	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest.

Nach Transfektion (Magnetofektion) von Cos7-Zellen in einer 12-fach Kultivierungsplatte und einer Inkubation für 24 Stunden wurden die Zellen zweimal mit warmem PBS gewaschen, mit einem Gummischaber vom Boden der Kulturschale gelöst und in 1 ml PBS resuspendiert. Danach wurden die Zellen bei 300 g und 37° C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen in 200 µl eiskaltem MSH Puffer resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator durch 25-malige Auf- und Abbewegung homogenisiert.

Danach wurde das Homogenat zentrifugiert (600 g, 5 min, 4° C) und der Überstand abgenommen. Der erhaltene Homogenatüberstand wurde weiterverwendet.

#### Ansatz für SDS-Page Gelelektrophorese:

13 µl	Überstand
5 µl	4 x Puffer
2 µl	10 x Reducing Agent
<hr/>	
20 µl	



Nach Zugabe des Reducing Agents wurde der Ansatz für zehn Minuten bei 70° C im Heizblock denaturiert. Nach Befüllen der Kammern mit Laufpuffer 1 und Laufpuffer 2 wurde der Ansatz auf ein Bis-Tris 4-12 % Gel aufgetragen. Als Marker wurde See Blue verwendet. Die Elektrophorese wurde bei 200 V und 60-120 mA pro Gel bei 15° C durchgeführt.

### 3.3.2 Western Blot

NuPAGE® Transfer Buffer 20 x	Invitrogen, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Tween 20	Sigma, Steinheim
Nitrocellulosemembran Optitran BA-S 85	Schleicher und Schuell, BioScience, Dassel
Milchpulver	Merck, Darmstadt
Anti-XFP polyklonaler Maus Antikörper 1 mg/ml	BD Clontech, San Diego, USA
Anti-Maus-IgG alk. Phosphatase 1 mg/ml	Invitrogen, Karlsruhe
CDP Star	Roche, Mannheim
Wicorex B+ Röntgenfilm	Typon Medical Systems AG, Burgdorf, Schweiz

Puffer	Bestandteil	Anmerkung
TBS	20 mM Tris, 140 mM NaCl	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest., auf pH 7,5 einstellen
Transferpuffer	50 ml NuPAGE Transfer Buffer 20x 100 ml Methanol	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O bidest.
Blockpuffer	10 g Milchpulver	Ad 100 ml TBS
Inkubationspuffer	5 g Milchpulver	Ad 100 ml TBS
Waschpuffer	5 ml Tween 20	Ad 1000 ml TBS
Detektionspuffer	0,1 M Tris HCl, 0,1 M NaCl	Einstellen auf pH 9,5

Die im SDS Gel aufgetrennten Proteine wurden in einer Transferkassette auf eine Nitrocellulosemembran überführt. Dazu wurde eine Western Blotting Apparatur mit Transferpuffer befüllt. Der Proteintransfer wurde bei 30 V und 110-170 mA durchgeführt.

Anschließend wurden diese Proteine mithilfe eines Immundetektionssystems nachgewiesen. Dazu wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit Waschpuffer gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen der Membran zu blockieren, wurde die Membran zwei Stunden in Blockpuffer bewegt. Nach erneutem dreimaligen Waschen wurde die Membran mit einem Peptidantikörper gegen YFP (Anti-XFP, 1:100) in Inkubationspuffer eine Stunde inkubiert. Schließlich wurde die Membran mit einem sekundären Antikörper (anti-Maus-IgG Alkalische Phosphatase, 1:10.000) in Inkubationspuffer eine Stunde inkubiert; nachfolgend wurden durch erneutes Waschen ungebundene Antikörper entfernt. Nun wurde die Membran fünf Minuten in Detektionspuffer bewegt. Der alkalische pH ist für die Substratumsetzung notwendig. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde CDP Star (1:100) in Detektionspuffer verwendet. Diese chemilumineszente Verbindung wird in Anwesenheit der alkalischen Phosphatase dephosphoryliert und zerfällt. Dabei wird Licht der Wellenlänge 466 nm emittiert.

Die Membran wurde in eine lichtgeschützte Kassette eingebracht, ein Röntgenfilm aufgebracht und nach einer Expositionszeit von 0,5 bis 4 Stunden entwickelt.

### 3.4 Bioinformatische Methoden

#### 3.4.1 Programme zur Vorhersage der subzellulären Lokalisation

Um erste Hinweise auf die Lokalisation von Signalpeptiden in den beiden Untereinheiten  $MCC\alpha$  und  $MCC\beta$  zu gewinnen, wurden deren Aminosäuresequenzen mittels bioinformatischer Programme untersucht. PSORTII (<http://psort.nibb.ac.jp>) benutzt auf der Suche nach mitochondrialen Signalen die Erkennung einer spezifischen Zusammensetzung von Aminosäuren und deren Ladungsverhältnisse [53]. Des Weiteren wird die Sequenz auf bestimmte Aminosäure-Abfolgen hin untersucht, die typisch für die Spaltungsstelle (Cleavage site) zwischen Signal und reifem Protein sind [19]. Neuere Programme wie SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>) haben diese Methodik weiter verfeinert [56]. Das Programm TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) untersucht alleine den N-Terminus eines Proteins und identifiziert so in Mitochondrien, in Chloroplasten und in anderen Subkompartimenten lokalisierte Proteine [17].

#### 3.4.2 Interspezies-Alignments

$MCC\alpha$  und  $MCC\beta$  wurden auf ihren Übereinstimmungsgrad mit orthologen Proteinen in anderen Spezies untersucht. Dabei wurden die N-terminalen Aminosäuresequenzen von  $MCC\alpha$  und  $MCC\beta$  in verschiedenen Spezies übereinander gelegt (Alignment). Hierzu wurde das Programm ClustalW1.8 auf der Internetseite des Baylor College of Medicine verwendet (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/multi-align/multi-align.html>).

Zur graphischen Darstellung wurde das Programm Boxshade 3.21 verwendet ([http://www.ch.embnet.org/software/box\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/box_form.html)). Das Programm ordnet alle Aminosäuren aufgrund ihrer biochemischen Eigenschaften einer von 9 Gruppen zu (FYW / ILVM / P / DE / GA / ST / NQ / C / RKH). Aminosäuren derselben Gruppe werden als konserviert definiert. Ähnliche Aminosäuren werden grau und identische Aminosäuren schwarz hinterlegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Strategie

Im ersten Teil dieser Dissertation wurde auf die Voraussetzungen für Proteine eingegangen, die im Cytosol synthetisiert und danach in Mitochondrien importiert werden.

Um die Lokalisation des Targetingsignals eingrenzen zu können, wurden Hinweise gesucht, ob  $MCC\alpha$  und  $MCC\beta$  ein N-terminales Signalpeptid besitzen. Dies wurde durch Vergleiche orthologer Proteine in verschiedenen Spezies durchgeführt. Mit Hilfe von Computeralgorithmen wurde für die humanen Proteine analysiert, ob sich in der Aminosäuresequenz bekannte Motive für Schnittstellen befinden, bzw. ob diese eine für mitochondriale Signalpeptide typische Aminosäurezusammensetzung besitzen.

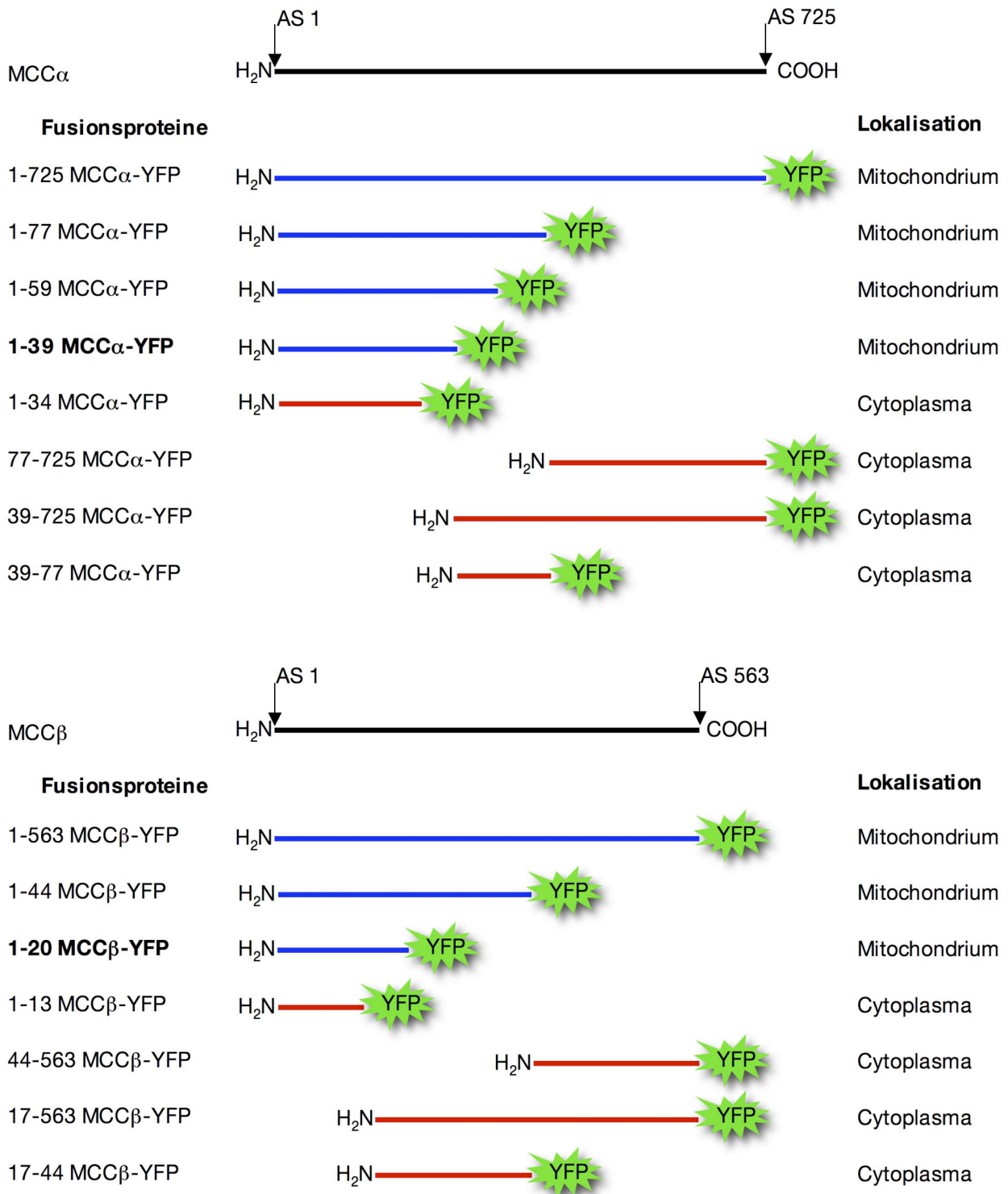
Schließlich wurden beide Untereinheiten mittels einer PCR amplifiziert, in den Vektor EYFP-N1 kloniert und in eukaryotischen Zellen zur Expression gebracht. Die Lokalisation der mit dem Reporterprotein YFP fusionierten Untereinheit wurde durch *in vivo* Kolokalisationsstudien auf ihre subzelluläre Lokalisierung hin untersucht.

Danach wurden Fusionsproteine jeweils mit aminoterminalen Abschnitten der beiden Untereinheiten generiert. Die aminoterminalen Abschnitte wurden sukzessive verkürzt, bis sich in Kolokalisationsstudien keine mitochondriale Anreicherung von YFP mehr zeigte.

Im folgenden Schritt wurden weitere Targetingsignale innerhalb  $MCC\alpha$  und  $MCC\beta$  ausgeschlossen. Hierzu wurden aus der Aminosäuresequenz ohne die aminoterminalen Abschnitte beider Untereinheiten Fusionsproteine mit YFP generiert. In Abbildung 4.1 sind in einer Zusammenschau die generierten Konstrukte dieser Versuche dargestellt.

Um eine intramitochondriale Abspaltung der Targetingsequenz nachzuweisen, wurden die kürzesten Fusionsproteine beider Untereinheiten, die für eine mitochondriale Translokation ausreichend waren, in einem Proteindetektionsverfahren untersucht.

Schließlich wurden in den identifizierten Signalsequenzen Argininreste gegen Glutaminreste ausgetauscht. Dabei wurden durch Veränderung der Ladungsverteilung in den Signalpeptiden die strukturellen Erfordernisse der Targetingsequenzen näher charakterisiert.



**Abbildung 4.1** Fusionsproteine, die zur Bestimmung der mitochondrialen Signalpeptide von MCC $\alpha$  und MCC $\beta$  generiert wurden. Der Aminoterminus wurde sukzessiv verkürzt (blau) bis ein mitochondrialer Import nicht mehr möglich war (rot). Die **kürzesten Konstrukte**, die für einen korrekten Import ausreichend sind, sind fett dargestellt. Konstrukte, die nicht zu einem mitochondrialen Import führten, sind rot dargestellt.

## 4.2 Bioinformatische Untersuchungen

### 4.2.1 Identifizierung möglicher Targetingmotive und Vorhersage ihrer Lokalisation am Aminoterminus

Zur Aufklärung der subzellulären Lokalisation und Suche nach möglichen Spaltstellen wurden bioinformatische Methoden angewendet. Beide Untereinheiten wurden mit Hilfe der Programme PSORTII, TargetP und SignalP untersucht. Für die  $\alpha$ -Untereinheit zeigte PSORTII mit einer Wahrscheinlichkeit von 65% eine mitochondriale Lokalisation an, TargetP mit 75%. Mögliche Spaltstellen wurden zwischen AS 14/15 (PSORTII, SignalP) und AS 67/68 (PSORTII) angegeben (Tabelle 4.1).

Hingegen ergab sich für die  $\beta$ -Untereinheit eine wahrscheinliche mitochondriale Lokalisation in einerseits 21,7% (PSORTII) und 88,5% (TargetP). Die Spaltstellen wurden zwischen AS 15/16 (PSORTII, SignalP) und AS 20/21 (PSORTII) vermutet (Tabelle 4.2).

Bioinformatik für MCC $\alpha$	Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Lokalisation	Potentielle Spaltstellen
TargetP	75,4%	
SignalP		AS 14/15 (Motiv VAA   ER)
PSORTII	65%	AS 14/15 (Motiv VAA   ER) AS 67/68 (Motiv MRT   AK)

**Tabelle 4.1** Bioinformatische Ergebnisse für MCC $\alpha$

Bioinformatik für MCC $\beta$	Wahrscheinlichkeit einer mitochondrialen Lokalisation	Potentielle Spaltstellen
TargetP	88,5%	
SignalP		AS 15/16 (Motiv ARA   SP)
PSORTII	21,7%	AS 15/16 (Motiv ARA   SP) AS 22/23 (Motiv PRA   YH)

**Tabelle 4.2** Bioinformatische Ergebnisse für MCC $\beta$

### 4.2.2 Vergleiche der Primärstruktur mit Orthologen anderer Spezies deuten auf ein aminoterminaleres Signalpeptid hin

Durch Vergleiche orthologer Proteine verschiedener Spezies lässt sich eine Aussage über den Grad der Konservierung bestimmter Domänen machen. Für mitochondriale Proteine ist bekannt, dass die Targetingssignale wenig konserviert sind.

Es zeigte sich beim Vergleich der aminoterminalen Region der humanen  $\alpha$ -Untereinheit mit den orthologen Proteinen der Maus (*Mus musculus*) und der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thalianae*) eine geringere Übereinstimmung im Bereich der ersten 48 Aminosäuren im Vergleich mit der Primärstruktur ab Aminosäure 49. Dies deutet auf ein aminoterminales Signalpeptid hin. Das bakterielle Ortholog im *Agrobacterium tumefaciens* besitzt keinen der humanen MCC $\alpha$ -Untereinheit vergleichbaren aminoterminalen Abschnitt. Dies ist zu erwarten, da Prokaryonten aufgrund einer fehlenden Subkompartimentierung keine Signalpeptide benötigen (Abbildung 4.2).

		10	20	30	40	50	60	70	80
<i>H. sapiens</i>	MCC $\alpha$	MAAASAVSVLLVAARNRWHRIPSLLLPRTWVWRQRTMKYTTATGRNITKVLIANRGEIACRVMTAKKLG	QTVAVYSEADR						
<i>M. musculus</i>	MCC $\alpha$	-----MAAAALLAAVDNRQIRRVFLLLPREWAWKLRITMKYCTTPGGSITKVLIANRGEIACRVMTAKKMG	QSVAVYSEADR						
<i>A. thalianae</i>	MCC $\alpha$	-----MSMTTWALRRNVRKNSMLVRYTSGSASMKPKEQ-----CIEKLLVANRGEIACRIMRTAKKLG	QTVAVYSEADR						
<i>A. tumefaciens</i>	MCC $\alpha$	-----				MLDKIVIANRGEIARIRTRACKELG	KTVAVHSSADR		

**Abbildung 4.2 Aminoterminalen Abschnitte orthologer Proteine der  $\alpha$ -Untereinheit verschiedener Spezies:** *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thalianae* und *Agrobacterium tumefaciens*. Schwarz hinterlegt sind identische AS und grau ähnliche. Ab AS 49 sind die orthologen Proteine stärker konserviert als am Aminoterminus. Dem *Agrobacterium tumefaciens* fehlt ein vergleichbares aminoterminalen Segment.

Die humane MCC $\beta$ -Untereinheit zeigte im Vergleich mit seinen Orthologen ein weitaus inkongruenteres Bild. Gegenüber der  $\beta$ -Untereinheit der Maus (*Mus musculus*) ist kein Unterschied im Grad der Konservierung am Aminoterminus erkennbar. Bei der Ackerschmalwand (*Arabidopsis thalianae*) findet sich eine weitaus geringere Homologie des Aminoterminus gegenüber der humanen Primärstruktur.

Der MCC $\beta$ -Untereinheit des *Agrobacterium tumefaciens* fehlt ein den anderen Orthologen ähnlicher aminoterminaler Bereich von 25 Aminosäuren (Abbildung 4.3). Trotz dem vergleichsweise kurzen Fragment, ist ein Signalpeptid in diesem Bereich wahrscheinlich.

		10	20	30	40	50	60
<i>H. sapiens</i>	MCC $\beta$	-----MWAVLRRLALRPCARASIPACBRAYH-----	GDSVASLGTQPDLSALVQENYKQMKALVNLQHERVEHIKL				
<i>M. musculus</i>	MCC $\beta$	-----MWGALRSALRPCCRAAVPECRAYH-----	GDSVARLGTQPDSSSTVOENYEQMKALVSQLEHRAQYVRL				
<i>A. thalianae</i>	MCC $\beta$	MLRILGRRVVSASKELTSTIQQWRIRPQGTDSREDDPRTFRGLQKCFQVCHLPDGVDRNSEAESSNSIAMEGITSELRSHTKQVLA					
<i>A. tumefaciens</i>	MCC $\beta$	-----		MKLTSSLNRP	-----	AETANAAMFMSGLVEDLRGHVEKISK	

**Abbildung 4.3 Aminoterminalen Abschnitte orthologer Proteine der  $\beta$ -Untereinheit verschiedener Spezies:** *Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Arabidopsis thalianae* und *Agrobacterium tumefaciens*. Schwarz hinterlegt sind identische AS und grau ähnliche. Bei *H. sapiens* und *M. musculus* herrscht noch weitgehend Homologie, hingegen ist diese im Vergleich zu *A. thalianae* und *A. tumefaciens* geringer ausgeprägt. Dem *Agrobacterium tumefaciens* fehlt ein der humanen MCC $\beta$  vergleichbares aminoterminalen Segment von 25 Aminosäuren.

### 4.3 Kolokalisationsstudien zur Identifizierung des Signalpeptids

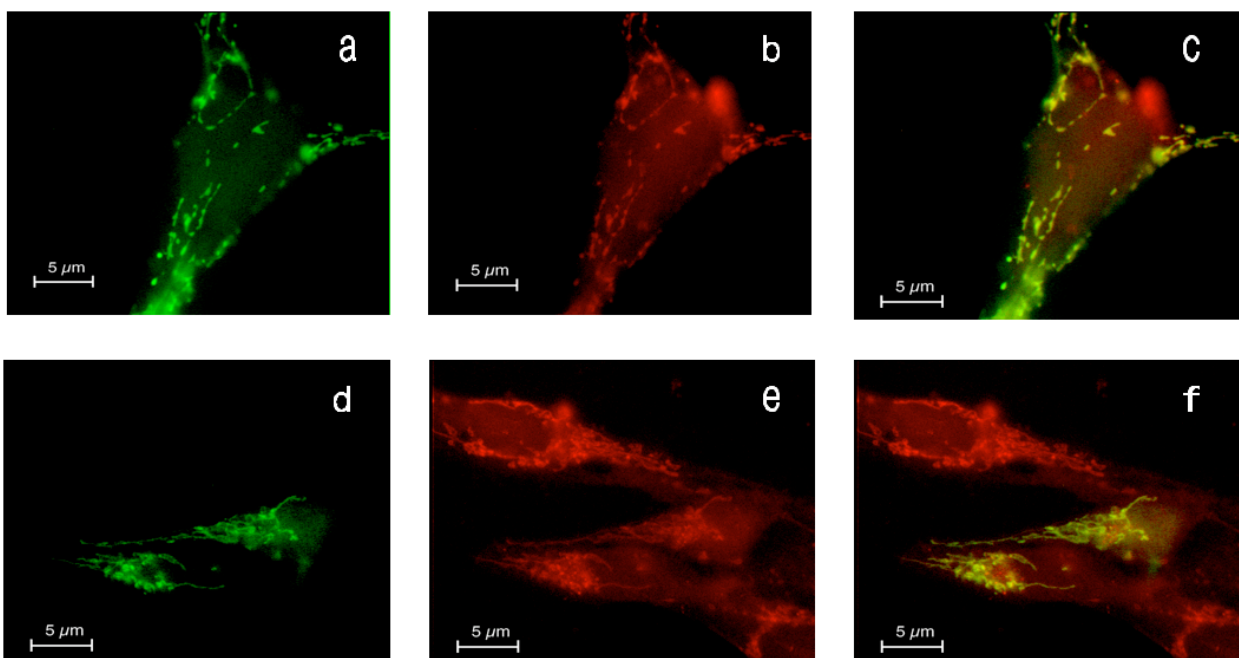
#### 4.3.1 Natives YFP ist cytoplasmatisch lokalisiert

Um für folgende Studien die Lokalisation des nativen YFP zu bestimmen, wurden HF1/D3-Zellen mit dem pEYFP-N1-Vektor transfiziert und in der Fluoreszenzmikroskopie die zelluläre Verteilung untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass YFP cytoplasmatisch lokalisiert ist, mit keiner spezifischen Anreicherung in einem zellulären Subkompartiment.

#### 4.3.2 Beide Untereinheiten - MCC $\alpha$ und MCC $\beta$ - besitzen ein mitochondriales Targetingsignal

Zur Bestimmung der subzellulären Lokalisation wurden im Rahmen dieser Arbeit beide Untereinheiten, MCC $\alpha$  und MCC $\beta$ , in ihrer gesamten Länge am Carboxyterminus mit YFP fusioniert (Tabelle 4.3). Das gelbgrün fluoreszierende 1-725 MCC $\alpha$ -YFP zeigte eine typisch mitochondriale Verteilung und Deckungsgleichheit mit dem Markerfarbstoff MitoTracker<sup>®</sup> Red, als Beweis einer mitochondrialen Lokalisation.

Das gleiche Ergebnis konnte für das Konstrukt der  $\beta$ -Untereinheit 1-563 MCC $\beta$ -YFP erzielt werden (Abbildung 4.4).



**Abbildung 4.4 Mitochondriale Signalpeptide von MCC $\alpha$  und MCC $\beta$ .** 1-725 MCC $\alpha$ -YFP (a) zeigt mit dem mitochondrialen Marker MitoTracker<sup>®</sup> Red (b) ein deckungsgleiches Bild (c). Das Fusionsprotein aus der  $\beta$ -Untereinheit und YFP (1-563 MCC $\beta$ -YFP) ist ebenfalls mitochondrial lokalisiert (d). Dies zeigt die Kolokalisation mit dem Marker (e). In (f) sieht man die übereinander gelegten Bilder (d,e) dargestellt.

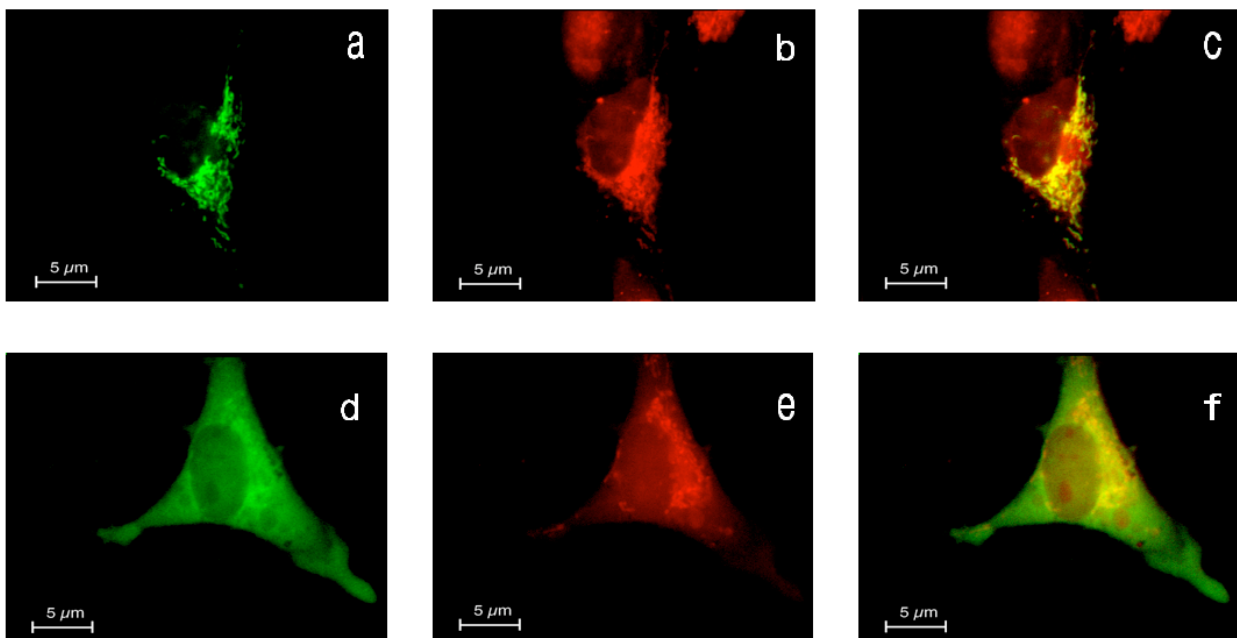
Konstrukt	Mitochondrialer Marker	Fragment von MCC $\alpha$ /MCC $\beta$	Transfizierter Zelltyp	Lokalisation
1-725 MCC $\alpha$ -YFP	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-725	HF1/D3	Mitochondrium
1-563 MCC $\beta$ -YFP	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-563	HF1/D3	Mitochondrium

**Tabelle 4.3** Fusionskonstrukte beider Untereinheiten mit Lokalisation

### 4.3.3 Aminoterminalen Signalpeptide von MCC $\alpha$ und MCC $\beta$

#### 4.3.3.1 MCC $\alpha$ besitzt ein Targetingsignal innerhalb der aminoterminalen 39 AS

Zur weiteren Eingrenzung der N-terminal vermuteten Signalsequenz wurden Fusionsproteine aus N-terminalen Abschnitten von MCC $\alpha$  mit YFP konstruiert (Tabelle 4.4). Sowohl die aminoterminalen 77 AS (1-77 MCC $\alpha$ -YFP) als auch die N-terminalen 59 AS (1-59 MCC $\alpha$ -YFP) waren ausreichend, um YFP zu importieren. Die N-terminale Sequenz der ersten 39 AS von MCC $\alpha$  (1-39 MCC $\alpha$ -YFP) war die kürzeste Sequenz, die in Koloalisationsstudien zu einem mitochondrialen Signal führte. Hingegen waren die 34 AS am Aminoterminus nicht mehr ausreichend, um das Konstrukt 1-34 MCC $\alpha$ -YFP in das Mitochondrium zu importieren; in der Fluoreszenzmikroskopie zeigte sich ein cytoplasmatisches Muster (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5** Der kürzeste Abschnitt von MCC $\alpha$ , der für einen mitochondrialen Import ausreichend ist, sind die AS 1-39 (1-39 MCC $\alpha$ -YFP). Dieses Konstrukt führt zu einem mitochondrialen Signal (a) wie der mitochondriale Marker MitoTracker<sup>®</sup> Red (b) im übereinander gelagerten Bild zeigt (c). Hingegen führt das Konstrukt 1-34 MCC $\alpha$ -YFP (d) zu einem cytoplasmatisches Signal. Im Vergleich dazu zeigt dieselbe Zelle in der Färbung mit MitoTracker<sup>®</sup> Red ein mitochondriales Signal (e). (f) zeigt die übereinander gelagerten Aufnahmen (d) und (e).



Konstrukt	Mitochondrialer Marker	Fragment von MCC $\alpha$	Transfizierter Zelltyp	Lokalisation
1-77 MCC $\alpha$ -YFP	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-77	HF1/D3	Mitochondrium
1-59 MCC $\alpha$ -YFP	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-59	HF1/D3	Mitochondrium
<b>1-39 MCC<math>\alpha</math>-YFP</b>	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-39	HF1/D3	Mitochondrium
1-34 MCC $\alpha$ -YFP	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-34	HF1/D3	Cytoplasma

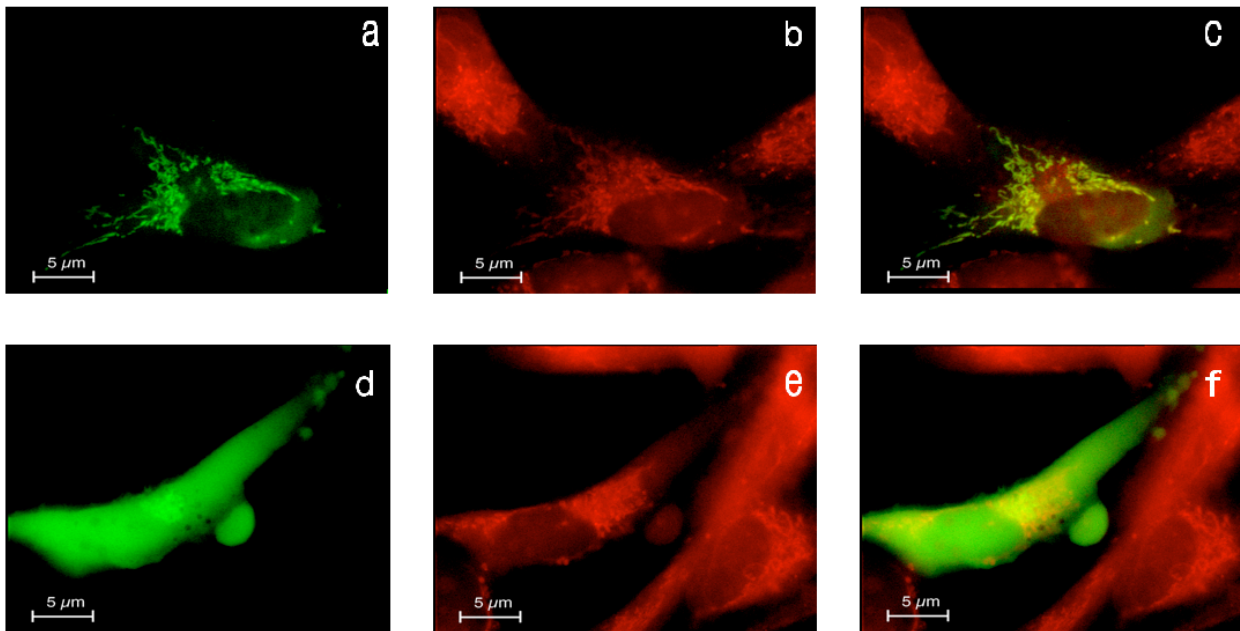
**Tabelle 4.4** Sukzessiv verkürzte Konstrukte der  $\alpha$ -Untereinheit mit zellulärer Lokalisation. Das **kürzeste Signalpeptid** der  $\alpha$ -Untereinheit ist fett dargestellt.

#### 4.3.3.2 MCC $\beta$ besitzt ein Targetingsignal innerhalb der aminoterminalen 20 AS

Auch zur Eingrenzung der Signalsequenz der  $\beta$ -Untereinheit wurden Fusionsproteine aus N-terminalen Abschnitten der MCC $\beta$  und YFP generiert (Tabelle 4.5). Hierbei waren die 44 AS sowie auch die 20 AS des Aminoterminus von MCC $\beta$  ausreichend, um YFP in das Mitochondrium zu translozieren. Gleichzeitig waren die aminoterminalen 20 AS der  $\beta$ -Untereinheit auch die kürzeste Sequenz, die ausreichend war, um eine mitochondriale Lokalisation von YFP zu erreichen. Das Konstrukt, welches nur die aminoterminalen 13 AS von MCC $\beta$  enthielt, wurde nicht in das Mitochondrium importiert. In Kolokalisationsstudien zeigte das Konstrukt 1-13 MCC $\beta$ -YFP ein cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster und kam mit dem mitochondrialen Markerfarbstoff MitoTracker<sup>®</sup> Red nicht zur Deckung (Abbildung 4.6).

Konstrukt	Mitochondrialer Marker	Fragment von MCC $\beta$	Transfizierter Zelltyp	Lokalisation
1-44 MCC $\beta$ -YFP	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-44	HF1/D3	Mitochondrium
<b>1-20 MCC<math>\beta</math>-YFP</b>	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-20	HF1/D3	Mitochondrium
1-13 MCC $\beta$ -YFP	MitoTracker <sup>®</sup> Red	1-13	HF1/D3	Cytoplasma

**Tabelle 4.5** Sukzessiv verkürzte Konstrukte der  $\beta$ -Untereinheit mit zellulärer Lokalisation. Das **kürzeste Signalpeptid** der  $\beta$ -Untereinheit ist fett dargestellt.



**Abbildung 4.6** Der kürzeste Abschnitt von MCC $\beta$ , der für einen mitochondrialen Import ausreichend ist, sind die AS 1-20 (1-20 MCC $\beta$ -YFP). Dieses Konstrukt führt zu einem mitochondrialen Signal (a), wie der mitochondriale Marker MitoTracker® Red (b) im übereinander gelagerten Bild zeigt (c). Hingegen führt das Konstrukt 1-13 MCC $\beta$ -YFP (d) zu einem cytoplasmatisches Signal. Im Vergleich dazu zeigt die gleiche Zelle in der Färbung mit MitoTracker® Red ein mitochondriales Signal (e). (f) zeigt die übereinander gelagerten Aufnahmen (d) und (e).

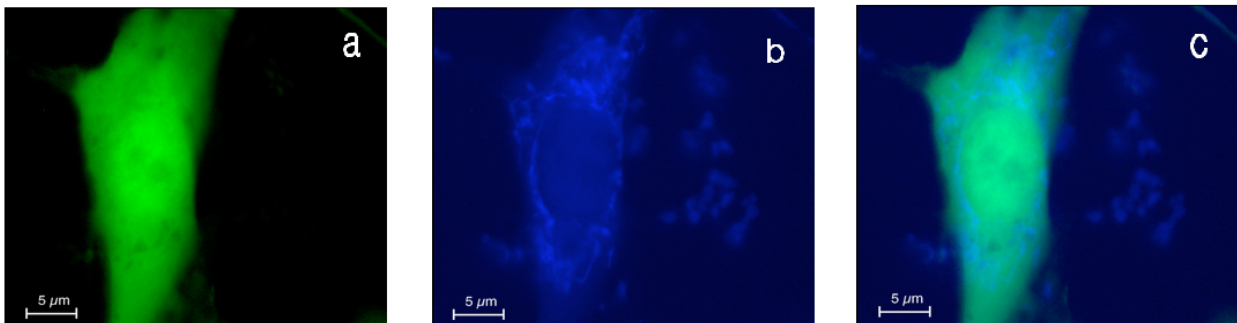
#### 4.3.4 Ausschluss weiterer Targetingsignale in den Untereinheiten

##### 4.3.4.1 Die $\alpha$ -Untereinheit besitzt kein zusätzliches Signalpeptid

In der ersten Versuchsreihe konnte gezeigt werden, dass MCC $\alpha$  eine N-terminale mitochondriale Signalsequenz beinhaltet. Um zeigen zu können, dass dieses Targetingsignal auch notwendig ist, sich also in der restlichen Sequenz keine redundanten Signale befinden, wurden weitere Konstrukte erstellt. Diese beinhalten die gesamte  $\alpha$ -Untereinheit ohne die zuvor untersuchten aminoterminalen Abschnitte ( $\Delta$ 1-76 MCC $\alpha$ -YFP,  $\Delta$ 1-38 MCC $\alpha$ -YFP). Zusätzlich wurden der Abschnitt zwischen AS 39 und AS 77 untersucht (39-77 MCC $\alpha$ -YFP) (Tabelle 4.6). In Kolokalisationsstudien ergab sich für alle drei Konstrukte ein cytoplasmatisches Signal und somit eine fehlende mitochondriale Translokation von YFP, beweisend für eine fehlende zusätzliche Signalsequenz (Abbildung 4.7). Als mitochondrialer Marker wurde das blau fluoreszierende Protein CFP verwendet. Durch ein aminoterminales mitochondriales Signalpeptid wird CFP in das Mitochondrium importiert und kann in Kolokalisationsstudien verwendet werden.

Konstrukt	Mitochondrialer Marker	Fragment von MCC $\alpha$	Transfizierter Zelltyp	Lokalisation
$\Delta$ 1-76 MCC $\alpha$ -YFP	CFP-mito	77-725	HF1/D3	Cytoplasma
$\Delta$ 1-38 MCC $\alpha$ -YFP	CFP-mito	39-725	HF1/D3	Cytoplasma
39-77 MCC $\alpha$ -YFP	CFP-mito	39-77	HF1/D3	Cytoplasma

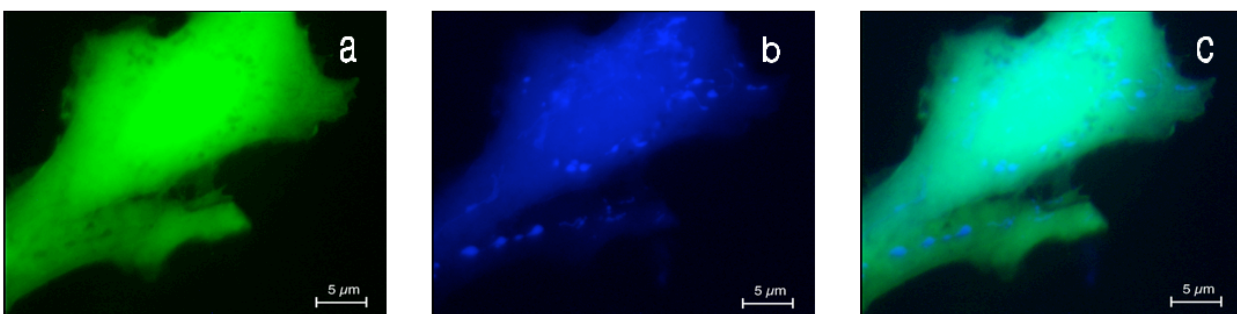
**Tabelle 4.6** Konstrukte zum Ausschluss weiterer Signalpeptide in der  $\alpha$ -Untereinheit



**Abbildung 4.7** MCC $\alpha$  besitzt keine zusätzlichen mitochondrialen Targetingsignale. Dargestellt ist das Konstrukt  $\Delta$ 1-38 MCC $\alpha$ -YFP, das zu einem cytoplasmatischen Signal führt (a). Die mitochondriale Gegenfärbung dieser Zelle mit CFP-mito ist in (b) dargestellt. Beim Übereinanderlegen beider Bilder kommt es zu keiner Deckungsgleichheit (c).

#### 4.3.4.2 Die $\beta$ -Untereinheit besitzt kein zusätzliches Signalpeptid

Gleichsam wurde MCC $\beta$  auf weitere Signalpeptide im Verlauf der Sequenz untersucht. Die Konstrukte, welche die  $\beta$ -Untereinheit ohne die vormals untersuchten N-terminalen Abschnitte beinhalten ( $\Delta$ 1-43 MCC $\beta$ -YFP,  $\Delta$ 1-16 MCC $\beta$ -YFP) zeigten in Kolokalisationsstudien keine mitochondriale Translokation. Ebenso das Konstrukt, das die AS 17-44 umspannt (Tabelle 4.7). Alle drei Konstrukte zeigten in der Fluoreszenzmikroskopie ein cytoplasmatisches Muster mit fehlender Deckungsgleichheit, beweisend für fehlende weitere Signale im Verlauf der restlichen  $\beta$ -Untereinheit. Exemplarisch dargestellt ist das Konstrukt, das die gesamte Untereinheit umspannt, exklusive die ersten 16 Aminosäuren (Abbildung 4.8).



**Abbildung 4.8** MCC $\beta$  besitzt keine zusätzlichen redundanten mitochondrialen Targetingsignale. Dargestellt ist das Konstrukt  $\Delta$ 1-16 MCC $\beta$ -YFP, das zu einem cytoplasmatischen Signal führt (a). Die mitochondriale Gegenfärbung dieser Zelle mit CFP-mito ist in (b) dargestellt. Bei Übereinanderlegen beider Bilder kommt es zu keiner Deckungsgleichheit (c).

Konstrukt	Mitochondrialer Marker	Fragment von MCC $\beta$	Transfizierter Zelltyp	Lokalisation
$\Delta$ 1-43 MCC $\beta$ -YFP	CFP-mito	44-563	HF1/D3	Cytoplasma
$\Delta$ 1-16 MCC $\beta$ -YFP	CFP-mito	17-563	HF1/D3	Cytoplasma
17-44 MCC $\beta$ -YFP	CFP-mito	17-44	HF1/D3	Cytoplasma

**Tabelle 4.7** Konstrukte zum Ausschluss weiterer Signalpeptide in der  $\beta$ -Untereinheit

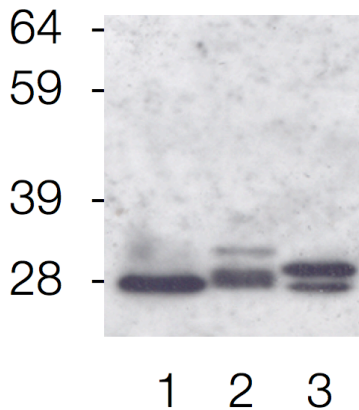
#### 4.4 Proteinanalytik von Fusionskonstrukten

Die Abspaltung der Signalsequenz sollte in einem Western Blot dargestellt werden. Dabei ist nach Überexpression in einer eukaryotischen Zelle zum einen das Präprotein detektierbar, zum anderen sollte, nach Abspaltung der Signalsequenz im Mitochondrium, ein verkürztes Protein erkennbar sein.

Es wurden Cos7-Zellen mit nativem YFP, mit Fusionsproteinen der  $\alpha$ -Untereinheit und der  $\beta$ -Untereinheit getrennt transfiziert. Die Fusionsproteine beinhalteten die kürzesten N-terminalen Sequenzen, die ausreichend sind, um YFP in das Mitochondrium zu translozieren: für die  $\alpha$ -Untereinheit 1-39 MCC $\alpha$ -YFP und für die  $\beta$ -Untereinheit 1-20 MCC $\beta$ -YFP. Des Weiteren wurden Cos7-Zellen mit nativem YFP (ohne Signalpeptid) transfiziert, um eine Referenzgröße für das um das Signalpeptid verkürzte Fusionsprotein zu erhalten. 36 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen lysiert, von Zellkern und Zellmembran befreit und eine Polyacrylamidgelelektrophorese durchgeführt.

Nach Trennung der Proteinfractionen wurde ein Western Blot mit primären Antikörpern gegen YFP durchgeführt. Mit alkalischer Phosphatase gekoppelt an einen sekundären Antikörper, wurden die beiden Fusionsproteine und das native YFP selektiv sichtbar gemacht (Abbildung 4.9). Es zeigte sich für natives YFP eine Bande bei 28 kDa (Abbildung 4.9, Spur 1). Hingegen wurden bei den Konstrukten 1-39 MCC $\alpha$ -YFP und 1-20 MCC $\beta$ -YFP (Abbildung 4.9, Spur 2,3) je zwei Banden sichtbar. Bei 1-39 MCC $\alpha$ -YFP war eine obere Bande bei ungefähr 32 kDa darstellbar. Dies entspricht der errechneten molekularen Masse des unprozessierten Fusionsproteins bestehend aus YFP zuzüglich der ersten 39 AS von MCC $\alpha$  (4,5 kDa) als Signalpeptid. Die untere Bande entspricht ungefähr der molekularen Masse von nativem YFP, also der Größe des Fusionsproteins nach Abspaltung des Signalpeptids. Bei dem Konstrukt 1-20 MCC $\beta$ -YFP entspricht die obere Bande bei 30 kDa dem errechneten Größenwert dieses unprozessierten Fusionsproteins. Die untere Bande, lag mit 28 kDa auf Höhe der Referenz des nativen YFPs, die dem verdauten Fusionsprotein entsprechen würde.

kDa



**Abbildung 4.9 Western Blot der beiden kürzesten mitochondrialen Konstrukte.** 1-39 MCC $\alpha$ -YFP (Spur 2) und 1-20 MCC $\beta$ -YFP (Spur 3) und das nicht mitochondriale YFP *only* (Spur 1) nach Expression in Cos7-Zellen. Die Proteine wurden mit einem Immundetektionssystem gegen YFP sichtbar gemacht. Die Belichtungszeit lag nach Zugabe von CDP-Star bei einer Stunde. Im Gegensatz zu nativem YFP (Spur 1) kann man bei den beiden Konstrukten 1-39 MCC $\alpha$ -YFP und 1-20 MCC $\beta$ -YFP mit Signalpeptid eine Doppelbande erkennen. Die unteren Banden entsprechen der um die errechneten molekularen Masse der Signalpeptide von MCC $\alpha$  (4,5 kDa) und MCC $\beta$  (2,3 kDa) verkürzten Fusionspeptide nach Abspaltung der Signalsequenz.

#### 4.5 Strukturelle Erfordernisse der Signalpeptide

Um die Signalpeptide auf molekularer Ebene zu charakterisieren und damit strukturelle Voraussetzungen für den mitochondrialen Import aufzeigen zu können, wurden weitere Fusionsproteine erstellt. Als Signalpeptid wurden für MCC $\alpha$  die AS 1-39 und für MCC $\beta$  die AS 1-20 gewählt. Innerhalb dieser Abschnitte wurden durch ‚Site directed mutagenesis‘ gezielt positiv geladene Argininreste gegen hydrophobe Glutaminreste ausgetauscht.

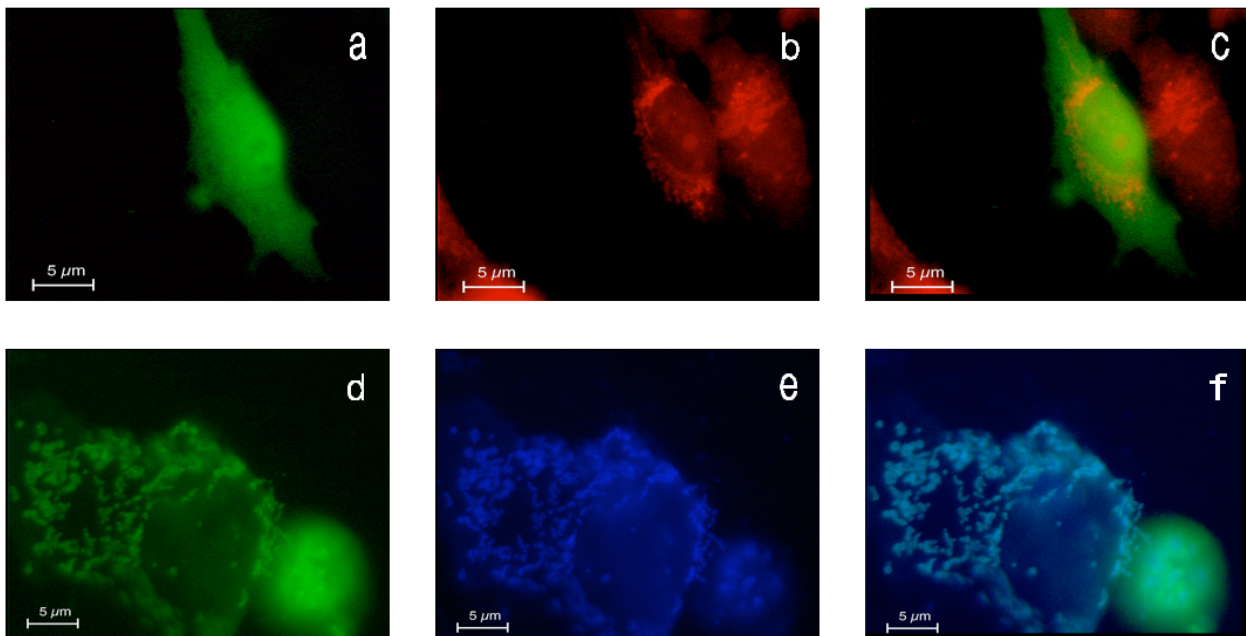
##### 4.5.1 Mutationen im Signalpeptid der $\alpha$ -Untereinheit können zu fehlendem mitochondrialen Import führen

Zur Untersuchung der Auswirkung von Mutationen auf den Import der  $\alpha$ -Untereinheit wurde das Konstrukt 1-39 MCC $\alpha$ -YFP benutzt. Es wurden zum einen am Aminoterminus vier Argininreste an Position 16, 18, 21 und 30 in der AS-Sequenz von MCC $\alpha$  zu Glutamin mutiert (1-39 MCC $\alpha$ -YFP 16, 18, 21, 30 R $\rightarrow$ Q), beziehungsweise nur die beiden Argininreste an Position 16 und 18 (1-39 MCC $\alpha$ -YFP 16, 18 R $\rightarrow$ Q). In Kolokalisationsstudien konnte gezeigt werden, dass die Mutation von vier Argininresten einen Import von YFP in das Mitochondrium verhindert. Hingegen führte die Mutation der ersten beiden Argininreste zu keinem Verlust der Importfähigkeit (Tabelle 4.8). In der Fluoreszenzmikroskopie war ein mitochondriales Signal sichtbar, welches sich mit dem in diesem Fall verwendeten Marker CFP-mito zur Deckung bringen ließ (Abbildung 4.10). Um die sich daraus ergebende Frage zu beantworten, ob die Aminosäuren 1-21 für den Import redundant sind, wurde das Fusionsprotein 22-39 MCC $\alpha$ -YFP

generiert. Dieses zeigte in Expressionsstudien ein cytoplasmatisches Fluoreszenzmuster, führte also zu keinem mitochondrialen Import.

Konstrukt	Mitochondrialer Marker	Position der mutierten Argininreste	Transfizierter Zelltyp	Lokalisation
1-39 MCC $\alpha$ -YFP 16, 18, 21, 30 R $\rightarrow$ Q	MitoTracker <sup>®</sup> Red	16, 18, 21, 30	HF1/D3	Cytoplasma
1-39 MCC $\alpha$ -YFP 16, 18 R $\rightarrow$ Q	CFP-mito	16, 18	Cos7	Mitochondrium
22-39 MCC $\alpha$ -YFP	CFP-mito		HF1/D3	Cytoplasma

**Tabelle 4.8** Konstrukte zur Untersuchung von Mutationen in der Signalsequenz von MCC $\alpha$ . Argininreste (R) werden durch die AS Glutamin (Q) ersetzt.



**Abbildung 4.10** Kolokalisationsstudien zur Auswirkung von Mutationen im Signalpeptid von MCC $\alpha$ . Die Mutation von vier Argininresten in der Targetingsequenz (1-39 MCC $\alpha$ -YFP 16, 18, 21, 30 R $\rightarrow$ Q) führte zu einem cytoplasmatisches Signal (a). In derselben Zelle sind mit MitoTracker<sup>®</sup> Red die Mitochondrien dargestellt (b). Die Mutation der beiden ersten Argininreste (1-39 MCC $\alpha$ -YFP 16, 18 R $\rightarrow$ Q) führte zu einem mitochondrialen Fluoreszenzmuster (d). Als mitochondrialer Marker wurde CFP-mito verwendet (e). Die übereinander gelegten Bilder sind in (c) und (f) dargestellt.

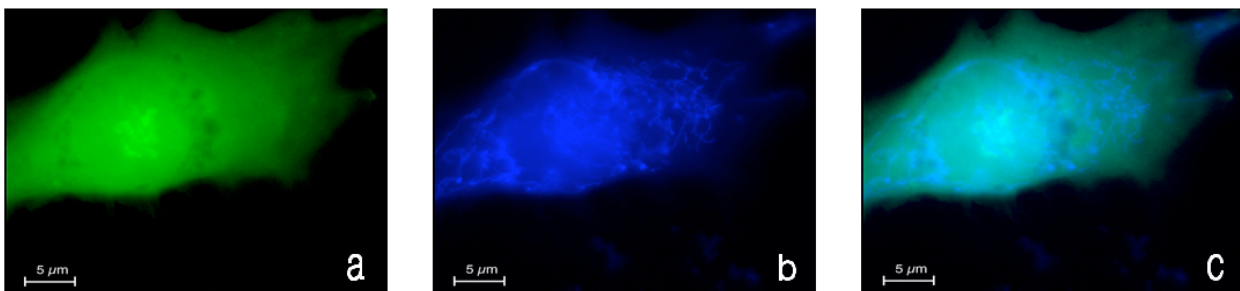
#### 4.5.2 Mutationen von Argininresten in der $\beta$ -Untereinheit führen zum Importverlust

Zur Untersuchung der Auswirkungen von Mutationen in der Signalsequenz der  $\beta$ -Untereinheit wurde das Konstrukt 1-20 MCC $\beta$ -YFP verwendet. Die 20 AS umspannende Targetingsignal von MCC $\beta$  enthält drei Arginine. Diese wurden entweder einzeln oder in Kombination zu Glutamin mutiert (Tabelle 4.9). In Kolokalisationsstudien zeigte sich, dass jede Mutation in der

Signalsequenz der ersten 20 AS zu einem Verlust des Imports führt. Bei allen Konstrukten zeigten sich cytoplasmatische Signale in der Fluoreszenzmikroskopie (Abbildung 4.11).

Konstrukt	Mitochondrialer Marker	Position der mutierten Argininreste	Transfizierter Zelltyp	Lokalisation
1-20 MCC $\beta$ -YFP 6,10,14 R $\rightarrow$ Q	CFP-mito	6, 10, 14	HF1/D3	Cytoplasma
1-20 MCC $\beta$ -YFP 6,10 R $\rightarrow$ Q	CFP-mito	6,10	HF1/D3	Cytoplasma
1-20 MCC $\beta$ -YFP 6 R $\rightarrow$ Q	CFP-mito	6	HF1/D3	Cytoplasma
1-20 MCC $\beta$ -YFP 14 R $\rightarrow$ Q	CFP-mito	14	HF1/D3	Cytoplasma

**Tabelle 4.9** Konstrukte zur Untersuchung von Mutationen in der Signalsequenz von MCC $\beta$ . Argininreste (R) werden zu Glutamin (Q) mutiert.



**Abbildung 4.11** Kolokalisationsstudien zur Auswirkung von Mutationen im Signalpeptid von MCC $\beta$ . Exemplarisch ist ein Bild aus Kolokalisationsstudien mit dem Konstrukt 1-20 MCC $\beta$ -YFP 6,10,14 R $\rightarrow$ Q dargestellt. Eine mitochondriale Translokation des Konstrukts ist nicht vorhanden (a). Die Mitochondrien sind in der Gegenfärbung der Zelle mit CFP-mito dargestellt (b). Die übereinander gelegten Bilder sind in (c) dargestellt.

## 5 Diskussion

Der Aufbau der MCC aus der größeren biotinbindenden  $\alpha$ -Untereinheit und der kleineren  $\beta$ -Untereinheit ist aufgrund von Studien des aus der Rinderniere isolierten Enzyms seit langem bekannt [42, 43]. Im Jahr 2001 konnten die humanen Gene unter anderem in unserer Arbeitsgruppe kloniert werden [4, 18, 30]. Diese Vorarbeiten waren die Voraussetzung für die Charakterisierung der Proteindomänen der humanen MCC und damit auch für die Bestimmung der reifen Proteine der beiden Untereinheiten  $MCC\alpha$  und  $MCC\beta$ . Durch die Expression prozessierter Proteine ist es möglich, in funktionellen Studien die Auswirkung von Mutationen auf die Enzymfunktion zu untersuchen. Bereits 1979 wurde gezeigt, dass MCC mitochondrial lokalisiert ist [41]. Allerdings wurden die Signalpeptide, die am mitochondrialen Import beteiligt sind, bisher nicht charakterisiert. Im Rahmen dieser Dissertationsarbeit sollten die Domänen und die Lokalisation der mitochondrialen Targetingsignale der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit experimentell aufgeklärt werden.

Zunächst haben wir durch bioinformatische Methoden beide Untereinheiten untersucht. Hierfür wurden die Programme SignalP, TargetP und PSORTII verwendet, welche die Primärstruktur von Proteinen hinsichtlich einer für mitochondriale Targetingsignale charakteristischen Zusammensetzung von Aminosäuren, deren Ladungsverhältnisse und potentielle Spaltungsmotive untersuchen. Dabei zeigte sich, dass es sich, wie bei den meisten mitochondrialen Matrixproteinen, um ein aminotermiales Signal handeln könnte. Zwar wurde für die  $\beta$ -Untereinheit eine mitochondriale Lokalisation durch das Programm PSORTII nur mit einer Wahrscheinlichkeit von 21,7 % angegeben, aber die gefundenen mitochondrialen Erkennungsmotive für eine Abspaltung innerhalb der ersten 23 Aminosäuren durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase deuteten auf ein aminotermiales Signal hin.

Ebenso wurde  $MCC\alpha$  mit hoher Wahrscheinlichkeit als ein mitochondriales Matrixprotein identifiziert. Die möglichen mitochondrialen Spaltstellen innerhalb der aminoterminalen 70 Aminosäuren legten auch ein aminotermiales Signal nahe.

Die Untersuchung der orthologen Proteine in verschiedenen Spezies ergab ein ähnliches Bild: die humane  **$\alpha$ -Untereinheit** zeigte, wie bei Orthologen in Säugetieren zu erwarten, einen hohen Konservierungsgrad im Vergleich mit  $MCC\alpha$  der Maus. Um Unterschiede am Aminoterminus identifizieren zu können, haben wir zusätzlich Vergleiche mit *Arabidopsis thaliana* und *Agrobacterium tumefaciens* durchgeführt. Hierbei konnte für *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass im Bereich der ersten 48 Aminosäuren ein geringerer Konservierungsgrad vorliegt als im folgenden Abschnitt des Proteins. Dies ist nicht untypisch für aminotermiale Targetingsignale, da diese häufig weniger konserviert sind. Mitochondriale Importsignale werden nicht durch eine festgelegte Abfolge von Aminosäuren bestimmt, wie es bei anderen



subzellulären Targetingsignalen möglich ist, sondern durch das Zusammenwirken von hydrophoben mit polaren Aminosäuren, die zu der Ausbildung einer  $\alpha$ -Helix führen [74]. Ein weiterer Hinweis auf ein aminoterminalen Signalpeptid ist das Fehlen eines aminoterminalen Abschnitts bei dem orthologen Protein des *Agrobacterium tumefaciens*. Dies ist durch die fehlende Subkompartimentierung des Bakteriums zu erklären und deutet darauf hin, dass der aminoterminaler Anteil nicht für die Funktion des Enzyms an sich, sondern für das spezifische Heranbringen an das Mitochondrium notwendig ist.

Bei Homologiestudien der  **$\beta$ -Untereinheit** war ein Unterschied im Grad der Konservierung am Aminoterminus des Proteins schwer festzumachen. Der Grad der Konservierung war zwischen der humanen MCC $\beta$  und dem Ortholog der Maus hoch. Im Vergleich zu *Arabidopsis thaliana* ließen sich aber keine Unterschiede im Grad der Konservierung im Verlauf des Aminoterminus erkennen. Allerdings fehlte dem Ortholog des *Agrobacterium tumefaciens* ein aminoterminaler Abschnitt, der - obwohl kürzer als bei MCC $\alpha$  - wiederum auf ein aminoterminalen Signal hindeutet (Abbildung 4.2, Abbildung 4.3).

Um die Signalpeptide von MCC $\alpha$  und MCC $\beta$  weiter experimentell eingrenzen zu können, haben wir jeweils Fusionsproteine aus Fragmenten der beiden Untereinheiten mit dem fluoreszierenden Protein YFP erstellt und Kolokalisationsstudien in eukaryotischen Zelllinien durchgeführt. YFP ist ein fluoreszierendes Protein, das in seiner nativen Form in eukaryotischen Zellen cytosolisch lokalisiert ist. Es ist vorstellbar, dass es durch Transfektionsartefakte in den verwendeten Zelllinien zu einer subzellulären Fehllokalisierung kommen könnte. Um dies auszuschließen wurden Zellen mit nativem YFP transfiziert, und es konnte dessen cytosolische Lokalisation bestätigt werden.

Durch die Fusion der einzelnen Untereinheiten in voller Länge mit YFP konnte gezeigt werden, dass diese in das Mitochondrium importiert werden und jede Untereinheit ein eigenes Targetingsignal besitzt. Dies ist zu erwarten, denn Proteine, die im Cytosol synthetisiert und in das Mitochondrium importiert werden, gelangen typischerweise in ungefaltetem Zustand über die äußere und innere mitochondriale Membran. Erst dort gehen sie in ihren funktionsfähigen, gefalteten Zustand über und können somit auch Komplexe mit Interaktionspartnern ausbilden [60].

Um die Signalpeptide weiter einzugrenzen wurden aminoterminaler Fragmente an YFP gekoppelt und in Kolokalisationsstudien die subzelluläre Lokalisation bestimmt. Diese Fragmente wurden soweit verkürzt, bis sie nicht mehr ausreichend waren, um für YFP als mitochondriales Importsignal zu dienen.

Während dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass die aminoterminalen Aminosäuren 1-39 der  **$\alpha$ -Untereinheit** ausreichen, um als mitochondriales Signalpeptid zu fungieren. In

Kolokalisationsstudien mit den aminoterminalen Aminosäuren 1-34 konnte kein mitochondrialer Import festgestellt werden. Um die  $\alpha$ -Untereinheit dahingehend zu untersuchen, ob weitere mitochondriale Signale vorhanden sind, haben wir  $MCC\alpha$  ohne die aminoterminalen 38 Aminosäuren mit YFP fusioniert. Ein mitochondrialer Import des Fusionsproteins kam nicht zustande. Somit besitzt  $MCC\alpha$  keine zusätzlichen Targetingsignale. Dadurch konnte für die  $\alpha$ -Untereinheit der MCC gezeigt werden, dass sie ein Targetingsignal besitzt, welches sich innerhalb der Aminosäuren 1-39 am Aminoterminus befindet. Dieses mitochondriale Signal ist ausreichend und notwendig, um  $MCC\alpha$  in das Mitochondrium zu importieren.

Für die  **$\beta$ -Untereinheit** wurde in analoger Weise vorgegangen. Aminoterminal Sequenzen wurden solange sukzessiv verkürzt, bis in Kolokalisationsstudien Fusionsproteine nicht mehr mitochondrial importiert wurden. Es konnte für  $MCC\beta$  gezeigt werden, dass das kürzeste aminoterminal Fragment, welches ausreichend war, um YFP in das Mitochondrium zu translozieren, die Aminosäuren 1-20 beinhaltet. Kürzere Fusionsproteine, bestehend zum Beispiel aus den aminoterminalen Aminosäuren 1-13, führten zu einer cytoplasmatischen Lokalisation. Auch hier wurde die Untereinheit auf weitere Signalpeptide außerhalb des Aminoterminus untersucht. Diese konnten durch Fusionskonstrukte, die die gesamte  $\beta$ -Untereinheit mit Ausnahme der Aminosäuren 1-16 umspannte, ausgeschlossen werden. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die aminoterminalen 20 Aminosäuren ausreichend und notwendig sind, damit  $MCC\beta$  in das Mitochondrium importiert werden kann. Die Größe des Signalpeptids der  $\beta$ -Untereinheit, das nur halb so groß ist wie das der  $\alpha$ -Untereinheit, ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer bioinformatischen Untersuchungen. Dort zeigte sich im Vergleich des Aminoterminus der humanen  $MCC\alpha$  mit dem bakteriellen Ortholog ein fehlendes Fragment mit einer vergleichbaren Größe von 25 Aminosäuren. Dies hatte bereits auf ein kurzes mitochondriales Signalpeptid der  $\beta$ -Untereinheit hingedeutet. Im Spektrum mitochondrialer Signalpeptide ist das der  $\beta$ -Untereinheit relativ kurz. Allerdings wurde bereits eine Länge von 12 Aminosäuren als ausreichend für den mitochondrialen Import beschrieben [23]. Die Kürze des Peptids widerspricht somit nicht unserer Hypothese, dass es sich um ein Targetingsignal handelt.

Durch Kolokalisationsstudien konnten somit die mitochondrialen Targetingsequenzen beider Untereinheiten eingegrenzt und der Import in das Mitochondrium gezeigt werden. Typischerweise tragen Proteine, die in die mitochondriale Matrix importiert werden, ein aminoterminales Signal [60]. Im Gegensatz zu Proteinen, die sich in der äußeren oder inneren Membran befinden, wird bei Proteinen der Matrix typischerweise die Signalsequenz nach dem Import enzymatisch durch die mitochondriale Prozessierungspeptidase abgespalten. Dies ist

ein wesentlicher Schritt, der die Voraussetzung für die korrekte Faltung, Assemblierung und für den Übergang des reifen Proteins in seinen aktiven Zustand darstellt.

Wir haben, um eine Abspaltung des Signalpeptids zeigen zu können, Fusionsproteine nach eukaryotischer Expression in einem Western Blot dargestellt. Dazu wurden die kürzesten Fusionsproteine, die ausreichend waren, um in das Mitochondrium importiert zu werden (1-39 MCC $\alpha$ -YFP, 1-20 MCC $\beta$ -YFP) in Cos7-Zellen zur Expression gebracht. Zusätzlich wurden Cos7-Zellen nur mit dem nativen YFP transfiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung wurden die resultierenden Proteine mit einem Immundetektionssystem gegen YFP nachgewiesen.

Sowohl für 1-39 MCC $\alpha$ -YFP als auch für 1-20 MCC $\beta$ -YFP konnten zwei Banden nachgewiesen werden. Die Größe der oberen Banden entsprach der zu erwartenden Größe der Fusionsproteine. Die unteren Banden stimmten in ihrer Größe etwa mit der Größe von nativem YFP überein. Dabei entsprach der Abstand zwischen den oberen und unteren Banden der errechneten Größe der Targetingsignale, für MCC $\alpha$  4,5 kDa und für MCC $\beta$  2,3 kDa. Dieses Ergebnis deutet auf eine Abspaltung des Signalpeptids bei beiden Fusionsproteinen hin. Für das Vorhandensein ungespaltener Fusionsproteine kommen dabei zwei Ursachen in Betracht. Zum einen wird durch eine Überexpression der Apparat der mitochondrialen Translokation überlastet. Dadurch gelangt ein Teil der synthetisierten Fusionsproteine nicht in das Mitochondrium und kann somit nicht gespalten zu werden. Zum anderen interagieren mitochondriale Prozessierungspeptidasen nicht nur mit dem aminoterminalen Anteil eines Proteins, um das Signalpeptid abzuspalten, sondern auch mit weiter carboxyterminal gelegenen Abschnitten [40]. Da bei diesen Fusionsproteinen nur aminoterminal Fragmente der MCC-Untereinheiten fusioniert wurden, kann dies zu einer verminderten Effizienz der Abspaltung durch mitochondriale Prozessierungspeptidasen geführt haben.

Eine Abspaltung der Signalpeptide konnte auch in einem Experiment, das in Kooperation mit Herrn PD Dr. Herrmann (Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie, LMU München) durchgeführt wurde, bestätigt werden. Dazu wurden isolierte Hefemitochondrien mit *in vitro* translatierten MCC-Untereinheiten inkubiert und deren molekulare Masse unter verschiedenen Bedingungen untersucht. Die Entkopplung des elektrochemischen Gradienten durch das Ionophor Valinomycin über die innere mitochondriale Membran verhinderte einen Import beider Untereinheiten, und somit auch die Abspaltung der Signalsequenz. Damit wurde indirekt belegt, dass ein Import beider Untereinheiten in die mitochondriale Matrix stattfindet und dass die Signalpeptide von MCC $\alpha$  und MCC $\beta$  im Mitochondrium bei vorhandenem elektrochemischen Gradienten abgespalten werden können [68].

Unsere bisherigen Versuche zu MCC konnten zwar die Signalpeptide eingrenzen und zeigen, dass die aminoterminalen Targetingsequenzen abgespalten werden. Die Frage nach der exakten Stelle, an der das Signalpeptid abgespalten wird, und somit der Aminoterminus des reifen Proteins entsteht, musste jedoch noch beantwortet werden. Diese Information ist nötig, um die funktionellen Auswirkung von Mutationen auf die Enzymaktivität untersuchen zu können. Hierzu werden die reifen MCC-Untereinheiten in einem prokaryotischen Expressionssystem synthetisiert. Durch Untersuchungen der Propionyl-CoA-Carboxylase, welche der MCC strukturell am ähnlichsten ist, ist bekannt, dass die reifen Proteine beider Untereinheiten nötig sind, um ein funktionsfähiges aktives Enzym experimentell generieren zu können [36].

Durch aminoterminal Sequenzierung gereinigter MCC $\alpha$ - und MCC $\beta$ -Proteine konnte für die  **$\alpha$ -Untereinheit** als erste Aminosäure des reifen Proteins die AS Threonin an Position 42 identifiziert und somit die exakte Spaltstelle zwischen AS 41 und AS 42 ermittelt werden. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit den Ergebnissen unserer Kolokalisationsstudien, in denen die aminoterminalen 39 Aminosäuren als ausreichendes mitochondriales Signalpeptid identifiziert wurden. Es handelt sich bei dieser Spaltstelle um keines der klassischen Motive, die für die mitochondriale Prozessierungspeptidase bekannt sind. Dies erklärt auch, warum die Programme PSORTII und SignalP diese Spaltstelle nicht erkannten.

Die  **$\beta$ -Untereinheit** wurde gleichermaßen aminoterminal sequenziert und die Spaltung zwischen den Aminosäuren an Position 22 und 23 identifiziert. Das reife Protein beginnt somit mit der Aminosäure Tyrosin an Position 23. Für MCC $\beta$  wurden in unseren Untersuchungen die aminoterminalen 20 Aminosäuren als mitochondriales Targetingsignal identifiziert. Dies ist in Einklang mit einer Abspaltung des Signalpeptids nach der Aminosäure 22. Im Gegensatz zur Spaltstelle der  $\alpha$ -Untereinheit handelt es sich bei MCC $\beta$  um ein bisher schon bekanntes Spaltungsmotiv. Das Programm PSORTII war in der Lage gewesen, das Motiv PRA|YH als potentielle Spaltstelle korrekt zu identifizieren [68].

Unser weiteres Interesse lag im Rahmen der Aufklärung der Targetingsequenzen auch in der strukturellen Charakterisierung der Signalpeptide. Für den Import mitochondrialer Proteine ist die Ausbildung einer amphipathischen  $\alpha$ -Helix entscheidend. Diese setzt sich aus hydrophoben Aminosäuren einerseits, und positiv geladenen Aminosäuren andererseits zusammen. Als positiv geladene Aminosäuren kommen hauptsächlich Argininreste vor [74].

Wir haben die Signalpeptide dahingehend untersucht, inwieweit die Elimination positiv geladener Aminosäuren in der Aminosäureabfolge des Signalpeptids das Importvermögen beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden Argininreste in den Signalsequenzen durch die ungeladene Aminosäure Glutamin in verschiedenen Kombinationen durch ‚Site directed

mutagenesis' ersetzt. Die Auswirkungen auf den Import wurden in Kolokalisationsstudien überprüft.

Für die  **$\alpha$ -Untereinheit** konnte gezeigt werden, dass der gleichzeitige Austausch der Argininreste an Position 16, 18, 21 und 30 der Aminosäureabfolge (R16, R18, R21, R30) gegen Glutaminreste zur Verhinderung des mitochondrialen Imports führt. Hingegen konnte YFP in das Mitochondrium importiert werden, wenn nur R16 und R18 ersetzt wurden. Dies ist untypisch für mitochondriale Signale, denn üblicherweise sind mehr aminoterminal gelegene Argininreste für den Import relevanter als in der Targetingsequenz weiter entfernt liegende. Dies konnte unter anderem an dem mitochondrialen Enzym Aldehyd-Dehydrogenase gezeigt werden. Die Mutation der ersten beiden Argininreste führte bereits zu einem Verlust der Importkompetenz. Allerdings besteht das Signalpeptid der Aldehyd-Dehydrogenase nur aus 19 Aminosäuren und Mutationen im aminoterminalen Abschnitt können unter Umständen nicht kompensiert werden [55].

Wir haben in weiteren Kolokalisationsstudien überprüft, ob die aminoterminalen 21 Aminosäuren der Targetingsequenz mit den beiden ersten Argininresten an Position 16 und 18, für den Import notwendig sind. Dazu wurde das Fusionsprotein 22-39 MCC $\alpha$ -YFP erstellt. In der Fluoreszenzmikroskopie konnte gezeigt werden, dass die Aminosäuren 22 bis 39 nicht ausreichend sind, um MCC $\alpha$  in das Mitochondrium zu importieren. Trotz der durch die Mutationen zu erwartenden Veränderungen der Sekundärstruktur haben die aminoterminalen Aminosäuren 1-21 eine relevante Funktion für den Import von MCC $\alpha$ .

Bei der Untersuchung der Auswirkung von Mutationen auf das Importverhalten der  **$\beta$ -Untereinheit** waren die Ergebnisse eindeutig. Es wurden analog zu den Mutationen bei MCC $\alpha$  wiederum Argininreste in der Targetingsequenz durch Glutamin ersetzt. Das Signalpeptid von MCC $\beta$  enthält Argininreste an Position 6, 10 und 14. Diese wurden entweder einzeln oder gemeinsam durch Glutamin ersetzt. Sowohl die Mutation aller Argininreste als auch die Mutation nur einzelner Positionen führte zu einem fehlenden Import der Fusionsproteine. Hierfür ist offensichtlich die Kürze des Signalpeptids verantwortlich, wobei bereits einzelne Mutationen die Sekundärstruktur des Peptids derart zu beeinflussen scheinen, dass ein mitochondrialer Import verhindert wird.

Die Domänen der mitochondrialen Signalpeptide stellen die ersten Proteinabschnitte von MCC dar, die experimentell aufgeklärt werden konnten. Die funktionell konservierten Domänen beider Untereinheiten (z.B.: Biotin-Bindestelle, Transcarboxylase-Domäne) wurden zwar durch Homologiestudien mit den Paralogen von MCC, zum Beispiel PCC, und Orthologen anderer Spezies identifiziert. Die experimentelle Bestätigung dieser Domänen steht allerdings noch aus.

Die Identifizierung der reifen Untereinheiten ermöglicht nun eine Überexpression in *Escherichia coli* und damit die Gewinnung funktionell aktiver Enzymkomplexe. Anhand der so gewonnenen Proteine können in der Folge Studien zur Stabilität, Aktivität und zur Assemblierung des nativen Enzymkomplexes durchgeführt werden.

Die Folgen der bei Patienten gefundenen Mutationen auf die Funktion der MCC sind noch weitgehend unverstanden. Mit der Etablierung eines stabilen Expressionssystems in *Escherichia coli* wird auch die Aufklärung der Auswirkungen von Mutationen auf die Funktionalität von MCC durchführbar. Dadurch könnten die molekularen Ursachen der Heterogenität des klinischen Bilds möglicherweise aufgedeckt und die Beratung betroffener Familien verbessert werden.

## 6 Zusammenfassung

Der isolierte 3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase (MCC)-Mangel ist eine angeborene Störung im Abbau der Aminosäure Leucin. Die Erweiterung des Neugeborenen-Screenings (NGS) führte zu der Erkenntnis, dass der MCC-Mangel eine der häufigsten organischen Azidämien darstellt. Das klinische Bild ist sehr heterogen und eine Genotyp-Phänotyp Korrelation ist nicht möglich. Über die Prognose der im NGS identifizierten und bisher asymptomatischen Mutationsträger kann bisher keine Aussage gemacht werden. Das mitochondriale Enzym besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit.

In dieser Arbeit wurden die mitochondrialen Signalpeptide beider Untereinheiten identifiziert. Hierzu wurden Fusionsproteine aus Fragmenten der Untereinheiten mit dem fluoreszierenden Protein YFP generiert. Nach Expression in humanen Hautfibroblasten wurden Kollokalisationsstudien durchgeführt. Zunächst wurde experimentell bestätigt, dass jede Untereinheit ein mitochondriales aminoterminal lokalisiertes Signalpeptid besitzt. Für  $MCC\alpha$  befindet sich dieses in den Aminosäuren 1-39, für  $MCC\beta$  in den Aminosäuren 1-20. Beide Untereinheiten haben keine weiteren Importsignale. Somit sind die aminoterminalen Targetingsequenzen ausreichend und gleichzeitig notwendig, um einen mitochondrialen Import zu ermöglichen. In einer Western Blot Analyse konnte die Abspaltung der Signalpeptide beider Untereinheiten gezeigt werden. Durch Veränderung der positiv geladenen Aminosäuren wurden die strukturellen Erfordernisse der identifizierten Signalpeptide näher charakterisiert. Es wurden Argininreste gegen Glutamin in verschiedenen Kombinationen ausgetauscht. Eine Mutation der aminoterminalen vier Argininreste im Signalpeptid von  $MCC\alpha$  führte zum Importverlust. Bei einer Mutation der in der Targetingsequenz vom Aminoterminus weiter entfernt liegenden zwei Argininreste fand ein Import statt. Bei Mutationen der Argininreste im Signalpeptid von  $MCC\beta$  kam es regelhaft zu einem Importverlust. Damit wurde die Relevanz der positiv geladenen Aminosäuren für den Import der MCC-Untereinheiten belegt.

Die Identifizierung der Signalpeptide stellt die Grundlage weiterer Funktionsuntersuchungen dar, da nur reife Proteine ohne Signalsequenz für prokaryontische Expressionsstudien verwendet werden können. Durch solche Untersuchungen könnten die Auswirkungen von Mutationen auf die Enzymfunktion besser verstanden werden. In diesem Zusammenhang können möglicherweise diejenigen Veränderungen in der Funktionsweise des Enzyms aufgeklärt werden, die eine klinische Symptomatik nach sich ziehen. Hierdurch könnte die bisher schwierige Beratungssituation betroffener Familien hinsichtlich Prognose und Therapie erheblich verbessert werden.

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] M. Arretz, H. Schneider, B. Guiard, M. Brunner, and W. Neupert, Characterization of the mitochondrial processing peptidase of *Neurospora crassa*, *J Biol Chem* 269 (1994) 4959-4967.
- [2] C. Bannwart, B. Wermuth, R. Baumgartner, T. Suormala, and U. N. Weismann, Isolated biotin-resistant deficiency of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase presenting as a clinically severe form in a newborn with fatal outcome, *J Inherit Metab Dis* 15 (1992) 863-868.
- [3] K. Bartlett, M. J. Bennett, R. P. Hill, L. S. Lashford, R. J. Pollitt, and H. G. Worth, Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency presenting with life-threatening hypoglycaemia, *J Inherit Metab Dis* 7 (1984) 182.
- [4] M. R. Baumgartner, S. Almashanu, T. Suormala, C. Obie, R. N. Cole, S. Packman, E. R. Baumgartner, and D. Valle, The molecular basis of human 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency, *J Clin Invest* 107 (2001) 495-504.
- [5] M. R. Baumgartner, M. F. Dantas, T. Suormala, S. Almashanu, C. Giunta, D. Friebe, B. Gebhardt, B. Fowler, G. F. Hoffmann, E. R. Baumgartner, and D. F. Valle, Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: evidence for an allele-specific dominant negative effect and responsiveness to biotin therapy., *Am J Hum Genet* 75 (2004) 790-800.
- [6] T. Baykal, G. H. Gokcay, Z. Ince, M. F. Dantas, B. Fowler, M. R. Baumgartner, F. Demir, G. Can, and M. Demirkol, Consanguineous 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: Early-onset necrotizing encephalopathy with lethal outcome, *J Inherit Metab Dis* 28 (2005) 229-333.
- [7] F. A. Beemer, K. Bartlett, M. Duran, H. K. Ghneim, S. K. Wadman, L. Bruinvis, and D. Ketting, Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in two sibs, *Eur J Pediatr* 138 (1982) 351-354.
- [8] G. Blobel, Intracellular protein topogenesis, *Proc Natl Acad Sci U S A* 77 (1980) 1496-1500.
- [9] M. D. Bruch, and D. W. Hoyt, Conformational analysis of a mitochondrial presequence derived from the F1-ATPase beta-subunit by CD and NMR spectroscopy, *Biochim Biophys Acta* 1159 (1992) 81-93.
- [10] D. H. Chace, T. A. Kalas, and E. W. Naylor, The application of tandem mass spectrometry to neonatal screening for inherited disorders of intermediary metabolism, *Annu Rev Genomics Hum Genet* 3 (2002).
- [11] M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, and D. C. Prasher, Green fluorescent protein as a marker for gene expression, *Science* 263 (1994) 802-805.
- [12] B. P. Cormack, R. H. Valdivia, and S. Falkow, FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP), *Gene* 173 (1996) 33-38.
- [13] M. F. Dantas, T. Suormala, A. Randolph, D. Coelho, B. Fowler, D. Valle, and M. R. Baumgartner, 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: mutation analysis in 28 probands, 9 symptomatic and 19 detected by newborn screening, *Hum Mutat* 26 (2005) 164.
- [14] A. Del Campillo-Campbell, E. E. Dekker, and M. J. Coon, Carboxylation of beta-methylcrotonyl coenzyme A by a purified enzyme from chicken liver, *Biochim Biophys Acta* 31 (1959) 290-292.



- [15] S. Delagrave, R. E. Hawtin, C. M. Silva, M. M. Yang, and D. C. Youvan, Red-shifted excitation mutants of the green fluorescent protein, *Biotechnology (N Y)* 13 (1995) 151-154.
- [16] R. Dodelson de Kremer, A. Latini, T. Suormala, E. R. Baumgartner, L. Larovere, G. Civallero, N. Guelbert, A. Paschini-Capra, C. Depetris-Boldini, and C. Q. Mayor, Leukodystrophy and CSF purine abnormalities associated with isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency, *Metab Brain Dis* 17 (2002) 13-18.
- [17] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak, and G. von Heijne, Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence, *J Mol Biol* 300 (2000) 1005-1016.
- [18] M. E. Gallardo, L. R. Desviat, J. M. Rodríguez, J. Esparza-Gordillo, C. Pérez-Cerdá, B. Pérez, P. Rodríguez-Pombo, O. Criado, R. Sanz, D. H. Morton, K. M. Gibson, P. L. Thuy, A. Ribes, S. Rodríguez de Córdoba, M. Ugarte, and M. Á. Penalva, The molecular basis of 3-methylcrotonylglycinuria, a disorder of leucine catabolism, *Am J Hum Genet* 68 (2001) 334-346.
- [19] Y. Gavel, and G. von Heijne, Cleavage-site motifs in mitochondrial targeting peptides, *Protein Eng* 4 (1990) 33-37.
- [20] K. M. Gibson, M. J. Bennett, E. W. Naylor, and D. H. Morton, 3-Methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in Amish/Mennonite adults identified by detection of increased acylcarnitines in blood spots of their children, *J Pediatr* 132 (1998) 519-523.
- [21] R. Gitzelmann, B. Steinmann, A. Niederwieser, S. Fanconi, T. Sourmala, and R. Baumgartner, Isolated (biotin-resistant) 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting at age 20 months with sopor, hypoglycaemia and ketoacidosis, *J Inherit Metab Dis* 10 (1987) 290-292.
- [22] J. Haas, E. C. Park, and B. Seed, Codon usage limitation in the expression of HIV-1 envelope glycoprotein, *Curr Biol* 6 (1996) 315-324.
- [23] P. K. Hammen, D. G. Gorenstein, and H. Weiner, Structure of the signal sequences for two mitochondrial matrix proteins that are not proteolytically processed upon import, *Biochemistry* 33 (1994) 8610-8617.
- [24] R. Heim, D. C. Prasher, and R. Y. Tsien, Wavelength mutations and posttranslational autoxidation of green fluorescent protein, *Proc Natl Acad Sci U S A* 91 (1994) 12501-12504.
- [25] R. Heim, and R. Y. Tsien, Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer, *Curr Biol* 6 (1996) 178-182.
- [26] M. Heinlein, B. L. Epel, H. S. Padgett, and R. N. Beachy, Interaction of tobamovirus movement proteins with the plant cytoskeleton, *Science* 270 (1995) 1983-1985.
- [27] G. Helmer, M. Casadaban, M. Bevan, L. Kayes, and M. D. Chilton, A new chimeric gene as a marker for plant transformation: the expresion of *Escherichia coli* b-galactosidase in sunflower and tobacco cells, *BioTechnology* 2 (1984) 520-527.
- [28] J. P. Hendrick, P. E. Hodges, and L. E. Rosenberg, Survey of amino-terminal proteolytic cleavage sites in mitochondrial precursor proteins: leader peptides cleaved by two matrix proteases share a three-amino acid motif, *Proc Natl Acad Sci U S A* 86 (1989) 4056-4060.
- [29] N. E. Hoffman, E. Pichersky, and A. R. Cashmore, A tomato cDNA encoding a biotin-binding protein, *Nucleic Acids Res* 15 (1987) 3928.

- [30] A. Holzinger, W. Röschinger, F. Lagler, P. U. Mayerhofer, P. Lichtner, T. Kattenfeld, P. L. Thuy, W. L. Nyhan, H. G. Koch, A. C. Muntau, and A. A. Roscher, Cloning of the human MCCA and MCCB genes and mutations therein reveal the molecular cause of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency, *Hum Mol Genet* 10 (2001) 1299-1306.
- [31] K. Ihara, R. Kuromaru, Y. Inoue, T. Kuhara, I. Matsumoto, M. Yoshino, and J. Fukushige, An asymptomatic infant with isolated 3-methylcrotonyl-coenzyme: a carboxylase deficiency detected by newborn screening for maple syrup urine disease, *Eur J Pediatr* 156 (1997) 713-715.
- [32] R. A. Jefferson, T. A. Kavanagh, and M. W. Bevan, GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *Embo J* 6 (1987) 3901-3907.
- [33] E. R. Jurecki, and S. Packman, Nutrition therapy for b-methylcrotonylglycinuria, in *Metabolic Currents*, in Acosta, P. B., (Ed.), Ross Laboratories, Columbus, Ohio, 1992, pp. 9-12.
- [34] C. Kaether, and H. H. Gerdes, Visualization of protein transport along the secretory pathway using green fluorescent protein, *FEBS Lett* 369 (1995) 267-271.
- [35] F. Kalousek, G. Isaya, and L. E. Rosenberg, Rat liver mitochondrial intermediate peptidase (MIP): purification and initial characterization, *Embo J* 11 (1992) 2803-2809.
- [36] T. L. Kelson, T. Ohura, and J. P. Kraus, Chaperonin-mediated assembly of wild-type and mutant subunits of human propionyl-CoA carboxylase expressed in *Escherichia coli*, *Hum Mol Genet* 5 (1996) 331-337.
- [37] M. Kiebler, P. Keil, H. Schneider, I. J. van der Klei, N. Pfanner, and W. Neupert, The mitochondrial receptor complex: a central role of MOM22 in mediating preprotein transfer from receptors to the general insertion pore, *Cell* 74 (1993) 483-492.
- [38] J. A. Kobori, K. Johnston, L. Sweetman, K. Schmidt, E. Jurecki, B. Wolf, S. Goodman, and S. Packman, Isolated 3-methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency presenting as a Reyes-like syndrome, *Pediatr Res* 25 (1989) 142A (Abstract).
- [39] D. D. Koeberl, D. S. Millington, W. E. Smith, S. D. Weavil, J. Muenzer, S. E. McCandless, P. S. Kishnani, M. T. McDonald, S. Chaing, A. Boney, E. Moore, and D. M. Frazier, Evaluation of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency detected by tandem mass spectrometry newborn screening, *J Inherit Metab Dis* 26 (2003) 25-35.
- [40] H. Koutnikova, V. Campuzano, and M. Koenig, Maturation of wild-type and mutated frataxin by the mitochondrial processing peptidase, *Hum Mol Genet* 7 (1998) 1485-1489.
- [41] D. P. Lau, B. C. Cochran, L. Munson, and R. R. Fall, Bovine kidney 3-methylcrotonyl-CoA and propionyl-CoA carboxylases: Each enzyme contains nonidentical subunits, *Proc Natl Acad Sci U S A* 76 (1979) 214-218.
- [42] D. P. Lau, and R. R. Fall, 3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase from bovine kidney, *Methods Enzymol* 71 (1981) 800-804.
- [43] E. P. Lau, B. C. Cochran, and R. R. Fall, Isolation of 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase from bovine kidney, *Arch Biochem Biophys* 205 (1980) 352-359.
- [44] E. M. Layward, M. S. Tanner, R. J. Pollitt, and K. Bartlett, Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting as a Reye syndrome-like illness, *J Inherit Metab Dis* 12 (1989) 339-340.

- [45] W. Lehnert, H. Niederhoff, T. Suormala, and E. R. Baumgartner, Isolated biotin-resistant 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: long-term outcome in a case with neonatal onset, *Eur J Pediatr* 155 (1996) 568-572.
- [46] T. Lithgow, Targeting of proteins to mitochondria, *FEBS Lett* 476 (2000) 22-26.
- [47] F. Lynen, J. Knappe, E. Lorch, G. Jutting, E. Ringelmann, and J. P. Lachance, Zur biochemischen Funktion des Biotins. II. Reinigung und Wirkungsweise der b-Methyl-crotonyl-Carboxylase., *Biochem Z* 335 (1961) 123.
- [48] A. L. McKean, J. Ke, J. Song, P. Che, S. Achenbach, B. J. Nikolau, and E. S. Wurtele, Molecular characterization of the non-biotin-containing subunit of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, *J Biol Chem* 275 (2000) 5582-5590.
- [49] A. J. Millar, S. R. Short, N. H. Chua, and S. A. Kay, A novel circadian phenotype based on firefly luciferase expression in transgenic plants, *Plant Cell* 4 (1992) 1075-1087.
- [50] J. Mourmans, J. Bakkeren, J. de Jong, R. Wevers, O. P. van Diggelen, T. Suormala, R. Baumgartner, and U. Wendel, Isolated (biotin-resistant) 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency: four sibs devoid of pathology, *J Inher Metab Dis* 18 (1995) 643-645.
- [51] A. Mukhopadhyay, P. Hammen, M. Waltner-Law, and H. Weiner, Timing and structural consideration for the processing of mitochondrial matrix space proteins by the mitochondrial processing peptidase (MPP), *Protein Sci* 11 (2002) 1026-1035.
- [52] K. Murayama, M. Kimura, S. Yamaguchi, T. Shinka, and K. Kodama, Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 15-year-old girl, *Brain Dev* 19 (1997) 303-305.
- [53] K. Nakai, and M. Kanehisa, A knowledge base for predicting protein localization sites in eukaryotic cells, *Genomics* 14 (1992) 897-911.
- [54] W. Neupert, Protein import into mitochondria, *Annu Rev Biochem* 66 (1997) 863-917.
- [55] L. Ni, T. S. Heard, and H. Weiner, In vivo mitochondrial import. A comparison of leader sequence charge and structural relationships with the in vitro model resulting in evidence for co-translational import, *J Biol Chem* 274 (1999) 12685-12691.
- [56] H. Nielsen, J. Engelbrecht, S. Brunak, and G. von Heijne, Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites, *Protein Eng* 10 (1997) 1-6.
- [57] M. Ormo, A. B. Cubitt, K. Kallio, L. A. Gross, R. Y. Tsien, and S. J. Remington, Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein, *Science* 273 (1996) 1392-1395.
- [58] W. J. Ou, A. Ito, H. Okazaki, and T. Omura, Purification and characterization of a processing protease from rat liver mitochondria, *Embo J* 8 (1989) 2605-2612.
- [59] M. A. Pearson, K. A. Aleck, and R. A. Heidenreich, Benign clinical presentation of 3-methylcrotonylglycinuria, *J Inher Metab Dis* 18 (1995) 640-641.
- [60] N. Pfanner, and A. Geissler, Versatility of the mitochondrial protein import machinery, *Nat Rev Mol Cell Biol* 2 (2001) 339-349.
- [61] D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, and M. J. Cormier, Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein, *Gene* 111 (1992) 229-233.

- [62] R. Rizzuto, M. Brini, P. Pizzo, M. Murgia, and T. Pozzan, Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells, *Curr Biol* 5 (1995) 635-642.
- [63] M. O. Rolland, P. Divry, M. T. Zobot, P. Guibaud, S. Gomez, A. Lachaux, and I. Loras, Isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in a 16-month-old child, *J Inherit Metab Dis* 14 (1991) 838-839.
- [64] W. Röschinger, D. S. Millington, D. A. Gage, Z. H. Huang, T. Iwamoto, S. Yano, S. Packman, K. Johnston, S. A. Berry, and L. Sweetman, 3-Hydroxyisovalerylcarnitine in patients with deficiency of 3-methylcrotonyl CoA carboxylase, *Clin Chim Acta* 240 (1995) 35-51.
- [65] F. Scherer, M. Anton, U. Schillinger, J. Henke, C. Bergemann, A. Kruger, B. Gansbacher, and C. Plank, Magnetofection: enhancing and targeting gene delivery by magnetic force in vitro and in vivo, *Gene Ther* 9 (2002) 102-109.
- [66] G. Schneider, S. Sjoling, E. Wallin, P. Wrede, E. Glaser, and G. von Heijne, Feature-extraction from endopeptidase cleavage sites in mitochondrial targeting peptides, *Proteins* 30 (1998) 49-60.
- [67] A. Schulze, M. Lindner, D. Kohlmüller, K. Olgemöller, E. Mayatepek, and G. F. Hoffmann, Expanded newborn screening for inborn errors of metabolism by electrospray ionization-tandem mass spectrometry: results, outcome, and implications, *Pediatrics* 111 (2003) 1399-1406.
- [68] S. C. Stadler, R. Polanetz, S. Meier, P. U. Mayerhofer, J. M. Herrmann, K. Anslinger, A. A. Roscher, W. Röschinger, and A. Holzinger, Mitochondrial targeting signals and mature peptides of 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase, *Biochem Biophys Res Commun* 334 (2005) 939-946.
- [69] C. Steen, E. R. Baumgartner, M. Duran, W. Lehnert, T. Suormala, S. R. Fingerhut, M. Stehn, and A. Kohlschütter, Metabolic stroke in isolated 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency, *Eur J Pediatr* 158 (1999) 730-733.
- [70] M. Y. Tsai, D. D. Johnson, L. Sweetman, and S. A. Berry, Two siblings with biotin-resistant 3-methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency, *J Pediatr* 115 (1989) 110-113.
- [71] M. Tuchman, S. A. Berry, L. P. Thuy, and W. L. Nyhan, Partial methylcrotonyl-coenzyme A carboxylase deficiency in an infant with failure to thrive, gastrointestinal dysfunction, and hypertonia, *Pediatrics* 91 (1993) 664-666.
- [72] J. L. van Hove, S. L. Rutledge, M. A. Nada, S. G. Kahler, and D. S. Millington, 3-Hydroxyisovalerylcarnitine in 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency, *J Inherit Metab Dis* 18 (1995) 592-601.
- [73] G. Visser, T. Suormala, G. P. Smit, D. J. Reijngoud, M. T. Bink-Boelkens, K. E. Niezen-Koning, and E. R. Baumgartner, 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with cardiomyopathy, in her brother with developmental delay and in their asymptomatic father, *Eur J Pediatr* 159 (2000) 901-904.
- [74] G. von Heijne, Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices, *Embo J* 5 (1986) 1335-1342.
- [75] X. Wang, E. S. Wurtele, G. Keller, A. L. McKean, and B. J. Nikolau, Molecular cloning of cDNAs and genes coding for beta-methylcrotonyl-CoA carboxylase of tomato, *J Biol Chem* 269 (1994) 11760-11768.

- [76] U. N. Wiesmann, T. Suormala, J. Pfenninger, and E. R. Baumgartner, Partial 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency in an infant with fatal outcome due to progressive respiratory failure, *Eur J Pediatr* 157 (1998) 225-229.
- [77] B. Wilcken, V. Wiley, J. Hammond, and K. Carpenter, Screening newborns for inborn errors of metabolism by tandem mass spectrometry, *N Engl J Med* 348 (2003) 2304-2312.
- [78] S. Yap, A. A. Monavari, P. Thornton, and E. Naughten, Late-infantile 3-methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency presenting as global developmental delay, *J Inherit Metab Dis* 21 (1998) 175-176.
- [79] T. H. Zytковicz, E. F. Fitzgerald, D. Marsden, C. A. Larson, V. E. Shih, D. M. Johnson, A. W. Strauss, A. M. Comeau, R. B. Eaton, and G. F. Grady, Tandem mass spectrometric analysis for amino, organic, and fatty acid disorders in newborn dried blood spots: a two-year summary from the New England Newborn Screening Program, *Clin Chem* 47 (2001) 1945-1955.

## 8 Anhang

Primer	5' Sequenz 3'	AS
MCCA ATG forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> GCG GCG GCC TCT GCG GTG	1-7
MCCA III.1 Forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> AAG TAC ACA ACA GCC ACA G	39-45
MCCA IV.1 forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> GCG GTT TAT AGT GAG GCT G	77-83
MCCA IV.2 forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> CTC CCG AGC CTG CTC CTG CC	22-28

**Tabelle 8.1** Forward-Primer für die Erstellung von *MCCA*-Konstrukten. Die Primer sind in Elongationsrichtung der Polymerase 5'-3' angegeben. AS bezeichnet die Positionen der Aminosäuren, die im Primer enthalten sind. Die Restriktionsschnittstelle für *EcoR* I ist unterstrichen. Das **Startcodon** ATG ist fett gedruckt.

Primer	5' Sequenz 3'	AS
MCCA GCG rev. Bam	TG <u>GAT CCG</u> CCA CAG TCT GTA CAC CCA G	71-77
MCCA II.2 rev. Bam	CG <u>GAT CCA</u> TGG TTC TTT GCC TCC ACA C	33-39
MCCA II.3 rev. Bam	TG <u>GAT CCC</u> TGC AGG CAA TTT CTC CTC	57-63
MCCA END rev. Bam	TG <u>GAT CCG</u> CTT CCG ATT CCC TTT TGT CTG ATT C	718-725
MCCA III.2 rev. Bam	TG <u>GAT CCG</u> GCG GCA GGA GCA GGC TCG G	23-29
MCCA V.1 rev. Bam	TG <u>GAT CCC</u> ACA CCC ATG TCC TCG GCG GCA GG	27-34

**Tabelle 8.2** Reverse-Primer für die Erstellung von *MCCA*-Konstrukten. Die Primer sind in Elongationsrichtung der Polymerase 5'-3' angegeben. AS bezeichnet die Positionen der Aminosäuren, die im Primer enthalten sind. Die Restriktionsschnittstelle für *BamH* I ist unterstrichen.

Primer	5' Sequenz 3'	AS
MCCB ATG forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> TGG GCC GTC CTG AGG TTA G	1-8
MCCB IV.1. forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> CCC GCC GGG CCG CGC GCC	17-22
MCCB V.1 Forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> GAG AAC TAC AAG CAG ATG AAA GCA C	44-51

**Tabelle 8.3** Forward-Primer für die Erstellung von *MCCB*-Konstrukten. Die Primer sind in Elongationsrichtung der Polymerase 5'-3' angegeben. AS bezeichnet die Positionen der Aminosäuren, die im Primer enthalten sind. Die Restriktionsschnittstelle für *EcoR* I ist unterstrichen. Das **Startcodon** ATG ist fett gedruckt.

Primer	5' Sequenz 3'	AS
MCCB GAG rev. Bam	<u>CG GAT CCT</u> CCT GGT AGA GGG CAG AGC C	38-44
MCCB II.2 rev. Bam	<u>AG GAT CCG</u> GCC CGG CGG GAG AGG CGC	14-20
MCCB END rev. Bam	<u>TG GAT CCG</u> CCA TCC TGA AGA TAC CGA AGT CAG	556-563
MCCB IV.2 rev. Bam	<u>AG GAT CCG</u> CAC ACG GCC GCA GGG CTA AC	7-12

**Tabelle 8.4** Reverse-Primer für die Erstellung von MCCB-Konstrukten. Die Primer sind in Elongationsrichtung der Polymerase 5'-3' angegeben. AS bezeichnet die Positionen der Aminosäuren, die im Primer enthalten sind. Die Restriktionsschnittstelle für *Bam*H I ist unterstrichen.

Primer	5' Sequenz 3'	Mutation	AS
sdm MCCA I.1 forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> GCG GCG GCC TCT GCG GTG TCG GTG CTG CTG GTG GCG GCG GAG CAG AAC CAG TGG CAT CAG CTC CCG AGC CTG CTC CTG CCG CCG CAG ACA TGG	16R→16Q 18R→18Q 21R→21Q 30R→30Q	1-32
sdm MCCA I.2 forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> GCG GCG GCC TCT GCG GTG TCG GTG CTG CTG GTG GCG GCG GAG CAG AAC CAG TGC ATC GTC TCC CGA GC	16R→16Q 18R→18Q	1-23

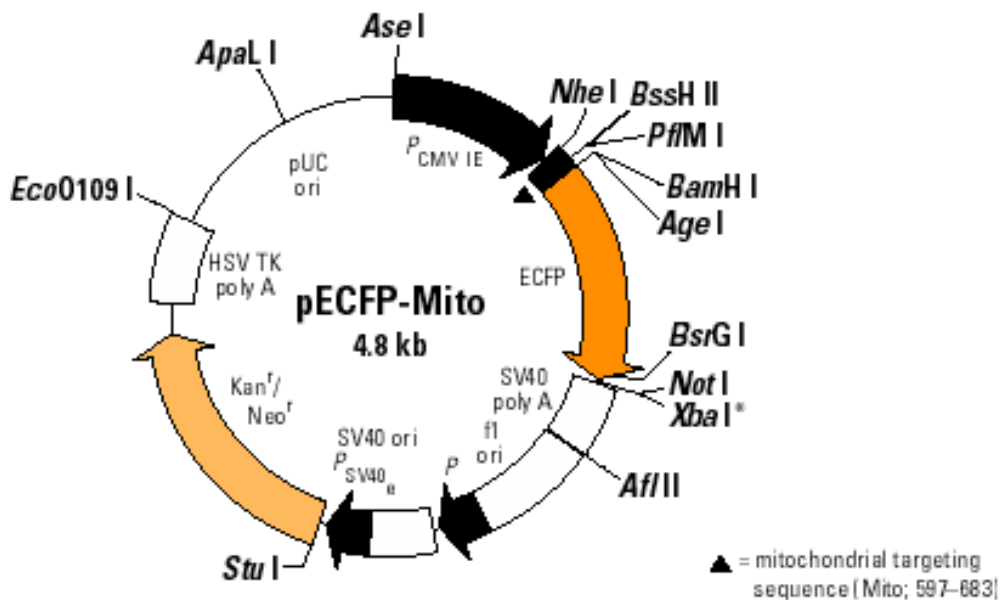
**Tabelle 8.5** Forward-Primer für die Erstellung von MCCA-Mutageneseonstrukten. Die Primer sind in Elongationsrichtung der Polymerase 5'-3' angegeben. Unter Mutation sind die Positionen der Argininreste (R) angegeben, deren Nukleotidsequenz zugunsten Glutamin (Q) geändert wurde. AS bezeichnet die Positionen der Aminosäuren, die im Primer enthalten sind. Die Restriktionsschnittstelle für *Eco*R I ist unterstrichen. Das **Startcodon** ATG ist fett gedruckt. Die *veränderte Nukleotidsequenz* für Glutamin ist kursiv dargestellt.

Name	5' Sequenz 3'	Mutation	AS
sdm MCCB I.1. forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> TGG GCC GTC CTG CAG TTA GCC CTG CAG CCG TGT GCC	6R→6Q 10R→10Q	1-13
sdm MCCB I.3. rev. Bam	<u>AG GAT CCG</u> GCC CGG CGG GAG AGG CCT GGG CAC ACG G	14R→14Q	11-20
sdm MCCB II.1 forw. Eco	CG <u>GAA TTC</u> <b>ATG</b> TGG GCC GTC CTG CAG TTA GCC	6R→6Q	1-8

**Tabelle 8.6** Forward- und Reverse-Primer für die Erstellung von MCCA-Mutageneseonstrukten. Die Primer sind in Elongationsrichtung der Polymerase 5'-3' angegeben. Unter Mutation sind die Positionen der Argininreste (R) angegeben, deren Nukleotidsequenz zugunsten Glutamin (Q) geändert wurde. AS bezeichnet die Positionen der Aminosäuren, die im Primer enthalten sind. Die Restriktionsschnittstellen für *Eco*R I und *Bam*H I ist unterstrichen. Das **Startcodon** ATG ist fett gedruckt. Die *veränderte Nukleotidsequenz* für Glutamin ist kursiv dargestellt.

Name	5' Sequenz 3'
EXFP Vektor rev	CTCGACCAGGATGGGCACCACCCC
MCCA 5 for	GGGACGCAGCTGCCTCTGTAC
MCCA 3 rev	AGAGAGAAGACACTACTTAACTGG
MCCA 152 for	GGTCCTCATTGCAAACAGAGG
MCCA 360 for	GCTGCACAGGCTATCCATCC
MCCA 1019 rev	CATGGAGATGAATACAAGGCTG
MCCA 1258 rev	CCACCAGGATTGAAACTGGAGT
MCCA 1372 for	ACAATATTGTTGGACTGCACACC
MCCA 1649 for	CAGAAACATGACTCTTAAAGATGG
MCCB 5 for	ACCGGCTCCAGGCCAGCGTGG
MCCB 3 rev	GGCTACTACATGTGTTAATTTTCAG
MCCB 467 for	CCAAGAAATGCCATGCAAACAG
MCCB 577 rev	CGGCCAAAGTGGTCTCGATCTGG
MCCB 858 for	TTAGCTAGCAAGGTTGTGAGG
MCCB 965 rev	AACTATTCCATACAATTCATCAGC
MCCB 1252 for	AAGGAATTGCCAAGGATGGTGC
MCCB 1369 rev	CTGCCACACATCCCATAGTTTCC

**Tabelle 8.7** Oligonukleotide, die zur Sequenzierung verwendet wurden. Die Primernamen geben die Position der ersten Base an, die an den komplementären Strang bindet. Die Primer wurden von Dr. Florian Lagler generiert.



**Abbildung 8.1** Vereinfachte Vektorkarte des pECFP-mito Vektors. Am N-Terminus von CFP (hier dunkelorange dargestellt) befindet sich ein mitochondriales Signalpeptid (▲).



**9 Abkürzungsverzeichnis**

3-HIVA-C	3-Hydroxyisovaleryl-Carnitin
ACC	Acetyl-CoA-Carboxylase
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-Triphosphat
ADP	Adenosin-Diphosphat
Bp	Basenpaare
CFP	Cyan fluorescent protein
CIP	Calf intestine phosphatase
C-terminal	Carboxyterminal
cDNA	Copy-DNA
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
GFP	Green fluorescent protein
Hsp70	Heat shock protein 70
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MCC	3-Methylcrotonyl-CoA-Carboxylase
MCC $\alpha$	$\alpha$ -Untereinheit der MCC
MCC $\beta$	$\beta$ -Untereinheit der MCC
MCCA	Gen der $\alpha$ -Untereinheit
MCCB	Gen der $\beta$ -Untereinheit
MCS	Multiple cloning site
MIP	Mitochondrial intermediate peptidase
MPP	Mitochondrial processing peptidase
MSF	Mitochondrial import stimulating factor
NGS	Neugeborenen-Screening
N-terminal	Aminoterminal
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
Q	Einbuchstabencode für Glutamin
PCC	Propionyl-CoA-Carboxylase
PC	Pyruvat-Carboxylase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEI	Polyethylenimin
R	Einbuchstabencode für Arginin
TIM	Translocase of the inner membrane
TOM	Translocase of the outer membrane
YFP	Yellow fluorescent protein

## 10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. D. Reinhardt für die Möglichkeit an seiner Klinik promovieren zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. A. A. Roscher danke ich für die Gelegenheit ein Thema aus dem Bereich der pädiatrischen Stoffwechselmedizin wählen zu können und für die stete Diskussionsbereitschaft und das Interesse an meiner Arbeit.

Ich möchte meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Andreas Holzinger für sein großes Engagement, seine Betreuung und seine stets hilfreiche Beratung danken. Er hat bei mir das Interesse für die Molekularbiologie geweckt und mich an die molekularbiologischen Techniken herangeführt.

Ebenso möchte ich Herrn PD Dr. Wulf Röschinger danken, der mich stets mit seinem metabolischen und pädiatrischen Wissen unterstützt hat.

Mein besonderer Dank gilt Frau PD Dr. Ania Muntau. Ihrem Engagement habe ich es zu verdanken, dass ich in diese Arbeitsgruppe gefunden habe. Darüber hinaus hat ihre Hilfsbereitschaft und Förderung meinen Werdegang in vielerlei Hinsicht wesentlich beeinflusst. In besonderem Maße hat Sonja Stadler Anteil an dieser Arbeit: Vielen Dank für die fortwährende Unterstützung, sei es beispielsweise bei unendlichen Transfektionsversuchen, Verbesserung rudimentärer Publikationstexte oder bei der Zurücklegung unzähliger Kilometer zwischen bakteriologischem Labor und der Kieferklinik.

Danken möchte ich auch Sylvia Heidenreich und Dr. Peter Mayerhofer für deren Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Werner Hattensperger aussprechen. Er hat mir während der ganzen Jahre immer wieder den wesentlichen Aspekt des Arztberufes vor Augen geführt, die Interaktion mit Patienten, und so meine klinische Erfahrung und Entwicklung beeinflusst.

Zuletzt gilt meine Dankbarkeit meiner Familie, im Besonderen meinen Eltern. Es ist schwer zu formulieren, was ihr an Unterstützung und Geduld für mich aufgebracht habt. Vielen Dank!

## 11 Publikationen

Landgraf P., Mayerhofer P. U., Polanetz R., Roscher A. A., Holzinger, A.  
Targeting of the human adrenoleukodystrophy protein to the peroxisomal membrane by  
an internal region containing a highly conserved motif  
*European Journal of Cell Biology* 2003, 82: 401-410

Stadler S. C., Polanetz R., Meier S., Mayerhofer P. U., Herrmann J. M., Anslinger K.,  
Roscher A. A., Röschinger W., Holzinger A.  
Mitochondrial targeting signals and mature peptides of 3-methylcrotonyl-CoA  
carboxylase  
*Biochemical Biophysical Research Communications* 2005, 304: 939-946

**12 Lebenslauf**

Name: Roman Hannes Polanetz

Geboren: 17. Juli 1977 in München

Schulbildung: 1984-1988 Grundschule an der südlichen Auffahrtsallee in München  
1988-1997 Käthe-Kollwitz-Gymnasium in München

Zivildienst: 1997-1998 Rettungsdienst des Arbeiter-Samariter-Bund in München

Studium: 1998-2004 Studium der Humanmedizin an der  
Ludwig-Maximilians-Universität in München

2004-2005 Praktisches Jahr  
Chirurgie:  
King Edward Hospital, University of Kwazulu-Natal,  
Durban, Südafrika  
Innere Medizin:  
Tulane University Medical Center, New Orleans, USA  
Pädiatrie:  
Dr. von Haunersches Kinderspital, LMU, München

April 2005 Ärztliche Prüfung (Gesamtnote: 1,83)