

Pflanzenproteomik

Mitochondriale Funktionen in Pflanzen

HANS-PETER BRAUN
INSTITUT FÜR PFLANZENGENETIK, LEIBNIZ UNIVERSITÄT HANNOVER

Proteomprojekte wurden initiiert, um systematisch nach bisher unbekannt mitochondrialen Funktionen in Pflanzen zu suchen. Auf der Basis dieser Projekte konnten interessante neue Einblicke in die Physiologie von Pflanzenmitochondrien gewonnen werden.

Proteome projects were initiated to systematically search for so far unknown mitochondrial functions in plants. Based on these projects, new insights into the physiology of these organelles were obtained.

Allgemeine mitochondriale Funktionen

Die Hauptfunktion der Mitochondrien ist die Bereitstellung von Adenosintriphosphat (ATP), das für den Ablauf zahlreicher biochemischer und physiologischer Prozesse in Zellen benötigt wird. Um dieser Funktion nachzukommen, importieren Mitochondrien Pyruvat aus dem Zytoplasma und oxidieren es nachfolgend durch die Enzyme des Citratzyklus zu CO_2 . Dabei abgezweigte Elektronen werden indirekt auf eine Elektronentransportkette in der inneren Mitochondrienmembran, die Atmungskette, übertragen. Diese transferiert die Elektronen nachfolgend auf molekularen Sauerstoff, der dabei zu Wasser reduziert wird, und nutzt die bei diesem Transport frei werdende Energie zum Aufbau eines Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran. Dieser chemi-osmotische Gradient kann schließlich vom mitochondrialen ATP-Synthasekomplex genutzt werden, um ADP zu ATP zu phosphorylieren. Da diese Form der ATP-Bildung mit einem Verbrauch an molekularem Sauerstoff gekoppelt ist, wird der gesamte Prozess auch als Oxidative Phosphorylierung oder Zellatmung bezeichnet.

Inzwischen ist jedoch bekannt, dass Mitochondrien neben der Oxidativen Phosphorylierung noch zahlreiche weitere Funktionen in der eukaryotischen Zelle ausführen, so z. B. den Abbau von Aminosäuren, die Biosynthese von prosthetischen Gruppen oder den

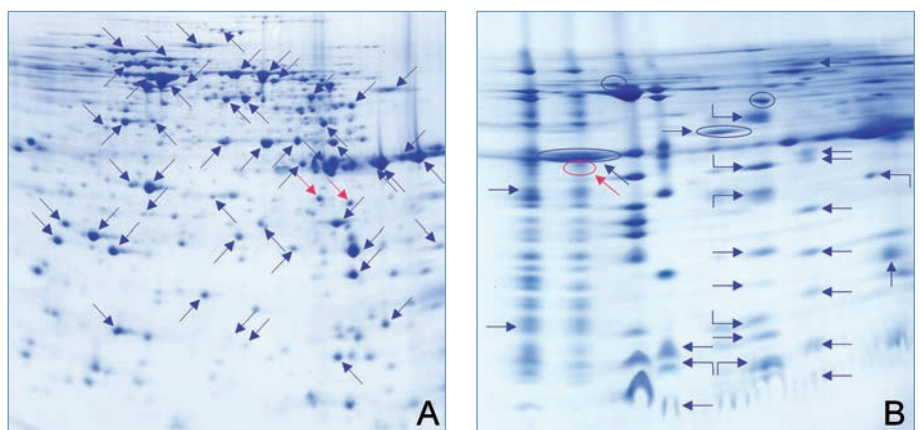
Zusammenbau von Eisen-Schwefel-Clustern, um nur einige wenige Beispiele zu nennen. Ferner wurde erst kürzlich gefunden, dass Mitochondrien eine Schlüsselrolle bei der Apoptose, dem programmierten Zelltod, spielen.

Mitochondriale Funktionen in Pflanzen

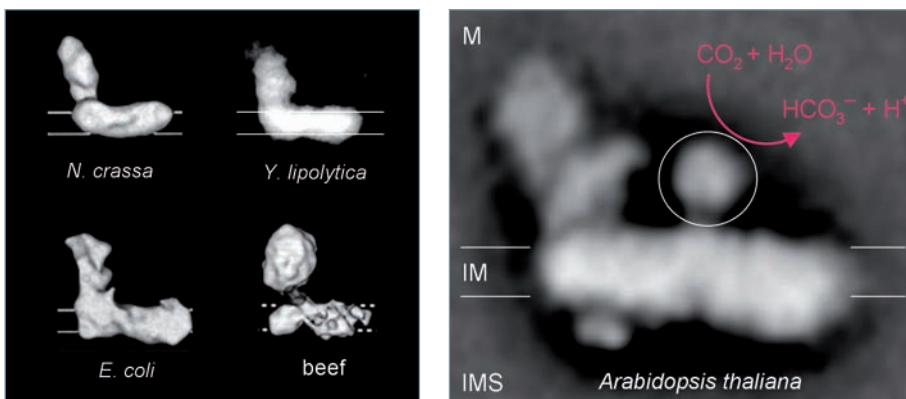
Die Mitochondrien pflanzlicher Zellen haben darüber hinaus eine ganze Reihe von Extrafunktionen, die teilweise in einer Beziehung

zur Photosynthese stehen. So ist die Atmungskette pflanzlicher Mitochondrien dafür verantwortlich, die Redoxbalance der Pflanzenzelle zu gewährleisten, indem überschüssige Reduktionsenergie schonend abgebaut wird. Für die Realisierung dieser Funktion gibt es alternative Atmungskettenenzyme, die am Elektronentransport der Atmungskette beteiligt sind, ohne zum Protonengradienten über die innere Mitochondrienmembran beizutragen.

Ferner sind pflanzliche Mitochondrien an der Photorespiration beteiligt. Im Zuge dieses Stoffwechselwegs wird, analog zur „normalen“ mitochondrialen Respiration (die in Pflanzen auch als Dunkelrespiration bezeichnet wird), O_2 verbraucht und CO_2 freigesetzt. Im Gegensatz zur Dunkelrespiration wird das O_2 jedoch nicht in den Mitochondrien, sondern in den Chloroplasten verbraucht. Ferner ist die Photorespiration, wie der Name dieses Stoffwechselwegs bereits impliziert, ein lichtabhängiger Prozess. Ausgangspunkt der Photorespiration ist die Oxygenase-Nebenaktivität des die CO_2 -Fixierung katalysierenden Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Car-



▲ **Abb. 1:** Zweidimensionale gelelektrophoretische Aufrennung der mitochondrialen Proteine aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*. **A**, Trennung der Proteine nach ihren isoelektrischen Punkten (horizontale Trennrichtung) bzw. ihrer molekularen Masse unter denaturierenden Bedingungen (vertikale Trennrichtung). **B**, Trennung der Proteine nach ihrer molekularen Masse unter nativen (horizontale Trennrichtung) bzw. unter denaturierenden Bedingungen (vertikale Trennrichtung). Blaue Pfeile markieren Proteine, die massenspektrometrisch identifiziert wurden, rote Pfeile markieren Carboanhydrasen.



▲ **Abb. 2:** Elektronenmikroskopische Aufnahmen des NADH-Dehydrogenasekomplexes (Komplex I) der Atmungskette aus verschiedenen Organismen. Der Komplex aus *Arabidopsis thaliana* zeichnet sich durch ein Zusatzmodul aus (weißer Kreis), der Carboanhydrasen enthält. M: mitochondriale Matrix; IM: innere Mitochondrienmembran; IMS: mitochondrialer Intermembranraum. Teilabbildungen aus www.scripps.edu/mem/biochem/CI/research.html, modifiziert.

boxylase/Oxygenase (Rubisco). Im Zuge dieser Nebenaktivität entsteht die C_2 -Verbindung Phosphoglykolat, die im Rahmen des Calvin-Zyklus nicht weiter umgesetzt werden kann. Die Photorespiration dient dem Recycling von Phosphoglykolat, indem zwei dieser C_2 -Verbindungen unter CO_2 -Freisetzung in die C_3 -Verbindung Phosphoglycerat umgewandelt werden. Ein entscheidender Schritt des Photorespirationswegs findet dabei in den Mitochondrien statt: die Umwandlung von zwei Molekülen Glycin zu einem Serin und CO_2 durch den Glycin-Dehydrogenasekomplex. Bemerkenswerterweise wird bei Pflanzen, die unter Starklichtkonditionen kultiviert werden, durch diesen Schritt, und nicht durch den Abbau von Pyruvat über den Citratzyklus, die Hauptmenge an CO_2 in den Mitochondrien freigesetzt.

Viele weitere Sonderfunktionen pflanzlicher Mitochondrien sind bekannt und werden in aktuellen Übersichtsartikeln dargestellt^[1].

Proteomanalysen zur Identifizierung mitochondrialer Funktionen in Pflanzen

Es wird vermutet, dass pflanzliche Mitochondrien noch an zahlreichen anderen Prozessen beteiligt sind. Daher wurden vor einigen Jahren Mitochondrienproteomprojekte initiiert, mit deren Hilfe systematisch bisher unbekannte mitochondriale Funktionen in Pflanzen aufgedeckt werden sollen^[2, 3]. Ausgangspunkt für diese Projekte, die sich zunächst auf die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* bezogen, war die Herstellung hochreiner Mitochondrienfraktionen. Nachfolgend wurden die Proteine dieser Fraktionen

mithilfe zweidimensionaler Gelelektrophoreseverfahren aufgetrennt (**Abb. 1**). Klassischerweise werden dafür Gel-Systeme verwendet, die in einer ersten horizontalen Dimension auf einer Auftrennung der Proteine nach ihrem isoelektrischen Punkt basieren und in einer zweiten Gel-Dimension auf einer Auftrennung nach der molekularen Masse (**Abb. 1A**). Mit diesem Verfahren können bis zu 600 mitochondriale Proteine aus *Arabidopsis thaliana* dargestellt werden^[2]. Alternativ kann auch in der ersten Gel-Dimension eine Auftrennung nach Größe erfolgen, allerdings unter nativen Konditionen, sodass Proteinkomplexe intakt bleiben. Dies ist beispielsweise mithilfe der Blau-nativen Gelelektrophorese möglich, die den Farbstoff Coomassie-Blau verwendet, um Proteinkomplexen eine einheitliche negative Ladung zu verleihen^[4]. Auf diese Weise können in einer ersten Gel-Dimension zunächst Proteinkomplexe getrennt werden, die durch Elektrophorese in einer zweiten Gel-Dimension unter denaturierenden Konditionen weiter in ihre Untereinheiten zerlegt werden. Auf den resultierenden Gelen bilden die Untereinheiten individueller Proteinkomplexe charakteristische vertikale Punktreihen (**Abb. 1B**).

Proteintrennungen auf der Basis beider Gel-Systeme wurden verwendet, um mithilfe massenspektrometrischer Verfahren systematisch neue mitochondriale Proteine in Pflanzen zu identifizieren. Ferner wurden in jüngster Zeit gelfreie Verfahren eingesetzt, um in noch größerem Maßstab neue Proteine aufzuspüren. Bis heute konnten über 400 Proteine beschrieben werden, die in Pflanzenmitochondrien vorkommen^[5]. Durch diese proteomischen

Untersuchungen konnten zahlreiche neue Funktionen für Pflanzenmitochondrien vorhergesagt werden, die zum Teil bereits experimentell verifiziert sind.

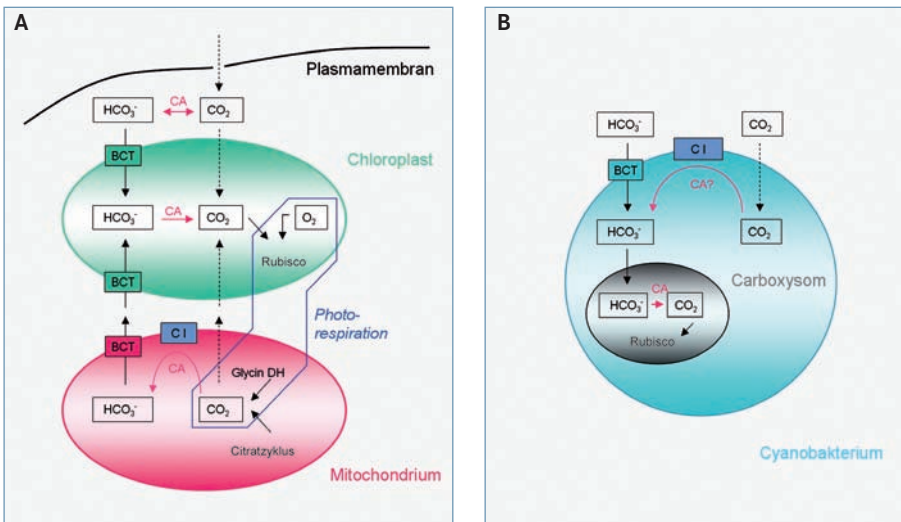
Fallstudie: Identifizierung mitochondrialer Carboanhydrasen

Mithilfe der beiden beschriebenen Gel-Systeme konnten erstmals Proteine für Mitochondrien beschrieben werden, die auf der Basis von Aminosäuresequenzvergleichen als Carboanhydrasen identifiziert wurden. Überraschenderweise kommen diese Proteine als Bestandteil des NADH-Dehydrogenasekomplexes der Atmungskette (Komplex I) vor. Carboanhydrasen katalysieren die Umwandlung von $CO_2 + H_2O$ zu Hydrogencarbonat ($HCO_3^- + H^+$) und sind zuvor für verschiedene Pflanzenkompartimente beschrieben worden, nicht jedoch für die Mitochondrien. In den Chloroplasten sind die Carboanhydrasen für die effiziente Versorgung von Rubisco mit CO_2 verantwortlich. Doch worin besteht die Funktion der Carboanhydrasen in den Mitochondrien?

Eine strukturelle Charakterisierung des mitochondrialen NADH-Dehydrogenasekomplexes aus *Arabidopsis* mittels *single particle*-Elektronenmikroskopie – einem Verfahren, bei dem zahlreiche Einzelaufnahmen eines gereinigten Proteinpartikels zu einer hochaufgelösten Durchschnittsstruktur verrechnet werden – ergab, dass die mitochondrialen Carboanhydrasen eine Extradomäne bilden, die auf der Matrix-exponierten Seite an den so genannten „Membranarm“ des Komplexes I fixiert ist^[6]. Diese hochcharakteristische Domäne ist nur in pflanzlichen Komplex-I-Strukturen sichtbar (**Abb. 2**).

Werden die Chloroplasten aktiv mit mitochondrialem CO_2 versorgt?

Genexpressionsstudien ergaben, dass die Gene, die für die mitochondrialen Carboanhydrasen codieren, vermindert transkribiert werden, sofern Pflanzen in Gegenwart von erhöhten CO_2 -Konzentrationen kultiviert werden. Dies ist auch für die Gene der Enzyme des Photorespirationswegs bekannt. Daher wird postuliert, dass die mitochondrialen Carboanhydrasen das im Zuge dieses Stoffwechselwegs gebildete CO_2 in Hydrogencarbonat umwandeln. Durch den stark basischen pH-Wert an der Matrix-exponierten Seite des Membranarms des Komplexes I liegt das Reaktionsgleichgewicht dieser Umwandlung stark auf der Hydrogencarbonat-Seite. Doch worin könnte der Vorteil die-



▲ **Abb. 3:** Modellhafte Darstellung der CO₂-Konzentrierungsmechanismen. **A**, in grünen Pflanzenzellen. **B**, in Cyanobakterien. In beiden Zelltypen basiert der Mechanismus auf (i) einer Umwandlung von CO₂ in Hydrogencarbonat (HCO₃⁻), (ii) einem anschließenden Transport in ein auf die CO₂-Fixierung spezialisiertes biochemisches Kompartiment (Pflanzenzellen: Chloroplast; Cyanobakterium: Carboxysom) und (iii) auf der Rückumwandlung von Hydrogencarbonat in CO₂. CI: Komplex I; CA: Carboanhydrasen; BCT: Hydrogencarbonattransporter; Glycine DH: Glycine-Dehydrogenasekomplex.

ser Umwandlung für die Pflanzenzelle bestehen?

Einer Hypothese zufolge kann das CO₂ in Form von Hydrogencarbonat aktiv von den Mitochondrien in die Chloroplasten transportiert werden (**Fig. 3A**)^[7]. Anders als in tierischen Zellen ist das in den Mitochondrien gebildete CO₂ kein „Abfall“, sondern eine wichtige Ressource für die CO₂-Fixierung im Zuge des Calvin-Zyklus. Unter physiologischen Wachstumsbedingungen ist CO₂ oftmals limitierend für Pflanzenwachstum, speziell an trockenen bzw. heißen Standorten, an denen Pflanzen zum Schutz vor Wasserverlust ihre Spaltöffnungen schließen. Tatsächlich belegen physiologische Untersuchungen, dass das mitochondriale CO₂ eine wichtige interne CO₂-Quelle für die Photosynthese darstellt^[8]. Interessanterweise ähnelt dieser postulierte innerzelluläre CO₂-Transportmechanismus dem gut untersuchten CO₂-Konzentrierungsmechanismus der Cyanobakterien. Auch in Cyanobakterien wird CO₂ in Hydrogencarbonat umgewandelt, wofür ein spezieller cyanobakterieller Komplex I erforderlich ist (**Abb. 3B**).

Fazit

Proteomanalysen haben zur Entdeckung interessanter mitochondrialer Proteine in Pflanzen geführt. Auf der Basis dieser Untersuchungsstrategie konnten neue Funktionen für Pflanzenmitochondrien vorhergesagt werden, z. B. Carboanhydrasen, die bei der aktiven Versorgung der Photosynthese durch mitochondriales CO₂ eine Rolle spielen könnten. In der Zukunft müssen diese vorhergesagten neuen Funktionen pflanzlicher Mitochondrien weiter untersucht werden, um tiefere Einblicke in den Energiestoffwechsel der Pflanzenzelle zu erhalten.

AUTOR



Hans-Peter Braun

Jahrgang 1962. Physik- und Biologiestudium an der TU Berlin, der FU Berlin, der Duke University, NC, USA. 1993 Promotion am Institut für Genbiologische Forschung GmbH, Berlin. 1996 Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Leibniz-Universität Hannover. 1997 Habilitation. 2001 Lehrstuhlvertretung, Botanisches Institut, Universität Karlsruhe. Seit 2007 Professor für Pflanzenproteomik an der Universität Hannover.

Danksagung

Die Abteilung Pflanzenproteomik der Leibniz Universität Hannover wird durch eine DFG Heisenberg-Profeur gefördert. ■

Literatur

[1] Nunes-Nesi, A., Sulpice, R., Gibon, Y., Fernie, A. R. (2008): The enigmatic contribution of mitochondrial function in photosynthesis. *J. Exp. Bot.* 59: 1675–1684.
 [2] Kruff, V., Eubel, H., Werhahn, W., Jänsch, L., Braun, H. P. (2001): Proteomic approach to identify novel mitochondrial functions in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol.* 127: 1694–1710.
 [3] Millar, A. H., Sweetlove, L. J., Giegé, P., Leaver, C. J. (2001): Analysis of the *Arabidopsis* mitochondrial proteome. *Plant Physiol.* 127: 1711–1727.
 [4] Schagger, H., von Jagow, G. (1991): Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199: 223–231.
 [5] Millar, A. H., Heazlewood, L., Kristensen, B. K., Braun, H. P., Møller, I. M. (2005): The plant mitochondrial proteome. *Trends Plant Sci.* 10: 36–43.
 [6] Sunderhaus, S., Dudkina, N., Jänsch, L., Klodmann, J., Heinemeyer, J., Perales, M., Zabaleta, E., Boekema, E., Braun, H. P. (2006): Carbonic anhydrase subunits form a matrix-exposed domain attached to the membrane arm of mitochondrial complex I in plants. *J. Biol. Chem.* 281: 6482–6488.
 [7] Braun, H. P., Zabaleta, E. (2007): Carbonic anhydrase subunits of the mitochondrial NADH dehydrogenase complex (complex I) in plants. *Physiol. Plant.* 129: 114–122.
 [8] Riazunnisa, K., Padmavathi, L., Bauwe, H., Raghavendra, A. S. (2006): Markedly low requirement of added CO₂ for photosynthesis by mesophyll protoplasts of pea (*Pisum sativum*): possible roles of photorespiratory CO₂ and carbonic anhydrase. *Physiol. Plant.* 128: 763–772.

Korrespondenzadresse:

Prof. Dr. Hans-Peter Braun
 Abteilung Pflanzenproteomik
 Institut für Pflanzen-genetik
 Naturwissenschaftliche Fakultät
 Leibniz Universität Hannover
 Herrenhäuser Straße 2
 D-30419 Hannover
 Tel.: 0511-7622674
 Fax: 0511-7623608
 braun@genetik.uni-hannover.de
 www.gartenbau.uni-hannover.de/genetik/braun