

Koordination von Synthese und Membraninsertion
mitochondrialer
Translationsprodukte



Dissertation
zur Erlangung der Würde eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
der Fakultät für Biologie der
Ludwig-Maximilians-Universität München

Heike Bauerschmitt

aus Pegnitz

April 2008

Gutachter

1. Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Soll
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Schleicher

Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 und 4 der Promotionsordnung der Ludwig-Maximilians-Universität München vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert und Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig und ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 24. April 2008

.....
Unterschrift

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Mitochondrial kodierte Proteine in Hefe | 1 |
| 1.2 | Proteintranslation in Hefemitochondrien | 3 |
| 1.3 | Proteintranslation in Prokaryoten | 4 |
| 1.4 | Oxa1-vermittelte Proteininsertion | 8 |
| 1.5 | Insertion und Assemblierung von Membranproteinen in <i>E. coli</i> | 12 |
| 1.6 | Zielsetzung der Arbeit | 15 |
| 2 | Material und Methoden | 16 |
| 2.1 | Molekularbiologische Untersuchungsmethoden | 16 |
| 2.1.1 | Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> | 16 |
| 2.1.2 | Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR | 17 |
| 2.1.3 | Restriktionsverdau von DNA | 17 |
| 2.1.4 | Agarosegelelektrophorese | 18 |
| 2.1.5 | Ligation von DNA-Fragmenten | 18 |
| 2.1.6 | Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> Zellen | 18 |
| 2.1.6.1 | Elektrokompetente <i>E. coli</i> Zellen | 18 |
| 2.1.6.2 | Chemisch kompetente <i>E. coli</i> Zellen | 19 |
| 2.1.7 | Transformation von <i>E. coli</i> | 19 |
| 2.1.8 | Plasmide und Konstrukte | 19 |
| 2.1.8.1 | Klonierung von pGEM4-Guf1 | 20 |
| 2.1.8.2 | Klonierung von pYX132-Guf1 | 21 |
| 2.1.8.3 | Konstrukte für die Antikörperproduktion | 21 |
| 2.2 | Methoden der Hefekultur und -genetik | 22 |
| 2.2.1 | Verwendete Hefestämme | 22 |
| 2.2.2 | Kultur von <i>S. cerevisiae</i> | 22 |
| 2.2.3 | Wachstumsphänotypen in <i>S. cerevisiae</i> | 24 |
| 2.2.3.1 | Wachstum in Flüssigkultur | 24 |
| 2.2.3.2 | Tüpfeltest | 25 |
| 2.2.4 | Isolierung von genomischer DNA | 25 |
| 2.2.5 | Transformation von <i>S. cerevisiae</i> | 25 |
| 2.2.6 | Generation mutanter Hefestämme | 26 |
| 2.3 | Kultur von <i>N. crassa</i> | 27 |
| 2.3.1 | Verwendete Medien | 27 |
| 2.3.2 | Kultur von <i>N. crassa</i> | 28 |
| 2.4 | Zellbiologische Untersuchungsmethoden | 28 |
| 2.4.1 | Proteinextraktion aus <i>S. cerevisiae</i> | 28 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.4.2 | Subfraktionierung von Hefezellen | 29 |
| 2.4.3 | Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> | 29 |
| 2.4.4 | Isolierung von Mitochondrien aus <i>N. crassa</i> | 30 |
| 2.4.5 | Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen | 30 |
| 2.4.5.1 | Alkalische Extraktion | 30 |
| 2.4.5.2 | Denaturierende Extraktion | 31 |
| 2.4.5.3 | Mitoplasten und PK-Verdau | 31 |
| 2.4.6 | <i>In vitro</i> Import radioaktiv markierter Proteine | 31 |
| 2.4.7 | <i>In organello</i> Translation | 32 |
| 2.4.8 | Aggregation mitochondrialer Translationsprodukte | 32 |
| 2.4.9 | Isolierung von mitochondrialen Ribosomen | 33 |
| 2.4.10 | Bestimmung von Enzymaktivitäten | 34 |
| 2.4.10.1 | Malatdehydrogenase Aktivität | 34 |
| 2.4.10.2 | Cytochrom <i>c</i> -Reduktase Aktivität | 34 |
| 2.4.10.3 | Cytochrom <i>c</i> -Oxidase Aktivität | 35 |
| 2.5 | Proteinchemische Untersuchungsmethoden | 35 |
| 2.5.1 | Fällung von Proteinen mit TCA | 35 |
| 2.5.2 | Bestimmung von Proteinkonzentrationen | 35 |
| 2.5.3 | Expression und Reinigung rekombinanter Proteine | 36 |
| 2.5.4 | <i>in vitro</i> Synthese von Proteinen | 36 |
| 2.5.5 | Quervernetzung mitochondrialer Translationsprodukte | 37 |
| 2.5.6 | Immunfällung von Proteinen | 37 |
| 2.5.7 | Bindung von Oxa1 an gereinigte Ribosomen | 37 |
| 2.5.8 | SDS-PAGE | 38 |
| 2.5.9 | Coomassie-Blau-Färbung | 38 |
| 2.5.10 | Western Blotting | 39 |
| 2.5.11 | Autoradiographie und Densitometrie | 39 |
| 2.6 | Immunologische Untersuchungsmethoden | 39 |
| 2.6.1 | Herstellung polyklonaler Antikörper | 39 |
| 2.6.2 | Affinitätsreinigung von Antikörpern | 40 |
| 2.6.3 | Verwendete Antikörper | 40 |
| 2.6.4 | Immundekoration | 41 |
| 2.7 | Chemikalien und Verbrauchsmaterial | 42 |
| 2.8 | Geräte | 43 |
| 3 | Ergebnisse | 44 |
| 3.1 | Funktionelle Charakterisierung der GTPase Guf1 | 44 |
| 3.1.1 | Guf1 ist eine hochkonservierte GTPase | 44 |
| 3.1.2 | Guf1 ist in Mitochondrien lokalisiert | 46 |
| 3.1.3 | Guf1 ist ein membranständiges Matrixprotein | 48 |
| 3.1.4 | Wachstum unter suboptimalen Bedingungen | 50 |
| 3.1.5 | GTP-abhängige Bindung von Guf1 an mitochondriale Ribosomen | 52 |
| 3.1.6 | Guf1 beeinflusst die mitochondriale Translation | 54 |
| 3.1.7 | Anhäufung fehlerhafter Translationsprodukte in $\Delta guf1$ -Mitochondrien | 55 |
| 3.1.8 | Aktivität der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase in $\Delta guf1$ -Mitochondrien | 57 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 3.1.9 | Die Expression von Guf1 ist temperaturabhängig | 57 |
| 3.1.10 | Regulation der Guf1-Expression in Hefe | 59 |
| 3.1.11 | Insertion von Membranproteinen in $\Delta guf1$ -Mitochondrien . . | 60 |
| 3.1.12 | Synthetische Letalität von $\Delta guf1/oxa1\Delta C$ | 63 |
| 3.2 | Rekonstitution des Oxa1-Ribosomen-Komplexes | 64 |
| 3.2.1 | Reinigung von Oxa1-His6 | 64 |
| 3.2.2 | Reinigung mitochondrialer Ribosomen | 66 |
| 3.2.3 | Bindung von Oxa1-His6 an gereinigte Ribosomen | 70 |
| 4 | Diskussion | 73 |
| 4.1 | Charakterisierung der mitochondrialen GTPase Guf1 | 73 |
| 4.1.1 | Guf1 als optimierender Faktor der Translation | 73 |
| 4.1.2 | Die Bedeutung von Guf1 für die Translation unter suboptimalen Bedingungen | 75 |
| 4.1.3 | Die Bedeutung von Guf1 für die Produktion von Membranproteinen in Mitochondrien | 77 |
| 4.2 | Charakterisierung des Oxa1-Ribosomen-Komplexes | 80 |
| 4.2.1 | Die mitochondriale Translokase Oxa1 | 80 |
| 4.2.2 | Mitochondriale Ribosomen und ihre funktionelle Kopplung mit Oxa1 | 81 |
| 5 | Zusammenfassung | 84 |
| | Literaturverzeichnis | 86 |

Abbildungsverzeichnis

| | | |
|------|---|----|
| 1.1 | Mitochondrial kodierte Proteine in Hefe | 2 |
| 1.2 | Proteinelongation in <i>E. coli</i> | 7 |
| 1.3 | Bindung mitochondrialer Ribosomen an die Innenmembran | 10 |
| 3.1 | Strukturelle Domänen in LepA/Guf1-Proteinen | 46 |
| 3.2 | Stammbaum elongationsfaktorähnlicher GTPasen | 47 |
| 3.3 | Lokalisierung von Guf1 in Mitochondrien | 48 |
| 3.4 | Guf1 ist ein Matrixprotein | 49 |
| 3.5 | Guf1 ist mit der Innenmembran assoziiert. | 50 |
| 3.6 | Wachstum unter suboptimalen Bedingungen | 51 |
| 3.7 | Bindung von Guf1 an mitochondriale Ribosomen | 53 |
| 3.8 | Produktion mitochondrialer Proteine in Abhängigkeit von Guf1 | 54 |
| 3.9 | Aggregation mitochondrial kodierter Proteine | 56 |
| 3.10 | Aktivitäten mitochondrialer Enzymkomplexe | 57 |
| 3.11 | Temperaturabhängige Expression von Guf1 | 58 |
| 3.12 | Promotorregion von Guf1 | 59 |
| 3.13 | Expression von Guf1 in <i>S. cerevisiae</i> | 60 |
| 3.14 | Insertion mitochondrial kodierter Proteine in die Innenmembran | 61 |
| 3.15 | Interaktion von Oxa1 mit naszierenden Ketten | 62 |
| 3.16 | Synthetische Letalität von $\Delta guf1/Oxa1\Delta C$ -Hefen | 63 |
| 3.17 | Reinigung von Oxa1-His6 aus <i>N. crassa</i> | 65 |
| 3.18 | Reinigung mitochondrialer Ribosomen - Immundekoration | 66 |
| 3.19 | Reinigung mitochondrialer Ribosomen aus <i>S. cerevisiae</i> | 68 |
| 3.20 | Reinigung mitochondrialer Ribosomen aus <i>N. crassa</i> | 69 |
| 3.21 | Bindung von Oxa1-His6 an isolierte Ribosomen <i>in vitro</i> | 71 |
| 4.1 | Modell für die kotranslationale Membraninsertion in Mitochondrien | 78 |

Tabellenverzeichnis

| | | |
|-----|--|----|
| 2.1 | Verwendete Plasmide und generierte Konstrukte | 20 |
| 2.2 | Verwendete Hefestämme | 23 |
| 2.3 | Medien für die Anzucht von Hefe | 24 |
| 2.4 | Verwendeter <i>N. crassa</i> -Stamm | 27 |
| 2.5 | Medien zur Anzucht von <i>N. crassa</i> | 28 |
| 2.6 | Puffer für die Isolierung mitochondrialer Ribosomen | 33 |
| 2.7 | Verwendete Antikörper und -seren | 41 |
| 3.1 | Nukleotidbindende Proteine unbekannter Funktion in Mitochondrien | 45 |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|---------------------------|---|
| Δ | Delta |
| β -Me | β -Mercaptoethanol |
| $\times g$ | Erdbeschleunigung |
| $^{\circ}C$ | Grad Celsius |
| μg | Mikrogramm |
| μl | Mikroliter |
| μm | Mikrometer |
| A | Absorption |
| <i>A. thaliana/A. th.</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| aa-tRNA | aminoacyl-tRNA |
| Abb. | Abbildung |
| AM | mitochondriale Außenmembran |
| Amp | Ampicillin |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| Aqua bidest. | Aqua bidestillata |
| ATP | Adenosin-tri-phosphat |
| bp | Basenpaare |
| BSA | <i>bovine serum albumine</i> = Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| C- | Carboxy- |
| ca. | circa |
| Ci | Curie |
| cm | Zentimeter |
| COX | Cytochrom <i>c</i> -Oxidase |
| CTP | Cytidin-tri-phosphat |
| D | Dextrose/Glukose |
| DDM | n-Dodecyl- β -D-maltosid |
| DMSO | Dimethylsulfoxid |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |
| <i>E. coli/E. c.</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EthBr | Ethidiumbromid |
| evtl. | eventuell |
| Fa. | Firma |
| FG | Feuchtgewicht |
| g | Gramm |

| | |
|------------------------|---|
| G/Gly | Glyzerin |
| Gal | Galaktose |
| GTP | Guanosin-tri-phosphat |
| GTPase | GTP-bindendes/hydrolysierendes Protein |
| h | Stunde |
| HA | Hämagglutinin |
| HCl | Salzsäure |
| HEPES | N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-(2-ethansulfonsäure) |
| His ₆ | 6× Histidin-tag |
| IgG | Immunglobulin G |
| IM | mitochondriale Innenmembran |
| IMR | mitochondrialer Intermembranraum |
| IPTG | Isopropyl-β, D-thio-galaktopyranosid |
| kDa | Kilodalton |
| Kryo-EM | Kryo-Elektronenmikroskopie |
| kV | Kilovolt |
| l | Liter |
| lac | Laktat |
| LB | Luria Bertani |
| LSU | <i>large subunit</i> = große Untereinheit |
| M | Molar |
| mA | Milliampère |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| mM | Millimolar |
| mm | Millimeter |
| mRNA | messenger-RNA |
| Mrp(1/s) | Mitochondriales ribosomales Protein (der großen/kleinen Untereinheit) |
| MS | Molekulargewichtsstandard |
| N- | Amino- |
| <i>N. crassa/N. c.</i> | <i>Neurospora crassa</i> |
| NiNTA | Nickel-nitrilotri-essigsäure |
| Nr. | Nummer |
| NTP | Nucleosid-tri-phosphat |
| OD ₆₀₀ | Optische Dichte (bei 600 nm) |
| ORF | <i>open reading frame</i> = offenes Leseraster |
| p. a. | <i>per analysi</i> = zur Analyse |
| P. i. | Präimmunserum |
| PAGE | Polyacrylamid-Gelelektrophorese |
| PAS | Protein A-Sepharose |
| PCR | <i>polymerase chain reaction</i> = Polymerasekettenreaktion |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration |
| PK | Proteinase K |
| Pkt. | Punkt |

| | |
|----------------------------|--|
| PMSF | Phenylmethyl-sulfonylchlorid |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| rpm | <i>rotations per minute</i> = Umdrehungen pro Minute |
| rRNA | ribosomale RNA |
| RT | Raumtemperatur |
| S | Svedberg |
| S-Medium | Selektivmedium (Minimalmedium) |
| S. | Seite |
| s. | siehe |
| <i>S. cerevisiae/S. c.</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| s. o. | siehe oben |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sec | Sekunde |
| SSU | <i>small subunit</i> = kleine Untereinheit |
| SU | <i>subunit</i> = Untereinheit |
| SW | osmotische Schwellung von Mitochondrien |
| Tab. | Tabelle |
| TAE | Tris-acetat-EDTA |
| TBS | <i>Tris-buffered saline</i> = Kochsalzlösung, trishaltig |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N, N, N', N'-Tetramethyldiamin |
| TPI | Triosephosphatisomerase |
| Tris | N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin |
| tRNA | transfer-RNA |
| TX | Triton-X 100 |
| U | <i>Units</i> (Einheit enzymatischer Aktivität) |
| ÜNK | Übernachtkultur |
| UTP | Uridin-tri-phosphat |
| UV | Ultraviolett |
| UZ | Ultrazentrifugation |
| V | Volt |
| v/v | Volumenprozent (Volumen/Volumen) |
| Vis | <i>visible light</i> = sichtbares Licht |
| W | Watt |
| w/v | Gewichtsprozent (Gewicht/Volumen) |
| wt | Wildtyp |
| YP-Medium | <i>yeast extract, bacteriological peptone</i> (Vollmedium) |
| z. B. | zum Beispiel |

Kapitel 1

Einleitung

Eukaryotische Organismen zeichnen sich durch die Abgrenzung verschiedener Kompartimente (Organellen) innerhalb ihrer Zellen aus. Diese Organellen verfügen, je nach Funktion und enthaltenen Stoffwechselprozessen, über eine spezielle Ausstattung an Proteinen. Ein Großteil dieser Proteine wird im Zytosol produziert und gelangt über spezifische Sortierungssignale zu den jeweiligen Bestimmungsorten. Mitochondrien verfügen darüberhinaus auch über ein eigenes Genom und eine Transkriptions-/Translationsmaschinerie, mit deren Hilfe sie selbstständig Proteine produzieren können.

1.1 Mitochondrial kodierte Proteine in Hefe

Phylogenetisch gehen Mitochondrien auf α -Proteobakterien zurück [46]. Sie besitzen, ähnlich wie ihre prokaryotischen Vorfahren, ein eigenes ringförmiges Genom. Das Genom der Mitochondrien wurde jedoch im Laufe der Evolution in seiner Größe stark reduziert (15 - 82 kb) und kodiert meist nur noch für die mitochondrialen tRNAs, die ribosomalen RNAs (rRNAs) und einige Proteine [20]. Die genaue Zahl der kodierten Proteine hängt vom jeweiligen Organismus ab. Während das humane mitochondriale Genom die Information für dreizehn Proteine enthält, sind es in Hefe nur acht [16]. Sieben dieser Proteine sind stark hydrophobe Membranproteine. Hierbei handelt es sich um die Untereinheiten Cox1, 2 und 3 der Cytochrom *c*-Oxidase, Cytochrom *b* der Cytochrom *c*-Reduktase und die Proteine Atp6, 8 und 9 der mitochondrialen F_1F_o -ATPase ([16]; vgl. Abb. 1.1). Alle diese Proteine sind Kernkomponenten mitochondrialer Atmungskettenkomplexe bzw. der F_1F_o -ATPase und müssen in die Innenmembran inseriert werden. Ihre Funktionalität und korrekte Assemblierung ist von essentieller Bedeutung für die Zellatmung und die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung.

Neben diesen sieben hydrophoben Membranproteinen ist als einziges Matrixprotein

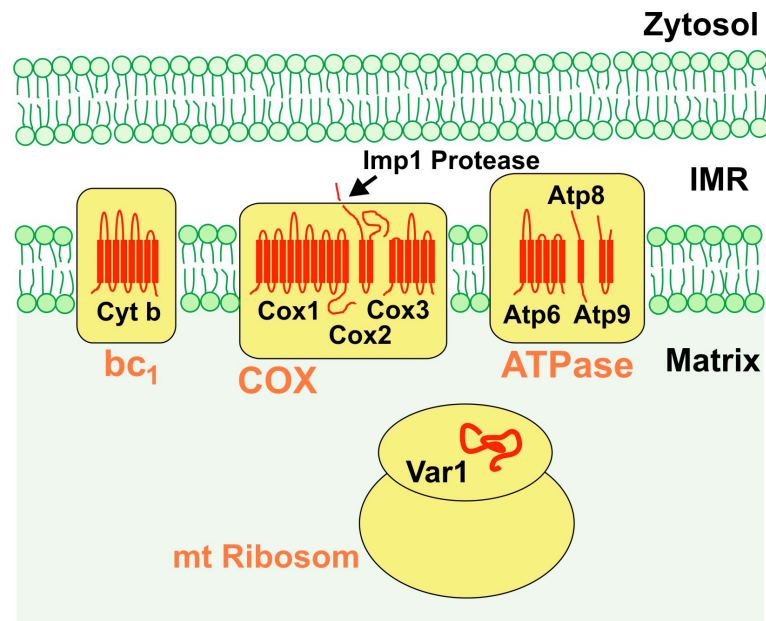


Abbildung 1.1: Mitochondrial kodierte Proteine in Hefe. Sieben der mitochondrial kodierte Proteine sind stark hydrophobe Membranproteine. Var1 ist als lösliches Protein Bestandteil der kleinen ribosomalen Untereinheit. IMR, Intermembranraum, Imp1, Inner membrane peptidase.

Var1 im mitochondrialen Hefegenom kodiert [16]. Hierbei handelt es sich um ein ribosomales Protein der kleinen Untereinheit, das in die Assemblierung der mitochondrialen Ribosomen involviert ist [138] [139].

Die Synthese der mitochondrial kodierte Proteine ist ein präzise regulierter Prozeß. Die Regulation erfolgt auf Ebene der Translation mit Hilfe sogenannter Translationsaktivatoren [33]. Hierbei handelt es sich um membranständige Proteine, die über Interaktion mit der 5'-untranslatierten Region der mRNA die Produktion der kodierte Proteine beeinflussen [92] [84] [117]. Gleichzeitig fördern diese Aktivatoren auch die Bindung der jeweiligen mRNAs an das Ribosom und gewährleisten so ihre effiziente Translation [48] [47] [68]. Die Interaktion der verschiedenen Aktivatoren ist spezifisch und abhängig von der jeweils translatierten mRNA [33].

Über diese direkten Mechanismen hinaus sind die Translationsaktivatoren in ein komplexes regulatorisches Netzwerk eingebunden, das die Synthese der verschiedenen mitochondrial kodierte Proteine koordiniert. Wie eine solche koordinierte Proteinproduktion ablaufen könnte, wurde vor kurzem für die Untereinheiten 1, 2 und 3 der Cytochrom *c*-Oxidase vorgeschlagen [95] [105]. Die Translationsaktivatoren dieser Proteine binden nicht nur spezifisch an die jeweiligen mRNAs, sondern sie interagieren auch untereinander. Diese Interaktion gewährleistet eine koordinierte und

lokal begrenzte Synthese der drei COX-Untereinheiten. Dadurch wird eine effiziente Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase ermöglicht.

1.2 Proteintranslation in Hefemitochondrien

Die Translation mitochondrial kodierter Proteine erfolgt in Hefe an der Innenmembran. Bereits in den sechziger Jahren deuteten elektronenmikroskopische Untersuchungen auf eine Membranassoziation der mitochondrialen Ribosomen hin [149]. Dies konnte in den letzten Jahren durch biochemische Ansätze bestätigt werden. Die mitochondrial kodierten Proteine werden in koordinierter Weise an der inneren Membran synthetisiert [33], wodurch ihre kotranslationale Insertion ermöglicht wird ([137] [61]; s. auch Kapitel 1.4). Arbeiten mit einer chimären mRNA deuten darauf hin, daß selbst Var1 als einziges lösliches Protein an der Innenmembran gebildet wird [32].

Obwohl die Existenz des mitochondrialen Translationsapparates seit vielen Jahren bekannt ist, wurde dieser bisher nicht genauer charakterisiert. Ursache dafür ist das Fehlen eines funktionellen *in vitro* Translationsystems für mitochondriale Ribosomen, das trotz jahrelanger Forschung noch nicht etabliert werden konnte. Hinweise auf die Funktionsweise der mitochondrialen Translation ergaben sich ausschließlich durch die Charakterisierung einzelner Komponenten sowie Analysen *in vivo* und in isolierten Organellen (*in organello*).

In Hefe wurden in den letzten Jahrzehnten die meisten der an der mitochondrialen Translation beteiligten Proteine identifiziert. Zu diesen gehören der Initiationsfaktor IF-2 (kodiert von *IFM1*) [147] [43], die Elongationsfaktoren mEF-Tu (*TUF1*) [94] [119], mEF-G 1 und 2 (*MEF1* [147] und *MEF2* [116]), der Terminationsfaktor mRF-1 (*MRF1*) [104] und der mitochondriale recycling Faktor RRF (*RRF1*) [140]. Alle diese Proteine besitzen Homologe in Bakterien und im Zytosol von Eukaryoten und sind zum Teil sehr stark konserviert. Die Ähnlichkeit dieser Faktoren zu den bakteriellen Komponenten wurde vor allem in Arbeiten mit *in vitro* Translationsystemen deutlich, in welchen die funktionelle Austauschbarkeit von prokaryotischen und mitochondrialen Translationsfaktoren gezeigt werden konnte. Ein Austausch zytosolischer Faktoren gegen mitochondriale war dagegen nicht möglich [119] [43].

Neben diesen unterstützenden Faktoren spielen mitochondriale Ribosomen die zentrale Rolle in der mitochondrieneigenen Proteinsynthese. Diese sind membranassoziiert und bestehen aus zwei Untereinheiten. Die Untereinheiten setzen sich aus zwei RNA-Molekülen (rRNA) und aus einer Vielzahl ribosomaler Proteine zusammen. Obwohl alle mitochondrialen Ribosomen auf ein ursprüngliches prokaryotisches Ri-

bosom zurückgehen, weisen sie eine erstaunliche Heterogenität auf [133]. Je nach Organismus haben sie eine Masse von 2,5 bis 3,6 MDa [133] und sedimentieren mit Koeffizienten zwischen 55S und 80S [66]. Mitochondriale Ribosomen aus Hefe und aus dem roten Brotschimmelpilz *Neurospora crassa* weisen Koeffizienten von 72S [40] bzw. 73S [86] auf und gleichen damit *E. coli* 70S Ribosomen (s. auch Kapitel 1.3). Im Gegensatz zu prokaryotischen Ribosomen enthalten mitochondriale Ribosomen nur zwei ribosomale RNAs. Im roten Brotschimmelpilz *N. crassa* sind dies eine 16S rRNA in der kleinen Untereinheit und eine 23S rRNA in der großen Untereinheit [86]. Im Fall von Hefe handelt es sich um eine 15S rRNA und eine 21S rRNA [66]. Letztere sind gegenüber den entsprechenden rRNAs in *E. coli* (23S, 16S) verkürzt. Ein der 5S rRNA aus *E. coli* entsprechendes Äquivalent fehlt in den mitochondrialen Ribosomen.

Neben diesen Abweichungen in der Größe und Zahl der ribosomalen RNAs unterscheiden sich mitochondriale Ribosomen auch in ihrem Proteingehalt deutlich voneinander und auch von prokaryotischen Ribosomen [133]. Generell zeichnen sie sich durch eine mehr oder weniger große Zahl an Proteinen aus, die keine bakteriellen Vorläufer haben [133] [39] [40]. So wurden beispielsweise in Hefe bisher 81 mitoribosomale Proteine identifiziert (37 in der kleinen Untereinheit, 44 in der großen; [133]). Mehr als 20 davon haben kein bakterielles Homolog. Darüberhinaus sind viele mitoribosomale Proteine prokaryotischen Ursprungs deutlich größer als die zu ihnen homologen Proteine in Bakterien. Sie verfügen zusätzlich über mehr oder weniger große Domänen, die im Laufe der Evolution C- bzw. N-terminal an die ursprünglichen Proteine angehängt wurden [132] [133]. Der Reduktion mitochondrialer rRNAs steht somit eine drastische Erhöhung des Proteingehalts gegenüber.

Wie schon zuvor erwähnt, konnte für den mitochondrialen Translationsapparat bislang kein funktionelles *in vitro* System etabliert werden. Der Ablauf der Translation und die genaue Funktionsweise der mitochondrialen Translationsmaschinerie sind daher nicht geklärt. Hinweise darauf ergaben sich hauptsächlich aus der Charakterisierung beteiligter Faktoren und der funktionellen Verwandtschaft zum prokaryotischen System. Dieses kann stellvertretend als Modellsystem herangezogen werden und wird ausführlicher in Kapitel 1.3 beschrieben.

1.3 Proteintranslation in Prokaryoten

Die Synthese von Proteinen ist ein Prozeß, der seit Jahrzehnten im Zentrum biologischer Forschung steht. Das bis heute am besten charakterisierte Translationsystem ist das in Bakterien. Der Grundstein für das heutige Wissen und molekulare Verständnis dieses Apparates wurde bereits 1961 durch die erfolgreiche Entwicklung

eines *in vitro* Translationssystems mit gereinigten Komponenten gelegt [99]. Dieses System und die damit verbundenen Möglichkeiten führten in den folgenden Jahren zur Identifizierung von vielen an der Translation beteiligten Faktoren und zur Charakterisierung des Translationsprozesses an sich.

Prokaryotische Ribosomen bestehen, ebenso wie mitochondriale, aus zwei Untereinheiten, einer großen (50S) und einer kleinen (30S) [128] [130]. Diese sind über verschiedene RNA-’Brücken’ miteinander verbunden [156]. Durch die Zusammenlagerung der beiden Untereinheiten bilden die Ribosomen drei Bindestellen für tRNAs aus: Die A(Aminoacyl)-Stelle, die P(Peptidyl)-Stelle und die E(Exit)-Stelle ([34]; vgl. Abb. 1.2). Diese unterscheiden sich sowohl in ihrer Funktion als auch im Status ihrer Besetzung mit tRNAs während der Translation (Details s. ausführliche Beschreibung des Translationsprozesses).

Während es sich bei der Brückenbildung und der Schaffung von tRNA-Bindestellen um Eigenschaften handelt, die von beiden Untereinheiten getragen werden, sind andere Funktionen mit den einzelnen Untereinheiten assoziiert. So befindet sich beispielsweise der Tunnel für wachsende Aminosäureketten und auch das Zentrum für die Knüpfung von Peptidbindungen in der großen Untereinheit [3]. Die Region für die Codon-Anticodon-Erkennung dagegen ist in der 30S-Untereinheit lokalisiert [24].

Die Translation von Proteinen wird im Allgemeinen in drei Schritte unterteilt:

- Initiation
- Elongation
- Termination und Recycling

Alle drei Phasen sind gekennzeichnet durch für sie typische biochemische Reaktionen und die daran beteiligten Faktoren (zur Übersicht s. [115]). Viele dieser Faktoren sind GTP-bindende und hydrolysierende Proteine (GTPasen) [82] [17]. Die Hydrolyse von GTP und damit die Bereitstellung von Energie für einzelne Teilprozesse gewährleistet die Unidirektionalität und auch die Qualität der Translation [98].

Initiation. Neben den ribosomalen Untereinheiten, der mRNA und der fMet-tRNA sind in *E. coli* drei Initiationsfaktoren (IF-1, IF-2·GTP und IF-3) an diesem Prozeß beteiligt. Die Initiationsfaktoren sorgen für eine korrekte Bindung der formylierten tRNA in die P-Stelle und gewährleisten zudem die Bildung eines stabilen Initiationskomplexes (Details s. [73]). Dieser besteht aus den beiden ribosomalen Untereinheiten, der mRNA und der fMet-tRNA in der P-Stelle. Stabilisiert wird der 70S Initiationskomplex durch die Codon-Anticodon-Interaktion zwischen der tRNA und dem Start-AUG der mRNA. Er ist der Ausgangspunkt für den Elongationsprozeß.

Elongation (s. Abb. 1.2). Die Elongation von Proteinen ist der Prozeß, der zeitlich den größten Teil der Translation in Anspruch nimmt. Er zeichnet sich durch die immer wiederkehrende Abfolge eines komplexen Zyklus aus, einer sogenannten Elongationsrunde. Getrieben wird die Elongation in *E. coli* im Wesentlichen von zwei Proteinen. Dies sind die Elongationsfaktoren Tu (EF-Tu) und EF-G. In beiden Fällen handelt es sich, wie auch bei IF-2, um GTP bindende und hydrolysierende Proteine. In gereinigten *in vitro* Systemen sind beide Faktoren notwendig und zugleich hinreichend, um die Elongation voranzutreiben [99]. Zusätzlich existiert in *E. coli* noch ein weiterer Elongationsfaktor, EF-Ts. Dieser fungiert als Nukleotidaustauschfaktor für EF-Tu und gewährleistet dessen erneute Beladung mit GTP für nachfolgende Elongationszyklen [64] [26]. In Hefemitochondrien fehlt ein entsprechendes Homolog zu EF-Ts. Die erneute Beladung von EF-Tu mit GTP wird hier durch die höhere Affinität des Elongationsfaktors zu GTP gewährleistet [23].

Vom Ablauf her ist ein Elongationszyklus in zwei Teilschritte zerlegt. Dies ist zum einen die Anlagerung der aminosäurebeladenen tRNA (Aminoacyl-tRNA) in der A-Stelle des Ribosoms und zum anderen die Bewegung der gebundenen m- und tRNAs durch das Ribosom. Beide Schritte werden spezifisch durch die Elongationsfaktoren Tu bzw. G gesteuert. EF-Tu ist an der Erkennung und Verankerung der passenden tRNA beteiligt und bildet zu diesem Zweck zusammen mit GTP und der Aminoacyl-tRNA einen ternären Komplex aus. Dieser Komplex bindet zu Beginn einer neuen Elongationsrunde in die A-Stelle des Ribosoms. Sobald die tRNA als korrekt erkannt worden ist, erfolgt ihre Verankerung unter Hydrolyse von GTP und der Dissoziation von EF-Tu-GDP. Danach wird die Aminosäure in der A-Stelle mit der Peptidkette der P-Stellen tRNA verknüpft. Die Peptidkette wird dabei gleichzeitig auf die tRNA in der A-Stelle übertragen, so daß eine leere tRNA in der P-Stelle zurückbleibt (zur Übersicht s. [134] [101] [98]).

Um eine neue Elongationsrunde starten zu können, müssen sowohl die tRNAs als auch die mRNA im Ribosom um ein Basentriplett nach vorne gerutscht werden. Der als Translokation bezeichnete Vorgang ist sehr komplex und setzt sich aus mehreren Teilschritten zusammen. Wie die einzelnen Schritte zusammenhängen, ist noch nicht restlos verstanden. Verschiedenen Hinweisen zufolge könnte die Bewegung der RNAs durch das Ribosom jedoch in folgender Weise ablaufen: In einem ersten Schritt bindet der Faktor EF-G-GTP in die A-Stelle des Ribosoms und 'entriegelt' dieses durch die Hydrolyse von GTP [118]. Der als 'unlocking' bezeichnete Prozeß ermöglicht die Bewegung der beiden tRNAs durch das Ribosom [125]. Durch die Bindung des Elongationsfaktors erfolgt zugleich auch eine Rotation der 30S Untereinheit relativ zur 50S Untereinheit. Diese wird als 'ratchet-like movement' bezeichnet [35] [146]. Die Dissoziation von anorganischem Phosphat bewirkt weitere strukturelle Veränderungen, welche letztlich die 30S Untereinheit in ihre Ausgangsposition zurückbewe-

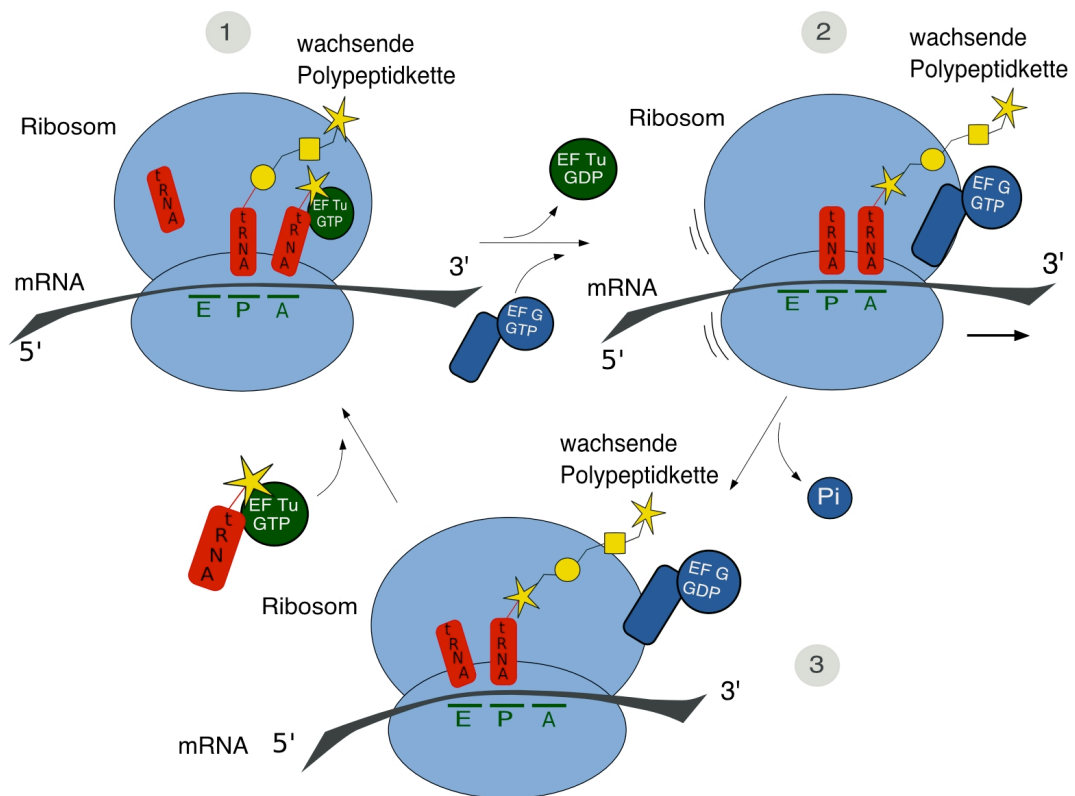


Abbildung 1.2: Ablauf der Proteinelongation in Prokaryoten. Beschreibung s. Text. EF-G/EF-Tu, Elongationsfaktoren G und Tu, A/P/E, tRNA-Bindestellen A (Aminoacyl-), P (Peptidyl-), E (Exit-) Stelle.

gen und zur Ablösung von EF-G·GDP führen [150]. Damit kehrt das Ribosom wieder in die geschlossene ('locked') Konformation zurück.

Nach Beendigung der Translokation befindet sich die leere tRNA in der E-Stelle, aus welcher sie dissoziieren kann. Die tRNA mit der gebundenen Peptidkette sitzt dagegen wieder in der P-Stelle. Die A-Stelle des Ribosoms ist unbesetzt, wodurch der Beginn eines neuen Elongationszyklus ermöglicht wird.

Obwohl in den letzten Jahren angenommen wurde, daß der Prozeß der Elongation nahezu fehlerfrei und mechanistisch perfekt abläuft, deuten jüngste Arbeiten darauf hin, daß dies nicht der Fall ist. Mit dem Protein LepA wurde kürzlich ein Faktor charakterisiert, der in die Optimierung des Prozesses involviert sein könnte [114]. Obwohl LepA als Protein schon jahrelang bekannt war, wurde es funktionell nie genauer untersucht. Qin *et al.* konnten kürzlich zeigen, daß es sich bei LepA vermutlich um einen neuen Elongationsfaktor handelt [114].

LepA ist eine hochkonservierte GTPase und besitzt Homologe in allen Organismen mit Ausnahme von Archaeobakterien [114] [82]. Strukturelle Vorhersagen ergaben eine starke Ähnlichkeit mit EF-G [81] [114], was eine Funktion während der Translokation

wahrscheinlich macht. Daß dies tatsächlich der Fall ist, konnte in verschiedenen *in vitro* Experimenten gezeigt werden. Mit gereinigten Komponenten wurde nicht nur die ribosomenabhängige GTPase-Aktivität von LepA nachgewiesen, sondern auch dessen Befähigung, Ribosomen entlang der mRNA rückwärts zu bewegen. LepA wirkt demnach EF-G während der Elongation entgegen. Eine Verdrängung von EF-G wurde von Qin *et al.* jedoch über die geringe Expressionsrate von LepA ausgeschlossen. Vielmehr schlugen die Autoren für LepA eine Rolle als Optimierungsfaktor vor, der, im Falle einer unvollständigen oder fehlerhaften Translokation, das Ribosom zurückbewegt und einen nochmaligen Translokationsversuch ermöglicht [114].

Unterstützt wurde diese Hypothese durch *in vitro* Expressionsexperimente mit GFP als Markerprotein. Die Anwesenheit von geringen Mengen LepA während der Translation erhöhte den Anteil an funktionellem GFP in den Proben [114]. Zudem wurde insgesamt mehr GFP produziert. Hohe Mengen an LepA dagegen brachten die Synthese von GFP vollständig zum Erliegen [114].

Obwohl diese Ergebnisse auf eine Rolle von LepA während der Elongation schließen lassen, sind einige Aspekte unklar: Warum ist LepA beispielsweise so hochkonserviert? Ein hohes Maß an Konservierung läßt eine wichtige Funktion vermuten. Die Deletion von LepA führt jedoch unter normalen Bedingungen zu keinerlei Wachstumsbeeinträchtigung [29] [114]. Unter welchen Bedingungen wird dessen Funktion essentiell? Ist LepA wichtig für die Produktion bestimmter Proteine? Das Gen für LepA ist auf demselben Operon wie das für die Leaderpeptidase kodiert [80]. Dies könnte auf eine Rolle bei der Produktion von Membranproteinen hinweisen.

Termination und Recycling. Die Termination der Proteinsynthese beginnt, sobald ein Stop-Codon in die A-Stelle gelangt. Dieses wird, je nach kodiertem Triplet, von den Faktoren RF-1 (Stop-Codons UAA; UAG) oder RF-2 (Stop-Codons UAA; UGA) erkannt (zur Übersicht s. [100]). Die Bindung einer der beiden Faktoren zieht die unmittelbare Abspaltung der Peptidkette von der P-Stellen tRNA nach sich [155], so daß das Ribosom mit gebundener tRNA, mRNA und RF1 bzw. 2 zurückbleibt. Die Dissoziation der RF erfolgt mit Hilfe der GTPase RF-3, welche die Ablösung von RF1/2 unter Hydrolyse von GTP vorantreibt [115]. Der so entstandene Postterminationskomplex wird mit Hilfe der Faktoren RRF und IF-3 in seine Untereinheiten zerlegt und durch Abspaltung der m- und tRNA für eine neue Translationsrunde 'recycelt' [106] [4] [41] [151].

1.4 Oxa1-vermittelte Proteininsertion in die mitochondriale Innenmembran

Wie bereits in Kapitel 1.1 geschildert wurde, kodiert das mitochondriale Genom in Hefe im Wesentlichen für stark hydrophobe Membranproteine ([16]; vgl. Abb. 1.1).

Diese neigen in wässrigem Milieu dazu, unspezifisch zu aggregieren. Um dies zu vermeiden, ist ihre Produktion unmittelbar mit der Insertion in die mitochondriale Innenmembran gekoppelt.

Im Zentrum des kotranslationalen Insertionsprozesses steht, neben dem mitochondrialen Ribosom, das Innenmembranprotein Oxa1. Dieses wurde ursprünglich als mitochondriales Protein identifiziert, dessen Deletion zu Defekten in der Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase und folglich zu einem Verlust der Zellatmung führt [6] [15].

Oxa1 ist in Hefe ein polytopes Membranprotein mit einer molekularen Masse von ca. 36 kDa [56]. Es durchspannt die innere Mitochondrienmembran fünf Mal, wobei der N-Terminus in den Intermembranraum ragt und der C-Terminus in die Matrix (N_{out} - C_{in} -Topologie) [56]. In der Membran bildet Oxa1 einen homooligomeren Komplex mit einer Größe von etwa 200-300 kDa aus [137]. Dieser wird vermutlich von vier Oxa1-Proteinen gebildet.

Sequenzanalysen ergaben, daß Oxa1 ein stark konserviertes Protein ist. Homologe fanden sich in Mitochondrien und Chloroplasten aller höheren Organismen [38] [135]. Auch in Bakterien wurden Homologe der Oxa1-Familie identifiziert [15] [122]. Bisherige Forschungsergebnisse weisen darauf hin, daß alle Mitglieder der Oxa1/Alb3/YidC-Familie ähnliche Funktionen besitzen [154]. Dies konnte durch verschiedene biochemische Untersuchungen und Komplementationstudien bestätigt werden [37] [113] [14] [13] [62].

Erste Erkenntnisse über die Funktion von Oxa1 lieferten vor einigen Jahren Arbeiten mit einer temperatursensitiven Mutante [6]. In dieser konnte die spezifische Akkumulation des mitochondrial kodierten Proteins Cox2 in seiner nichtmaturierten Form beobachtet werden. Cox2 wird in Hefe als Vorstufenprotein synthetisiert und besitzt in der Membran die Topologie N_{out} - C_{out} [55]. Unmittelbar nach Insertion seiner N-terminalen Transmembrandomäne in die innere Mitochondrienmembran wird Cox2 durch Abtrennung der ersten 15 Aminosäuren in seine reife Form überführt (vgl. auch Abb. 1.1). Weitere Analysen *in vivo* und *in vitro* zeigten, daß diese Akkumulation auf einen Defekt in einem frühen Schritt der Membraninsertion des Proteins zurückgeführt werden konnte [15].

In den folgenden Jahren wurde die Funktion der Translokase Oxa1 genauer charakterisiert. Obwohl ihr zunächst eine hauptsächliche Rolle im N-terminalen Export von Membranproteinen mit N_{out} -Topologie zugeschrieben worden war [51] [52] [53], konnte später gezeigt werden, daß auch die Insertion polytooper Membranproteine mit N_{in} -Topologie von Oxa1 abhängt [54]. In diesem Zusammenhang war für Oxa1 erstmals eine Rolle als generelle Insertase polytooper Membranproteine vorgeschlagen worden.

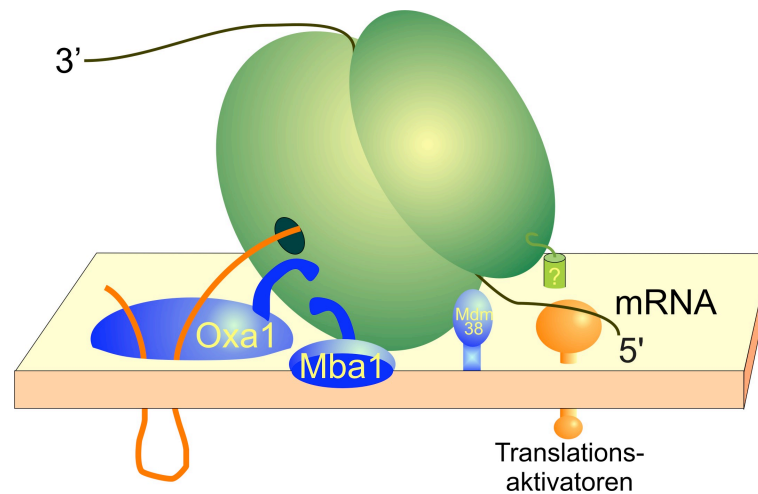


Abbildung 1.3: Modell für die Interaktion mitochondrialer Ribosomen mit Komponenten der inneren Mitochondrienmembran. Das mitochondriale Ribosom ist während der kotranslationalen Proteininsertion an der Innenmembran lokalisiert. Dort interagiert es mit mitochondrialen Translationsaktivatoren, der Translokase Oxa1, mit Mba1 und anderen beteiligten Faktoren, z. B. Mdm38.

In weiteren Studien wurde die Interaktion von Oxa1 mit neu synthetisierten Proteinen noch während ihrer Produktion nachgewiesen. Diese Interaktion schloß den Kontakt zu mitochondrialen Ribosomen ein [54]. Als zentrales Verbindungsglied erwies sich dabei die C-terminale Domäne des Membranproteins, die mit ca. 90 Aminosäureresten in die mitochondriale Matrix ragt. *In vitro* Experimente mit dem gereinigten C-Terminus von Oxa1 zeigten, daß dieser essentiell für die Bindung mitochondrialer Ribosomen ist [137]. Zudem konnten für Hefestämme, in denen der C-Terminus von Oxa1 deletiert worden war, ähnliche respiratorische Defekte beobachtet werden, wie für die Mutanten, in denen Oxa1 vollständig fehlte [137]. Über diese Analysen hinaus wurde durch Quervernetzungsexperimente die Assoziation von Oxa1 mit Mrp20, einem ribosomalen Protein der großen Untereinheit, gezeigt [61]. Das zu Mrp20 homologe Protein in *E. coli* ist L23. Dieses ist ebenfalls ein Protein der großen ribosomalen Untereinheit und nahe dem Tunnelausgang für naszierende Ketten lokalisiert [3]. Homologe der L23-Familie finden sich in allen Ribosomen. Sie sind Teil einer universell konservierten Bindestelle und dienen als Anlagerungsstellen für den Triggerfaktor [31], das Signalerkennungspartikel (SRP) [49] und Membrantranslokasen während der kotranslationalen Proteininsertion [89] [8] [85] (weitere Erläuterungen s. Kapitel 1.5).

Obwohl die Translokase Oxa1 in den letzten Jahren biochemisch recht gut charakterisiert werden konnte, ist der eigentliche Prozeß der kotranslationalen Insertion in die Membran nicht verstanden. Zudem existiert auch keine genaue Vorstellung über

die Art der Bindung zwischen Ribosomen und Oxa1 und das funktionelle Zusammenspiel beider Komponenten im Insertionsprozeß.

Neben dem Membranprotein Oxa1 wurden in den letzten Jahren noch zwei weitere Komponenten identifiziert, die an der Insertion mitochondrial kodierter Proteine in die Innenmembran beteiligt sind (vgl. Abb. 1.3). Dabei handelt es sich zum einen um das membranassoziierte Matrixprotein Mba1 [103] [112] und zum anderen um das integrale Membranprotein Mdm38 [36].

Obwohl die Deletion beider Komponenten zu schwächer ausgeprägten Phänotypen führt als die von Oxa1, konnten trotzdem ähnliche respiratorische Defekte beobachtet werden [103] [36]. In beiden Fällen wirkte sich die Deletion der Proteine auf die Biogenese bzw. die Aktivität der Atmungskettenkomplexe und der mitochondrialen ATPase aus. Zudem konnte für beide Proteine eine spezifische Interaktion mit mitochondrialen Ribosomen nachgewiesen werden [103] [36].

Im Gegensatz zu Oxa1, das sich vor allem auf die Insertion der COX-Untereinheiten auswirkt, wurde für Mdm38 eine Rolle in der Biogenese der Cytochrom *c*-Reduktase und der F₁F_o-ATPase vorgeschlagen [36]. Neben der endogenen Menge an Cytochrom *b* war zusätzlich auch die Assemblierung von Superkomplexen aus den Atmungskettenkomplexen III und IV in der Mdm38 Deletionsmutante reduziert [36]. Darüberhinaus konnte auch die Akkumulation von nichtassembliertem Atp6 beobachtet werden [36].

Für Mba1 dagegen wurde kürzlich die Rolle eines Ribosomenrezeptors an der inneren Mitochondrienmembran vorgeschlagen [103]. In dieser Funktion könnte es, in Analogie zum SRP-System (s. Kapitel 1.5), die Bindung der Ribosomen an die Mitochondrienmembran vermitteln und gleichzeitig die Insertion der neu synthetisierten Proteine über Oxa1 koordinieren.

Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Beobachtung, daß Mba1 vorwiegend während der Synthese mit neu produzierten Membranproteinen interagiert [112]. Zudem führte die Deletion von Mba1 zusammen mit dem C-Terminus von Oxa1 zu einer vermehrten Interaktion naszierender Ketten mit dem Matrixchaperon Ssc1 (mitochondriales Hsp70) [103]. Interessanterweise führt die vollständige Deletion von Oxa1 und Mba1 zu einem ausgeprägten synthetischen Wachstumsdefekt [112], was für eine unabhängige jedoch koordinierte Funktion beider Komponenten im Insertionsprozeß spricht.

1.5 Insertion und Assemblierung von Membranproteinen in *E. coli*

Wie im Falle der Translation gibt es auch bzgl. des Insertionsprozesses gewisse Parallelen zwischen dem mitochondrialen und prokaryotischen System. Etwa 20 % aller in *E. coli* kodierten Proteine sind Innenmembranproteine mit α -helikalen Segmenten [77]. Für deren Sortierung und Insertion in die Zytoplasmamembran gibt es verschiedene Wege. Das Oxa1-Homolog, YidC, spielt dabei eine wesentliche Rolle.

Die meisten der Membranproteine in *E. coli* werden über ihre erste Transmembrandomäne sortiert und inseriert (zur Übersicht s. [152]). Dabei handelt es sich um eine hydrophobe Sequenz, die während des Insertionsprozesses nicht abgetrennt wird. Stattdessen bleibt sie als Membrananker mit dem inserierten Protein verbunden.

Die Zielführung zur Membran erfolgt für solche Proteine über den SRP (signal recognition particle)-Weg (zur Übersicht s. [109] [77]). Dabei wird der Signalanker vom Signalerkennungspartikel erkannt und gebunden. Dieser geleitet das entstehende Protein in einem kotranslationalen Prozeß zur Zytoplasmamembran, wo die wachsende Peptidkette zusammen mit dem Ribosom an die Membrantranslokase SecYEG übergeben wird. Die Übergabe erfolgt mit Hilfe des SRP-Rezeptors FtsY.

Das SRP besteht in *E. coli* aus einer 4.5S RNA und einem ca. 48 kDa großen Protein (Ffh) [5] [79]. Dieses hat zwei funktionelle Domänen, eine N-terminale NG (GTPase)-Domäne, welche den Transportprozeß reguliert, und eine C-terminale M-Domäne [109] [79]. Letztere ist verantwortlich für die Bindung der SRP-RNA und des Signalankers, sobald dieser aus dem translatierenden Ribosom erscheint.

Für die Zielführung zur Innenmembran lagert sich das SRP in spezifischer Weise an die naszierende Kette und das translatierende Ribosom an. Die Signalsequenz wird dabei vermutlich in einer hydrophoben Tasche gebunden, welche von der M-Domäne des SRP gebildet wird [49].

Sowohl die N- als auch die M-Domäne des SRP gehen zusätzlich Bindungen mit der ribosomalen RNA und verschiedenen ribosomalen Proteinen nahe des Tunnelausgangs ein [49] [127]. Die meisten dieser Bindungen sind evolutionär konserviert. Zu den Hauptanlagerungsstellen gehört die L23/L29-Bindestelle, die neben dem SRP auch als Bindestelle für den Triggerfaktor [67] [31] und die SecYEG-Translokase [90] dient. Dieser Verknüpfungspunkt scheint auch im mitochondrialen System konserviert zu sein (vgl. Kapitel 1.4; [61]).

Im Gegensatz zum eukaryotischen System wird während der SRP-vermittelten Zielführung in *E. coli* wahrscheinlich kein Translationsarrest erzeugt. Die Anlagerung an die Membran und die Übergabe des translatierenden Ribosoms an SecYEG wird

durch die vorübergehende Interaktion des SRP mit seinem membranassoziierten Rezeptor FtsY bewerkstelligt. Der Rezeptor liegt in *E. coli* sowohl in freier als auch in membrangebundener Form vor [76]. Für eine effektive Ablösung des SRP von der Signalsequenz benötigt FtsY jedoch den Kontext der bakteriellen Innenmembran [145].

Die Interaktion von SRP und FtsY ist ein hochregulierter Prozeß, der durch die Bindung und Hydrolyse von GTP in den beiderseits vorhandenen NG-Domänen getrieben wird (zur Übersicht s. [77]). Wie dieser Prozeß im Einzelnen abläuft, ist noch nicht genau verstanden. Hinweise lassen jedoch vermuten, daß die Bindung des SRP an das Ribosom dessen Affinität für GTP erhöht und die Zielführung folglich in einer GTP-gebundenen Form stattfindet. Eine ähnliche Aktivierung wurde auch für FtsY durch seine Interaktion mit Lipiden und spezifischen Komponenten der SecYEG-Translokase vorgeschlagen. Die Komplexbildung von SRP und FtsY führt zur gegenseitigen Aktivierung der GTPase-Domänen [88]. Beide Proteine wirken damit als GTPase und zugleich auch als GAP (GTPase activating protein). Die Hydrolyse der GTP-Moleküle erfolgt erst, nachdem die Signalsequenz in die SecYEG-Translokase entlassen wurde. Sie ist für die Zielführung des Ribosoms und der Peptidkette zur Membran nicht essentiell, sondern ermöglicht vielmehr die Regeneration von SRP und FtsY, die infolge der GTP-Hydrolyse dissoziieren [25].

Die Aufnahme der wachsenden Peptidkette in die Membran erfolgt durch die Translokase SecYEG. SecYEG ist in *E. coli* ein heterotrimerer Komplex. Die porebildende Untereinheit ist SecY, welches aus 10 Transmembrandomänen besteht [9]. Begleitet wird SecY von den Proteinen SecE und G. Diese besitzen in *E. coli* drei bzw. zwei Transmembrandomänen, wobei lediglich die C-terminale Transmembrandomäne von SecE für die Formierung eines funktionellen Translokons notwendig ist [77].

Zur Insertion der naszierenden Kette arbeitet die Sec-Translokase mit dem Innenmembranprotein YidC zusammen [71] [154] [7]. Wie die Insertion im Einzelnen abläuft und welche Rolle YidC dabei zukommt, ist noch nicht genau verstanden. Koreinigungs- und Quervernetzungsexperimente deuten jedoch darauf hin, daß YidC und SecYEG während des Insertionsprozesses in engem Kontakt stehen [59] [129] [58] [143]. Zudem konnte gezeigt werden, daß YidC die wachsende Peptidkette schon frühzeitig während des Insertionsprozesses kontaktiert. Arbeiten mit unterschiedlich langen Substratproteinen ließen eine Rolle von YidC im lateralen Proteintransfer vermuten [57] [144]. Darüberhinaus machten sie auch eine Funktion als Assemblierungsfaktor wahrscheinlich. Diese Hypothese wurde durch Assemblierungsstudien mit dem Membranprotein LacY unterstützt [93]. Dessen Faltung und funktionelle Assemblierung in der Membran hängt stark von der Anwesenheit von YidC ab.

Neben diesem Sec-abhängigen Insertionsweg gibt es in *E. coli* auch einen Sec-un-

abhängigen Insertionsweg, der allein auf dem Innenmembranprotein YidC beruht [122]. Er wird vor allem von kleineren Proteinen, wie z. B. der $F_{1}F_{o}$ -Untereinheit der $F_{1}F_{o}$ -ATPase [70] [12] [153] und von verschiedenen Phagenhüllproteinen genutzt [22]. Zu den am besten charakterisierten Substraten zählen das M13 und das Pf3 Hüllprotein [123] [122]. Ihre Insertion in die Zytoplasmamembran von *E. coli* wird durch die Depletion von YidC nahezu vollständig blockiert. Für das Hüllprotein Pf3 konnte zudem eine YidC-abhängige Insertion in Proteoliposomen nachgewiesen werden [131].

Neben der Bedeutung für die Insertion dieser speziellen Proteine gibt es außerdem auch Hinweise, wonach die Insertion der ersten Transmembrandomäne von CyoA, dem prokaryotischen Homolog von Cox2, ausschließlich von YidC abhängt [21] [11] [108].

Wie die 'YidC-only'-Insertion funktioniert, ist nicht verstanden. Mehrere Hinweise deuten jedoch darauf hin, daß dieser Weg unabhängig ist von einem Membranpotential [123]. Die Zielführung der Proteine zur Membran bezieht möglicherweise die Aktivität des SRP mit ein und könnte damit, ähnlich wie im Falle der Sec-abhängigen Insertion, in kotranslationaler Weise erfolgen [44]. Ein ähnlicher Mechanismus wurde bereits für die Zielführung und Insertion von Proteinen in die Thylakoide der Chloroplasten vorgeschlagen [91].

Sollte die Zielführung tatsächlich in kotranslationaler Weise erfolgen, so wäre auch eine direkte Interaktion des Ribosoms mit YidC im nachfolgenden Insertionsprozeß durchaus wahrscheinlich. Diese konnte bisher allerdings nicht beobachtet werden.

Im Gegensatz zu den Membranproteinen, die in *E. coli* über einen N-terminalen Membrananker sortiert werden, werden sekretierte Proteine über N-terminale Signalsequenzen zur Zytoplasmamembran geleitet (zur Übersicht s. [30] [77]). Diese sind im Allgemeinen weniger hydrophob als Signalankersequenzen und werden während der Translokation der Proteine über die Membran abgetrennt. Für eine gerichtete Zielführung der Proteine zur Membran binden diese das lösliche Chaperon SecB. SecB lagert sich dabei an die Substratproteine an und geleitet sie so zur Zytoplasmamembran. Die Translokation über die Membran erfolgt wiederum mittels SecYEG, wobei sie von der peripher assoziierten ATPase SecA unterstützt wird [30].

Neben diesem SecYEG-abhängigen Sekretionsweg werden einige Proteine in *E. coli* auch über den TAT-Transporter sekretiert (zum Überblick s. [124]). Hierbei handelt es sich um eine evolutionär konservierte Translokase, die bereits gefaltete Substratproteine zusammen mit ihren Kofaktoren über die Membran transportiert. Das Zielführungssignal dieser Proteine beinhaltet typischerweise ein sogenanntes 'twin-arginine' Motiv. Der Transport über die Membran ist abhängig vom einem pH-Gradienten über der Membran. Der molekulare Mechanismus dieses Systems ist

weitgehend unverstanden.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es, die Synthese und Insertion mitochondrial kodierter Proteine in Hefe näher zu charakterisieren. Innerhalb dieses Rahmens war die Fragestellung in zwei separate Themenbereiche gegliedert.

Im ersten Teil der Arbeit sollte das Protein Guf1 (GTPase of unknown function) näher charakterisiert werden. Dieses war bereits vor einiger Zeit als elongationsfaktorähnliche GTPase identifiziert worden. Dessen Funktion bei der Synthese und Insertion mitochondrial kodierter Proteine wurde unter anderem durch Wachstumsanalysen, Translations- und Quervernetzungsexperimente untersucht.

Um nähere Aufschlüsse über die Struktur der Bindung sowie das funktionelle Zusammenspiel von Oxa1 und dem mitochondrialen Ribosom im Insertionsprozeß zu erhalten, sollte im zweiten Teil der Arbeit ein Komplex aus beiden Komponenten rekonstituiert werden. Dieser Komplex sollte als Grundlage für strukturelle Untersuchungen mittels Kryo-Elektronenmikroskopie dienen.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Molekularbiologische Untersuchungsmethoden

Soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden Puffer und Lösungen nach Sambrook *et al.* [121] verwendet.

2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte, je nach Zweck, im großen (präparativ) oder im kleinen Maßstab (analytisch).

Für die Analyse im kleinen Maßstab (Minipräparation) wurde die DNA mittels alkalischer Lyse nach Birnboim und Doly [10] isoliert. Dazu wurden Einzelkolonien von *E. coli* gepickt und in 3 ml LB_{Amp}-Medium (10 g/l Bacto Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 150 g/l NaCl, pH-Wert 7,5; unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (30 sec, 10.000 × g, RT) geerntet und in 50 µl sterilem Wasser resuspendiert. Die Lyse erfolgte durch die Zugabe von 300 µl Lösung I (1 mM EDTA, 0,1 N NaOH, 0,5% [w/v] SDS, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) und anschließende Inkubation bei Raumtemperatur für 5 min. Danach wurde das Lysat mit 150 µl Lösung II (3 M Natriumacetat, pH 4,8) gemischt und der entstandene Niederschlag durch Zentrifugation (10 min, 15.000 × g, 4°C) abgetrennt. Der klare Überstand wurde nachfolgend mit dem zweifachen Volumen an Ethanol versetzt und die DNA für 20 min bei -20°C gefällt. Diese wurde durch Zentrifugation (10 min, 15.000 × g, 4°C) geerntet und in 70% [v/v] Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (10 min, 15.000 × g, 4°C) wurde die DNA 5 min bei Raumtemperatur getrocknet und in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert.

Für Plasmid-Präparationen im großen Maßstab wurde mit dem Pure Yield™ Plasmid Midiprep System von Promega gearbeitet. Die Isolierung der DNA erfolgte gemäß den Angaben des Herstellers (Protokoll zur Isolierung durch Zentrifugation).

Als Ausgangsmaterial dienten Bakterienkulturen mit einem Volumen von 50 bzw. 100 ml.

2.1.2 Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR

Einzelne Abschnitte genomischer Hefe-DNA wurden mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) vervielfältigt. Pro 50 µl Ansatz wurden dafür 2 mM dNTPs, 20 pmol der beiden Primer und 5 µl des PCR-Reaktionspuffers (10 × Pfu Reaktionspuffer von Promega) eingesetzt. Als Matrize dienten ca. 100 ng genomische Hefe-DNA bzw. 20 ng Plasmid-DNA. Die Amplifikation erfolgte durch 2,5 U Taq DNA-Polymerase und 0,25 U Pfu DNA-Polymerase. Zum Denaturieren der DNA wurde der Ansatz 5 min bei 95 °C vorinkubiert. Anschließend wurden 30 Reaktionszyklen durchlaufen, wobei ein Zyklus typischerweise aus folgenden Schritten bestand: Denaturierung der Matrize 1 min, Anlagerung der Primer an die Matrize 30 sec bei 50 - 55 °C, Synthese des komplementären DNA-Stranges 1,5 - 3 min bei 68 °C. Um unvollständige DNA-Stränge fertig zu synthetisieren, wurde anschließend noch 10 min bei 68 °C inkubiert. Amplifizierte DNA-Fragmente wurden über eine präparative Agarosegelelektrophorese (s. Kapitel 2.1.4) gereinigt. Die Bestimmung der Schmelztemperatur (T_m) für die Anlagerung der Primer an die Matrize erfolgte gemäß der $(G/C \times 4 + A/T \times 2) - 4$ Regel.

2.1.3 Restriktionsverdau von DNA

Isolierte Plasmid-DNA bzw. amplifizierte DNA-Fragmente wurden, je nach Zweck, präparativ oder analytisch verdaut.

Für den analytischen Verdau von Mini-DNA wurden in einem Gesamtvolumen von 20 µl je 5 µl isolierte Mini-DNA (s. Kapitel 2.1.1) und 0,2 bis 1 U/µl der gewünschten Restriktionsenzyme eingesetzt. Der Verdau erfolgte für eine Dauer von 2 h bei den für die Enzyme empfohlenen Temperatur- und Pufferbedingungen.

Der Verdau von DNA im präparativen Maßstab wurde in einem Gesamtvolumen von 150 µl durchgeführt. Dazu wurde ca. 1 µg DNA eingesetzt und mit 0,2 - 1 U/µl der gewünschten Restriktionsenzyme über Nacht bei den angegebenen Temperatur- und Pufferbedingungen verdaut.

Zum Abstoppen der Reaktionen wurden die Proben mit 6 × Probenpuffer (0,25 % [w/v] Bromphenolblau, 0,25 % [w/v] Xylenyanol FF, 30 % [v/v] Glycerin) versetzt. Im Falle von verdauter Mini-DNA enthielt dieser zusätzlich 0,5 mg/ml RNase A. Alle Ansätze wurden mittels Agarosegelelektrophorese analysiert bzw. gereinigt (s. Kapitel 2.1.4).

Alle Puffer und evtl. Zusätze (z. B. BSA) wurden gemäß den Angaben des Herstellers zugesetzt. Für den Verdau von DNA wurden Enzyme und Puffer von New England

Biolabs verwendet.

2.1.4 Agarosegelelektrophorese von Nukleinsäuren

Für die Analyse und Reinigung von linearisierter bzw. amplifizierter DNA wurden horizontale Agarosegele verwendet. Je nach Fragmentgröße wurden Gele einer Konzentration von 1 - 1,5 % [w/v] Agarose in TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA, pH 8,0) unter Zusatz von 1 µg/ml Ethidiumbromid verwendet. Die Trennung wurde bei einer angelegten Feldstärke von 6 V/cm (bezogen auf den Abstand der Elektroden) durchgeführt. Der Nachweis der DNA im Agarosegel erfolgte mittels UV-Detektion.

Zur Aufreinigung präparativ verdauter DNA-Fragmente bzw. amplifizierter DNA wurde diese aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit Hilfe des Peqlab Gel Extraction Kits nach den Angaben des Herstellers gereinigt.

2.1.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA erfolgte in einem Reaktionsvolumen von 15 µl. Pro Ansatz wurde 1 µl Vektor-DNA eingesetzt und mit 5 - 10 µl Insert-DNA gemischt. Alle Ansätze wurden mit 1,5 U T4 DNA Ligase in dem empfohlenen Ligationspuffer (30 mM Tris-HCl pH 7,8, 10 mM MgCl₂, 10 mM DTT, 1 mM ATP) über Nacht bei 15 °C inkubiert.

2.1.6 Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Klonierung rekombinanter DNA in *E. coli* wurden zwei verschiedene Stämme eingesetzt, *E. coli* XL1-blue (Qiagen) und *E. coli* DH5α (Invitrogen). Die Stämme trugen folgende genetische Marker:

- *E. coli* XL1-blue *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 Lac[F' pro A⁺B⁺ lacI^qZΔM15 Tn10(Tet^r)]*
- *E. coli* DH5α (Φ 80 *lacZΔM15*)Δ[*lacZYA-argF*] U196 *recA1endA1 r⁻ m⁺ gyrA thi-1 hsdR17 rsupE44 relA1*

2.1.6.1 Herstellung elektrokompetenter *E. coli* Zellen

Für die Herstellung elektrisch kompetenter Zellen wurden 400 ml LB-Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 angezogen. Die Kultur wurde anschließend 30 min auf Eis gestellt und durch Zentrifugation (15 min, 2.500 × g, 4 °C) geerntet. Danach wurden die Zellen mit absteigenden Volumina an 10 % [v/v] Glycerin (2 × 500 ml, 2 × 250 ml und

2 × 5 ml) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Bakterien in 400 µl 10 % [v/v] Glycerin resuspendiert und in 45 µl Portionen bei −70 °C gelagert.

2.1.6.2 Herstellung chemisch kompetenter *E. coli* Zellen

Zur Herstellung chemisch kompetenter Bakterien wurden 400 ml LB-Medium mit 2 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von ca. 0,4 angezogen. Anschließend wurde die Kultur 5 min auf Eis gekühlt und 10 min bei 2.000 × g und 4 °C zentrifugiert. Danach wurden die Zellen in 50 ml 100 mM sterilem CaCl₂, 20 mM RbCl₂ resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) wurden die Bakterien in 1,5 ml sterilem 100 mM CaCl₂ und 15 % [v/v] Glycerin aufgenommen und in 100 µl Aliquots bei −70 °C gelagert.

2.1.7 Transformation von *E. coli*

Für die Elektroporation von *E. coli* Bakterien wurde ein Aliquot elektrisch kompetenter Zellen (s. Kapitel 2.1.6.1) aufgetaut und mit 1 - 3 µl DNA gemischt. Der Ansatz wurde luftblasenfrei in eine gekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt und einem elektrischen Puls von 1,5 kV bei einem Widerstand von 400 Ω und einer Kapazität von 25 µF ausgesetzt. Unmittelbar danach wurden die Zellen in 1 ml steriles LB-Medium aufgenommen und 15 - 30 min bei 37 °C geschüttelt. Zur Selektion positiver Transformanden wurden die Zellen auf LB-Platten inkl. geeignetem Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Transformation chemisch kompetenter Bakterien wurden ca. 100 µl Zellen mit 3 µl gereinigter Plasmid-DNA bzw. mit 8 µl Ligationsansatz (s. Kapitel 2.1.5) versetzt und zur Anlagerung der DNA an die Zellen 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien einem zweiminütigen Hitzeschock (42 °C) ausgesetzt. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen in 1 ml steriles LB-Medium aufgenommen und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Zur Selektion positiver Transformanden wurden die Zellen auf LB-Platten inkl. geeignetem Selektionsmarker ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.1.8 Verwendete Plasmide und klonierte Konstrukte

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Plasmide kloniert. Tabelle 2.1 gibt einen Überblick über alle verwendeten Vektoren und die daraus hervorgegangenen Konstrukte.

Alle neu generierten Konstrukte wurden sequenziert (Fa. Medigenomix, Martinsried, Deutschland).

Tabelle 2.1: Verwendete Plasmide und generierte Konstrukte

| Konstrukt | Beschreibung | Plasmid | Referenz |
|---------------------------------|--|---------------------|--------------|
| pGEM4-Guf1 | Konstrukt zur <i>in vitro</i> Transkription/Translation von Guf1; kodiert für Guf1 (1-645) | pGEM4 (Promega) | diese Arbeit |
| pYX132-Guf1 | Konstrukt zur Überexpression von Guf1 in Hefe; kodiert für Guf1 (1-645); C-terminaler 1 × HA-tag | pYX132 (Invitrogen) | diese Arbeit |
| pMalcRI-Mrp4 | Konstrukt zur rekombinanten Expression von Mrp4 in <i>E. coli</i> ; kodiert für Mrp4 (1-394); N-terminaler MBP-tag | pMalcRI (Promega) | diese Arbeit |
| pMalcRI-Oxa1 N (<i>N. c.</i>) | Konstrukt zur rekombinanten Expression des N-terminus von Oxa1 aus <i>N. c.</i> (70-142); N-terminaler MBP-tag | pMalcRI (Promega) | diese Arbeit |
| pMalcRI-L23 (<i>N. c.</i>) | Konstrukt zur rekombinanten Expression von L23 aus <i>N. c.</i> (1-228); N-terminaler MBP-tag | pMalcRI (Promega) | diese Arbeit |
| pQE30-Yml36 (<i>N. c.</i>) | Konstrukt zur rekombinanten Expression von Yml36 aus <i>N. c.</i> (48-219); N-terminaler His6-tag | pQE30 (Qiagen) | diese Arbeit |

2.1.8.1 Klonierung von pGEM4-Guf1

Für die *in vitro* Synthese von radioaktiv markiertem Guf1 (s. Kapitel 2.5.4) wurde die kodierende Sequenz des *GUF1*-Gens mittels PCR (s. Kapitel 2.1.2) aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer (5' → 3') verwendet:

Sc *GUF1* F

ccc caa ttg atg ctg aaa ttt aga att agg cca g

SC *GUF1* His R

ccc ctg cag cta acg gcg caa aaa agc ctg

Das PCR-Produkt wurde nachfolgend mit den Restriktionsenzymen *Mfe*I und *Pst*I verdaut (s. Kapitel 2.1.3) und mittels Agarosegelelektrophorese (s. Kapitel 2.1.4) gereinigt. Für die Ligation mit dem Vektor pGEM4 (Promega) wurde dieser ebenfalls

verdaut (Enzyme *EcoRI* und *PstI*) und gereinigt. Nach Ligation (s. Kapitel 2.1.5) des DNA-Abschnitts mit dem linearisierten Plasmid wurde das Konstrukt in elektrokompetente XL1-blue Zellen transformiert (s. Kapitel 2.1.7), positive Klone selektiert und die Plasmid-DNA auf erfolgreiche Integration des *GUF1*-Gens analysiert.

2.1.8.2 Klonierung von pYX132-Guf1

Zur Überexpression von Guf1 in Hefe wurde die kodierende Sequenz mittels PCR (s. Kapitel 2.1.2) mit den Primern (5' → 3')

```
Sc GUF1 F
ccc caa ttg atg ctg aaa ttt aga att agg cca g
Sc GUF1 R
ccc acg cgt acg gcg caa aaa agc ctg
```

aus genomischer Hefe-DNA amplifiziert, enzymatisch verdaut (*MluI*, *MfeI*; Kapitel 2.1.3) und gereinigt. Anschließend erfolgte die Ligation (s. Kapitel 2.1.5) mit dem linearisierten (*EcoRI*, *MluI*) Vektor pYX132. Nach Transformation in elektrokompetente XL1-blue Zellen (s. Kapitel 2.1.7) und positiver Selektion wurde das Plasmid in größerer Menge isoliert (s. Kapitel 2.1.1) und für die Transformation von Hefezellen verwendet.

2.1.8.3 Konstrukte für die Antikörperproduktion

Für die Produktion polyklonaler Antikörper gegen Mrp4 aus Hefe und Oxal, L23 bzw. Yml36 aus *N. crassa* wurden die Proteine rekombinant in *E. coli* exprimiert. Dazu wurden ihre kodierenden Sequenzen in die Expressionsvektoren pQE30 (Qiagen) bzw. pMalcRI (New England Biolabs) kloniert (vgl. Tabelle 2.1). Dies geschah mit Hilfe folgender Primer (5' → 3'):

```
Sc Mrp4 pMalcRI F
ccc cac ctg cag atg cag aga cac gtt ttt gcg ag
Sc Mrp4 pMalcRI R
ccc aag ctt tca ttt ttc gtt att tct ggc caa g
Nc Oxal Nterm F
ggg aga tct gct tcg act ggt ccc gat
Nc Oxal Nterm R
ggg gga tcc gac gtg ctc ggt aag c
Nc L23 F
ccc gga tcc atg gcc tcc gta gcg aaa ac
Nc L23 R
ccc aag ctt tca ttg cct agt ctc cga ac
```

Nc Yml36 F

gct gag aga tct ctg gtt ccg cgt gga tcc gca acc ttt gtc ccc cg

Nc Yml36 R

ggg aag ctt tta ctt ctt ctt gcc ata atg

Die erhaltenen PCR-Produkte wurden gereinigt und mit den entsprechenden Enzymen (Mrp4 *HindIII*/*Pst*I, Oxa1 N-term *Bam*HI/*Bgl*II, L23 *Bam*HI/*Hind*III, Yml36 *Bgl*II/*Hind*III) verdaut (s. Kapitel 2.1.3). Anschließend erfolgte die Ligation (s. Kapitel 2.1.5) mit den linearisierten Vektoren. Nach Transformation in elektrokompetente XL1-blue Zellen (s. Kapitel 2.1.7) wurden positive Klone selektiert und die Plasmid-DNA auf erfolgreiche Integration der DNA-Sequenzen hin analysiert.

2.2 Methoden der Hefekultur und -genetik

2.2.1 Verwendete Hefestämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene Hefestämme generiert und eingesetzt. Diese sind in Tabelle 2.2 zusammengefaßt.

Genaue Angaben zur Erzeugung der Stämme befinden sich in Kapitel 2.2.6.

2.2.2 Kultur von *S. cerevisiae*

Für die Kultur von Hefezellen wurden verschiedene Voll- bzw. Selektivmedien eingesetzt. Tabelle 2.3 gibt einen Überblick über deren Zusammensetzung.

Die Anzucht der Hefen erfolgte bei 30 °C. Davon abweichend wurden die Kulturen für Wachstumstests und temperaturabhängige Expressionstudien auch bei 15, 25 oder 37 °C kultiviert.

Als Kohlenstoffquelle in den verschiedenen Medien wurden, je nach Bedarf, Glukose, Galaktose, Glycerin oder Laktat verwendet. Für die Selektion von auxotrophen Mutanten in S-(Selektiv-)Medium wurde dieses zusätzlich mit den entsprechenden Markern komplettiert.

Die Lagerung von *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgte in 15% [v/v] Glycerin bei –70 °C. Für die Anzucht wurden die Hefen von den Stocks auf Platte ausgestrichen und 2 - 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Platten wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Flüssigkulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von ca. 0,1 - 1,5) gehalten.

Tabelle 2.2: Verwendete Hefestämme

| Stamm | Wildtyp | Genetische Marker | Beschreibung | Referenz |
|---|----------------|---|---|------------------------------|
| W303-1A | | <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1, ura3-1</i> | | Rothstein [120] |
| Guf1 3 × HA | W303-1A | <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-1</i> | Chromosomal kodiertes <i>GUF1</i> mit C-term 3 × HA-tag | diese Arbeit |
| Gal1-Guf1 3 × HA | W303-1A | <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-1, Kan+</i> | Chromosomal kodiertes <i>GUF1</i> mit C-term 3 × HA-tag unter Kontrolle des Gal1-Promotors | diese Arbeit |
| $\Delta guf1::His3$ | W303-1A | <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1, ura3-1</i> | Chromosomale Deletion von <i>GUF1</i> mit <i>HIS5</i> -Kassette | diese Arbeit |
| Oxa1 Δ C (1-331) | CW04- α | <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1, ura3-1</i> | Stop-Codon an Position aa332 im <i>OXA1</i> -Gen | Szyrach <i>et al.</i> [137] |
| Oxa1 Δ C (1-331)/ $\Delta guf1::His3$ | CW04- α | <i>ade2-1</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>trp1-1, ura3-1</i> , | Stop-Codon an Position aa332 im <i>OXA1</i> -Gen; Chromosomale Deletion von <i>GUF1</i> mit <i>HIS5</i> -Kassette | diese Arbeit |
| BY4742 (Wildtyp) | | <i>his3-1, leu2-0</i> , <i>lys2-0, ura3-0</i> | | Brachmann <i>et al.</i> [18] |
| $\Delta guf1::KanMX4$ | BY4742 | <i>his3-1, leu2-0</i> , <i>lys2-0, ura3-0</i> , <i>Kan+</i> | Chromosomale Deletion von <i>GUF1</i> mit Kan-Kassette | Brachmann <i>et al.</i> [18] |
| pYX132-Guf1 | W303-1A | <i>ade2-1</i> , <i>his3-1,15</i> , <i>leu2-3,112</i> , <i>ura3-1</i> | Guf1 mit C-term 1 × HA-tag unter Kontrolle des TPI-Promotors | diese Arbeit |

Tabelle 2.3: Medien für die Anzucht von Hefe

| A) Voll- und Selektivmedien für die Hefeanzucht | |
|---|--|
| Bezeichnung | Zusammensetzung |
| YP-Medium (Vollmedium) | 10 g/l Hefeextrakt, 20 g/l Bacto-Pepton, pH 5,5 mit HCl |
| Laktat-Medium (Vollmedium) | 3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l K ₂ HPO ₄ , 1 g/l NH ₄ Cl, 0,5 g/l CaCl ₂ , 0,5 g/l NaCl, 0,6 g/l MgSO ₄ , 0,3 ml/l 1 % [w/v] FeCl ₃ , 2 % [v/v] Laktat, pH 5,5 mit KOH |
| S-(Selektiv-) Medium | 0,17 % [w/v] Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0,5 % [w/v] (NH ₄) ₂ SO ₄ |
| B) Kohlenstoffquellen | |
| Kohlenstoffquellen | Endkonzentration im Medium |
| Glukose (D) | 0,5-2 % [w/v] |
| Galaktose (Gal) | 0,5-2 % [w/v] |
| Glyzerin (G) | 0,5-2 % [v/v] |
| Laktat | 2 % [v/v] |
| C) Selektionsmarker | |
| Selektionsmarker | Endkonzentration im Medium (mg/ml) |
| Adenin | 20 |
| Urazil | 20 |
| Histidin | 20 |
| Lysin | 30 |
| Leucin | 30 |
| Tryptophan | 20 |

2.2.3 Bestimmung von Wachstumsphänotypen in *S. cerevisiae*

2.2.3.1 Bestimmung des Wachstums in Flüssigkultur

Zur Bestimmung von Wachstumsdefekten in flüssigen Medien wurden Hefen in Laktat- oder YP-Medium (s. Tabelle 2.3) angezogen, welches mit der gewünschten Kohlenstoffquelle supplementiert worden war (Kulturvolumen jeweils 10 ml). Ausgehend von dieser Startkultur wurden die Hefen bei unterschiedlichen Bedingungen auf Wachstumsdefekte getestet. Dazu wurde die jeweilige Verdoppelungszeit der Hefestämme $t(D)$ berechnet. Dies geschah mit Hilfe folgender Formel

$$t(D) = \frac{\ln(2)\Delta t}{\ln\left(\frac{OD_{fin}}{OD_{ini}}\right)}$$

wobei OD_{fin} die Optische Dichte der Kultur zum aktuellen Zeitpunkt beschreibt, OD_{ini} die zu Beginn der Inkubation und Δt die Dauer der Anzucht.

Die für die Berechnung notwendigen optischen Dichten wurden in regelmäßigen

Zeitabständen (2 h) bestimmt. Alle Kulturen wurden in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten.

2.2.3.2 Bestimmung des Wachstums auf festen Medien (Tüpfeltest)

Für die Durchführung von Tüpfeltests wurden die gewünschten Hefestämme über Nacht bei 30 °C in 10 ml des entsprechenden Mediums angezogen und am Morgen auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt. Nachdem die Zellen ausreichend dicht gewachsen waren (OD₆₀₀ = 1,0), wurde je 1 OD₆₀₀ geerntet und in Wasser gewaschen. Danach wurden die Stämme auf eine OD₆₀₀ von 0,5/ml in Wasser eingestellt. Ausgehend davon wurde eine serielle Verdünnungsreihe (4 × 1:10) in Wasser hergestellt. Pro Verdünnung wurden jeweils 3,5 µl auf verschiedene YP-Platten aufgebracht und 1 - 3 Tage bei der zu untersuchenden Temperatur inkubiert.

2.2.4 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Für die Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae* wurden Hefen in 20 ml YPD-Medium (s. Tabelle 2.3) über Nacht bei 30 °C und 140 rpm inkubiert. Nachdem die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 5.000 × g, RT) geerntet worden waren, wurden diese in 2 ml Lysepuffer (2% [v/v] Triton X-100, 1% [w/v] SDS, 100 mM NaCl, 10 mM Tris pH 8,0, 1 mM EDTA) mit Hilfe von Glaskügelchen (Durchmesser 2 mm) aufgeschlossen. Der Zellaufschluß wurde anschließend mit 2 ml Phenol versetzt und 10 min bei 5.000 × g, RT zentrifugiert. Die obere Phase wurde vollständig abgenommen und mit 1 ml Phenol sowie 1 ml Chloroform gemischt. Nach erneuter Zentrifugation wurde abermals die obere Phase abgenommen, mit 1 ml Chloroform extrahiert und zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die DNA durch Zugabe von 200 µl 3 M Natriumacetat (pH 4,8) und 5 ml 100% [v/v] Ethanol gefällt. Nach zwanzigminütiger Inkubation bei -20 °C wurde die DNA 30 min bei 19.000 × g und 4 °C zentrifugiert, mit 70% [v/v] Ethanol gewaschen und 5 min bei RT getrocknet. Die gereinigte DNA wurde in 150 µl sterilem Wasser aufgenommen und in Aliquots zu 20 µl bei -20 °C gelagert. 2 - 5 µl der DNA-Lösung dienten als Matrize für die Amplifikation von verschiedenen DNA-Abschnitten mittels PCR (s. Kapitel 2.1.2).

2.2.5 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte nach der Lithiumacetat-Methode [45]. Dazu wurden 20 ml YPD-Medium mit einer Übernachtskultur angeimpft und bei 30 °C unter Schütteln bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 angezogen. Anschließend wurden insgesamt 4 OD₆₀₀ der Kultur durch Zentrifugation geerntet (5 min, 5.000 × g, RT), in sterilem Wasser gewaschen und 10 min bei 30 °C in sterilem Lithiumacetat

(100 mM) inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (s. o.) wurde das Zellpellet mit 240 μ l 50 % [v/v] Polyethylenglycol-3350 überschichtet. Über diesen Ansatz wurden in einem Gesamtvolumen von 360 μ l 36 μ l 1 M Lithiumacetat, 5 μ l hitzedenaturierte Lachsspermin-DNA (2 mg/ml) und 5 - 40 μ l DNA geschichtet. Die Proben wurden gemischt und 45 min bei 42 °C inkubiert.

Zur Selektion positiver Transformanden wurden die Hefen zentrifugiert, in 100 μ l sterilem Wasser resuspendiert und auf selektivem Medium ausgestrichen. Die Platten wurden 3 - 5 Tage bei 30 °C inkubiert. Entstandene Kolonien wurden durch erneutes Plattieren auf Selektivmedium vereinzelt. Die Identität der Klone wurde mittels PCR (s. Kapitel 2.1.2) oder über Zellaufschluß und Immunoblots (s. Kapitel 2.4.1/2.5.8/2.5.10) bestätigt.

2.2.6 Generation mutanter Hefestämme

Mutante Hefestämme wurden entweder durch homologe Rekombination amplifizierter DNA-Sequenzen mit dem chromosomalen Hefegenom erzeugt oder durch ektopische Genexpression von Plasmidvektoren. Durch homologe Rekombination wurden folgende Stämme erzeugt:

- Guf1-3 \times HA
- Gal1-Guf1-3 \times HA
- Δ *guf1*::His3
- Oxa1(1-331)/ Δ *guf1*::His3

Für die Amplifikation der DNA-Sequenzen wurden folgende Primer (5' \rightarrow 3') verwendet:

Sc *GUF1* HA F

gta ggt aat att caa atc aac caa gag gca tat cag gct ttt ttg cgc cgt *cgt acg ctg*
cag gtc gac

Sc *GUF1* HA R

cag ctt ggt ata att tta aaa tgg taa taa caa taa tat gca atg cta *atc gat gaa ttc*
gag ctc g

Sc *GUF1* Gal1 F

cgc aac cat tga aaa aga gcc atg aat atg gga aac tag ttg cac ata aaa atg *cgt acg*
ctg cag gtc gac

Sc *GUF1* Gal1 R

cgt gtc gtt tat aac acc gta tat gtc tca ctg gcc taa ttc taa att tca g *cat cga tga*
att ctc tgt cg

Sc *GUF1* Dis F

cat tga aaa aga gcc atg aat atg gga aac tag ttg cac ata aaa *cgg atc ccc ggg tta
att aa*

Sc *GUF1* Dis R

ctt ggt ata att tta aaa tgg taa taa caa taa tat gca atg *gaa ttc gag ctc gtt taa
ac*

Kursiv geschriebene Sequenzabschnitte kennzeichnen zu den Matrizen homologe Bereiche. Als Matrizen für die Amplifikation der DNA-Kassetten dienten die Plasmide pYM22 [60], pYm22N [60] und pFA6a-His3MX6 [75].

Amplifizierte DNA-Fragmente wurden gereinigt und in den haploiden Hefestamm W303-1A [120] transformiert (s. Kapitel 2.2.5). Einen Überblick über die erzeugten Hefestämme und ihre genetischen Marker gibt Tabelle 2.2.

Zur Überexpression von Guf1 in Hefe wurde dessen kodierende Sequenz in das Plasmid pYX132 eingebracht (TPI-Promotor; Klonierung s. Kapitel 2.1.8.2). Mit dem Konstrukt wurden Wildtyp-Hefen (W303-1A) transformiert und selektioniert (s. Kapitel 2.2.5). Positive Klone wurden mittels Zellaufschluß, SDS-PAGE und Immunoblot analysiert (s. Kapitel 2.4.1/2.5.8/2.5.10).

2.3 Kultur von *N. crassa*

Für die Reinigung von Oxa1 aus *N. crassa* wurde ein Stamm verwendet, der eine ektopische Version des oxa1-Gens enthielt [96]. Die genaue Bezeichnung und der genetische Hintergrund des Stammes sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tabelle 2.4: Genetischer Hintergrund und Bezeichnung des verwendeten *N. crassa*-Stammes

| Stamm | Genetischer Hintergrund |
|------------|--|
| K5-15-23-1 | a; <i>cyh-2, lys-2, leu-5, mei-2, oxa1^{RIP} oxa1-his6^{RIP}</i> (EC) |

2.3.1 Verwendete Medien

Für die Anzucht von *N. crassa* wurden sowohl flüssige als auch feste Medien verwendet. Tabelle 2.5 gibt einen Überblick über deren Zusammensetzung.

Tabelle 2.5: Medien zur Anzucht von *N. crassa*

| A) Verwendete Medien und deren Zusammensetzung | |
|--|--|
| Medium | Zusammensetzung |
| Vollmedium | 2,5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Zucker 1 g/l Pepton Casein, 1 [v/v] Glycerin, 5 ml /l Vitaminlösung (...), 20 ml/l Vogels 50 × Stocklösung (Vogels), 18 g/l Agar |
| Minimalmedium | 20 ml/l Vogels 50 × Stocklösung (Vogels), 2 % [w/v] Zucker |
| B) Verwendete Selektionsmarker | |
| Zusätze | Konzentration |
| Lysin | 146 mg/l |
| Leucin | 130 mg/l |

2.3.2 Kultur von *N. crassa*

Zur Anlage einer Startkultur in Vollmedium (A-Kolben) wurde der *N. crassa*-Stamm von konservierten Konidien angeimpft. Diese wurden mit einer sterilen Impföse gleichmäßig auf dem Nährboden verteilt und anschließend 4 - 5 Tage in völliger Dunkelheit bei 30 °C inkubiert. Zur Konidienbildung wurde der Kolben für weitere 7 Tage im Licht bei RT stehen gelassen. Aus diesem A-Kolben wurden weitere Vollmediumskolben (B-Kolben) angeimpft. Diese wurden ebenfalls 4 - 5 Tage bei Dunkelheit und 7 Tage am Licht inkubiert. Die Ernte der Konidien in den B-Kolben erfolgte durch Zugabe von ca. 20 ml sterilem Wasser und Umschwenken der bewachsenen Kolben. Die erhaltenen Konidiensuspensionen wurden vereinigt, über Nacht unter Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin gerührt und zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Kulturen bis zu 32 l wurden mit 0,5 - 1 B-Kolben pro Liter angeimpft. Die Kulturen wurden 20 - 36 h bei 25 °C unter Belüftung und Dauerlicht inkubiert. Das gewachsene Myzel wurde mittels Filtration geerntet und für die Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa* (s. Kapitel 2.4.4) verwendet.

Um Dauerkulturen von *N. crassa* anzulegen, wurden Konidien von zwei A-Kolben in 10 ml 10 % [w/v] steriler Magermilchlösung geerntet, durch Glaswolle gefiltert und portionsweise (ca. 500 µl pro Stock) mit 1 g sterilem Kieselgel gemischt. Die Stocks wurden 3 Wochen im Exsikkator getrocknet und anschließend bei -20 °C gelagert.

2.4 Zellbiologische Untersuchungsmethoden

2.4.1 Proteinextraktion aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Gesamtprotein aus Hefe erfolgte nach einem modifizierten Protokoll von Kushnirov *et al.* [69]. Zellen einer Übernachtskultur (2,0 OD₆₀₀) wurden

durch Zentrifugation (2 min, $5.000 \times g$, RT) geerntet und in sterilem Wasser gewaschen. Danach wurden diese in $50 \mu\text{l}$ $1 \times$ Laemmli-Puffer (s. Kapitel 2.5.8) resuspendiert. Zum Aufschluß der Zellen wurde eine Spatelspitze Glaskügelchen ($0,5 \text{ mm}$ Durchmesser) zu den Proben gegeben und $2 \times 30 \text{ sec}$ auf dem Vortex-Gerät gemischt. Anschließend wurden die Proben 2 min bei 95°C gekocht und mit $1 \times$ Laemmli-Puffer auf ein Gesamtvolumen von $75 \mu\text{l}$ gebracht. Ein Drittel der Proben wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblots (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10 und Kapitel 2.6.4) analysiert.

2.4.2 Aufschluß und Subfraktionierung von Hefezellen

Für die Trennung von Zytosol und Mitochondrien wurden Hefezellen, wie unter Kapitel 2.4.3 beschrieben, in Sphäroblasten überführt und aufgebrochen. Nach Ernte der mitochondrialen Fraktion (Pellet) wurde der Überstand (zytosolische Fraktion) gesammelt und durch erneute Zentrifugation (30 min, $100.000 \times g$, 4°C) von verunreinigenden Membranresten befreit. Die mitochondriale Fraktion wurde weiter gereinigt (s. Kapitel 2.4.3) und zusammen mit der zytosolischen Fraktion mittels SDS-PAGE und Immunoblots (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10 und Kapitel 2.6.4) analysiert.

2.4.3 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte nach Daum *et al.* [28]. Dazu wurden Hefen bis zu einer OD_{600} von 0,8 - 1,5 angezogen, durch Zentrifugation ($3.000 \times g$, 5 min, RT) geerntet und mit destilliertem Wasser gewaschen. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes (FG) wurden die Zellen in DTT-haltigem Puffer (2 ml/g FG; 100 mM Tris pH-Wert nicht eingestellt, 10 mM DTT) 10 min bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden erneut geerntet (s. o.) und in 1,2 M Sorbitol gewaschen. Um die Zellwand enzymatisch aufzuschließen, wurden die Hefen 45 min bei 30°C in Zymolyasepuffer (0,15 g FG pro ml Puffer; 1,2 M Sorbitol, 2 mg Zymolyase pro Gramm FG, 20 mM Kaliumphosphat pH 7,4) unter Schütteln inkubiert. Der Verdau der Zellwand wurde photometrisch verfolgt. Dazu wurden $50 \mu\text{l}$ Zellsuspension in 1 ml Wasser oder 1,2 M Sorbitol aufgenommen und die OD bei 600 nm bestimmt. Die Sphäroblastenbildung wurde als vollständig angesehen, sobald die OD_{600} in Wasser nur noch etwa 20% der OD_{600} in Sorbitol betrug. Die entstandenen Sphäroplasten wurden 5 min bei $1.000 \times g$ (4°C) zentrifugiert und zum Aufbruch in eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 0,2% [w/v] fettsäurefreies BSA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris-HCl pH 7,4) mit einer Konzentration von 0,15 g/ml resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Glashomogenisator gegeben und durch 10 - 15 Stöße aufgebrochen. Der Zellaufschluß wurde nochmals mit der gleichen Menge an Homogenisierungspuffer versetzt

und Zelltrümmer durch zweimaliges Zentrifugieren bei $1.200 \times g$ (5 min, 4°C) abgetrennt. Die Mitochondrien wurden aus dem Überstand sedimentiert ($11.000 \times g$, 4°C , 12 min), in 20 ml SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) gewaschen und in 0,5 - 1,5 ml SH-Puffer aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford (s. Kapitel 2.5.2) durchgeführt und anschließend die Proteinkonzentration der Suspension mit SH-Puffer auf 10 mg/ml eingestellt. Die Mitochondrien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

2.4.4 Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa*

Als Ausgangsmaterial für die Isolierung von Mitochondrien aus *N. crassa* diente das gewachsene Myzel einer 32 l Kultur (s. Kapitel 2.3.2). Dieses wurde durch Filtration geerntet und das Frischgewicht bestimmt. Für den Aufschluß wurden die Hyphen auf Eis gekühlt, mit der gleichen Menge Sand und dem zweifachen Volumen SET-Puffer I (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF) gemischt und zwei Mal durch eine Kugelmühle gelassen. Um den Sand abzutrennen, wurde das Homogenat zwei Mal zentrifugiert (5 min, $1.000 \times g$, 4°C). Anschließend wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation (50 min, $7.000 \times g$, 4°C) aus dem Lysat gewonnen und in 200 ml SET-Puffer II (250 mM Saccharose, 0,2 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM PMSF) resuspendiert. Zur weiteren Aufreinigung wurde die Suspension zehn Mal mit einem Glashomogenisator behandelt, mit ST-Puffer (250 mM Saccharose, 10 mM Tris-HCl pH 7,5) gewaschen und in 20 - 50 ml ST-Puffer resuspendiert. Von den gereinigten Mitochondrien wurde ein Aliquot zur Bestimmung des Proteingehalts (s. Kapitel 2.5.2) abgenommen. Der Rest wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.5 Submitochondriale Lokalisierung von Proteinen

Zur Lokalisierung von Proteinen in Mitochondrien wurden unterschiedliche Verfahren eingesetzt, zum einen alkalische und denaturierende Extraktionen, zum anderen Proteaseverdau von Mitochondrien und Mitoplasten.

2.4.5.1 Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen

Zur Extraktion von peripher assoziierten Proteinen aus mitochondrialen Membranen wurden isolierte Mitochondrien 10 min bei $12.000 \times g$ und 4°C pelletiert und 30 min in 100 mM ungepuffertem kaltem Natriumcarbonat bei 4°C extrahiert. Der Extrakt wurde zentrifugiert (20 min, $100.000 \times g$, 4°C) und der Überstand aus der Zentrifugation denaturierend gefällt (s. Kapitel 2.5.1). Das Membranpellet wurde

in $1 \times$ Laemmli-Puffer (s. Kapitel 2.5.8) aufgenommen. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblots analysiert (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10 und Kapitel 2.6.4).

2.4.5.2 Denaturierende Extraktion mitochondrialer Membranen

Die denaturierende Extraktion wurde im Wesentlichen wie die alkalische Extraktion mitochondrialer Membranen (s. Kapitel 2.4.5.1) durchgeführt. Anstelle von Natriumcarbonat wurde hier jedoch 4 M Harnstoff für die Extraktion verwendet und bei RT gearbeitet.

2.4.5.3 Erzeugung von Mitoplasten und Proteaseverdau

Zur Lokalisierung von Proteinen in isolierten Mitochondrien und Mitoplasten wurde deren Zugänglichkeit für einen Verdau durch Proteinase K (PK) getestet. Um aus 100 μg isolierten Mitochondrien Mitoplasten zu erzeugen, wurden diese in 100 μl SH-Puffer (Zusammensetzung s. Kapitel 2.4.3) aufgenommen. Anschließend wurde die Mitochondriensuspension 1:10 mit 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 verdünnt und 10 - 30 min auf Eis inkubiert, um die Außenmembran durch hypotones Schwellen zu zerstören. Zum Verdau von Proteinen in der Außenmembran, dem Intermembranraum und der mitochondrialen Innenmembran wurden 25 - 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PK zugegeben und weitere 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 2 mM PMSF gestoppt. Anschließend wurden die Proben in SHKCl-Puffer (Zusammensetzung s. Kapitel 2.4.6) gewaschen und in $1 \times$ Laemmli-Puffer (s. Kapitel 2.5.8) resuspendiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblots (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10 und Kapitel 2.6.4).

Zu Kontrollzwecken wurden auch Proben verdaut, die in SH-Puffer inkubiert worden waren bzw. Proben, die in 1% [v/v] Triton X-100 solubilisiert worden waren.

2.4.6 *in vitro* Import radioaktiv markierter Proteine in isolierte Hefemitochondrien

Der Import von *in vitro* synthetisierten Vorstufenproteinen (s. Kapitel 2.5.4) erfolgte je nach Bedarf in Importpuffer mit oder ohne BSA (0,6 M Sorbitol, 50 mM Hepes/KOH pH 7,4, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM KH_2PO_4 pH 7,4, 2,5 mM MnCl_2 , [3% [w/v] fettsäurefreies BSA]). Ein Standardansatz enthielt 0,5 mg/ml Mitochondrien (50 μg pro Gelspur) in dem beschriebenen Importpuffer unter Zusatz von 2,5 mM ATP, 5 mM NADH, 10 mM Kreatinphosphat und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Kreatinkinase. Der Import wurde durch die Zugabe von 2 - 4% [v/v] Retikulozytenlysate, welches das radioaktiv markierte Protein enthielt, gestartet und erfolgte für unterschiedliche Zeiten bei 25 °C. Um das Membranpotential zu zerstören, wurde das NADH durch 1 μM Valinomycin ersetzt. Alle Importansätze wurden durch

Verdünnung in kaltem SH (1:10, Zusammensetzung s. Kapitel 2.4.3) gestoppt. Nicht importiertes Vorstufenprotein wurde durch Zugabe von 50 µg/ml PK verdaut.

Zur submitochondrialen Lokalisation des importierten Proteins fand der Verdau unter hypotonischen und isotonischen Bedingungen statt (s. Kapitel 2.4.5.3). Nach Abstoppen des Verdaus mit 2 mM PMSF wurden die Mitochondrien 10 min bei $12.000 \times g$ (4°C) sedimentiert, in SHKCl (0,6 M Sorbitol, 80 mM KCl, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) gewaschen und in 25 µl $1 \times$ Laemmli-Puffer (s. Kapitel 2.5.8) resuspendiert.

2.4.7 Radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte *in organello*

Die Translation mitochondrial kodierter Proteine [110] wurde in isolierten Mitochondrien oder Mitoplasten durchgeführt (s. Kapitel 2.4.5.3). Ein Standardansatz enthielt 50 µg isolierte Mitochondrien in 20 µl SH-Puffer (Zusammensetzung s. Kapitel 2.4.3) und 40 µl $1,5 \times$ Translationspuffer (0,9 M Sorbitol, 225 mM KCl, 22,5 mM Kaliumphosphat pH 7,4, 19,5 mM MgSO_4 , 6 mM ATP, 0,75 mM GTP, 7,5 mM α -Ketoglutarat, 7,5 mM Phosphoenolpyruvat, 225 µg/ml aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, 30 mM Tris-HCl pH 7,4, 4,5 mg/ml fettsäurefreies BSA, 10 µg/ml Pyruvatkinase). Nach zweiminütiger Vorinkubation wurde der Ansatz in Anwesenheit von [^{35}S]Methionin (10 µCi) für 15 min bei 25°C inkubiert. Die Translation wurde durch die Zugabe von 3 µl 200 mM Methionin und 3 µl Puromycin (1 mg/ml) gestoppt, die Mitochondrien wurden in 1 ml SH-Puffer gewaschen und in 25 µl $1 \times$ Laemmli-Puffer (s. Kapitel 2.5.8) resuspendiert. Für die SDS-PAGE wurden die Proben 10 min bei RT geschüttelt, jedoch nicht gekocht, um die Aggregation hydrophober Membranproteine zu verhindern. Wurde im Anschluß an die *in organello* Translationsreaktion ein Quervernetzungsexperiment (s. Kapitel 2.5.5) durchgeführt, so wurde $1,5 \times$ Translationspuffer mit 30 mM Hepes/KOH pH 7,5 und ohne BSA verwendet.

2.4.8 Aggregation radioaktiv markierter Translationsprodukte in isolierten Mitochondrien

Die Aggregation mitochondrial kodierter Proteine wurde im Anschluß an deren radioaktive Markierung *in organello* (s. Kapitel 2.4.7) analysiert. Typischerweise wurden dafür 50 µg isolierte Mitochondrien eingesetzt. Diese wurden nach der *in organello* Translation in 100 µl Lysepuffer (1 % [w/v] Triton X-100, 50 mM KCl, 5 mM MgCl_2 , 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM PMSF) 15 min auf Eis solubilisiert. Anschließend wurde das Lysat zur Abtrennung nichtsolubilisierter Membranteile und großer Aggregate 5 min bei $1.000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Zur Gewinnung der aggregierten

Translationsprodukte wurde das Lysat nochmals für 20 min bei $390.000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und TCA gefällt (s. Kapitel 2.5.1). Die Pellets wurden in $1 \times$ Laemmlipuffer aufgenommen und zusammen mit dem Überstand mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Autoradiographie analysiert (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10 und Kapitel 2.5.11).

2.4.9 Isolierung von mitochondrialen Ribosomen aus *S. cerevisiae* und *N. crassa*

Die Reinigung von Ribosomen aus isolierten Mitochondrien erfolgte in zwei Stufen. Die Ribosomen wurden zunächst mit Hilfe eines Saccharosekissens aus mitochondrialem Lysat angereichert. Anschließend wurden sie resuspendiert und über einen linearen Saccharosegradienten gereinigt [97].

Als Ausgangsmaterial für Reinigungen im präparativen Maßstab dienten ca. 20 mg isolierte Hefemitochondrien (s. Kapitel 2.4.3) oder 2 g isolierte Mitochondrien aus *N. crassa* (s. Kapitel 2.4.4). Die Zusammensetzung der benötigten Puffer ist in Tabelle 2.6 beschrieben.

Tabelle 2.6: Puffer für die Isolierung mitochondrialer Ribosomen

| | <i>S. cerevisiae</i> | <i>N. crassa</i> |
|--------------------------------|---|--|
| Lysepuffer | 1 % TX, 50 mM KAcetat, 50 mM CaAcetat, 20 mM Tris pH 7,5, 2,5 mM DTT, 1 mM PMSF | 1 % TX, 100 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM PMSF |
| Saccharosekissen | 1,4 M Saccharose, 50 mM KAcetat, 50 mM CaAcetat, 20 mM Tris pH 7,5, 2,5 mM DTT | 1,4 M Saccharose, 100 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 20 mM Tris pH 7,5 |
| Resuspensions-/ Bindepuffer | 0,03 % DDM, 0,0045 % CL, 50 mM KAcetat, 10 mM MgAcetat, 20 mM Tris pH 7,5 | 0,03 % DDM, 0,0045 % CL, 100 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 20 mM Tris pH 7,5 |

Für die Reinigung der Ribosomen wurden frisch isolierte Mitochondrien in Lysepuffer aufgenommen und zur Solubilisierung 45 min bei 4°C rotiert. Nichtsolubilisierbare Membranbestandteile wurden anschließend durch Zentrifugation (5 min , $10.000 \times g$, 4°C) abgetrennt. Das Lysat wurde zur Pelletierung der Ribosomen über ein Saccharosekissen (Volumenverhältnis Kissen zu Probe 1:4) geschichtet und 2 h bei $275.000 \times g$, 4°C zentrifugiert. Der Überstand und das Saccharosekissen wurden verworfen und das ribosomale Pellet in ca. 500 μl Resuspensionspuffer durch

vorsichtiges Umschwenken aufgenommen. Um Aggregate abzutrennen, wurde die Ribosomensuspension kurz zentrifugiert (5 min, $10.000 \times g$, 4°C) und danach auf lineare Saccharosegradienten geladen. Nach dreistündiger Zentrifugation ($200.000 \times g$, 4°C) wurden die Gradienten in 250 μl Fraktionen geerntet und gleichzeitig deren RNA-Profil photometrisch (Messung bei 260 nm) bestimmt. Fraktionen, die assemblierte Ribosomen enthielten, wurden gesammelt und vereinigt. Die so gewonnenen mitochondrialen Ribosomen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung für Bindungsexperimente (s. Kapitel 2.5.7) bei -70°C gelagert.

2.4.10 Bestimmung von Enzymaktivitäten in isolierten Mitochondrien

Zur photometrischen Bestimmung mitochondrialer Enzymaktivitäten wurden Proteinmengen eingesetzt, die zu Extinktionsänderungen von 0,015 - 0,060 pro min führten. Anhand dieser Extinktionsänderungen wurden nach dem Lambert-Beer'schen Gesetz die jeweiligen Enzymaktivitäten berechnet. Alle Aktivitäten wurden in mindestens drei Wiederholungen bestimmt.

2.4.10.1 Bestimmung der Malatdehydrogenase Aktivität

Die Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert die Umsetzung von Malat zu Oxalacetat (und umgekehrt) in der mitochondrialen Matrix. Dabei fungiert NAD^+ als Elektronakzeptor bzw. NADH als Donor. Die Entstehung von NADH bzw. NAD^+ kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden.

Alle Messungen wurden bei 25°C in einem Endvolumen von 1 ml durchgeführt. Eine Standardreaktion enthielt 80 mM Oxalacetat und 0,4 mM NADH in 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4 und wurde durch die Zugabe von 15 μg in 0,5 % [v/v] Triton X-100 solubilisierter Mitochondrien gestartet. Die Änderung der Absorption wurde über einen Zeitraum von 200 sec verfolgt. Die Enzymaktivität wurde über die Steigung der Absorptionskurve im linearen Bereich (Zeitraum 40 - 80 sec) bestimmt und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes und des Extinktionskoeffizienten von NADH bei 340 nm ($6220 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) berechnet.

2.4.10.2 Bestimmung der Cytochrom *c*-Reduktase Aktivität

Die Cytochrom *c*-Reduktase katalysiert die Reduktion von Cytochrom *c* an der mitochondrialen Innenmembran. Diese Reaktion kann photometrisch bei 550 nm gemessen werden.

Alle Messungen wurden bei 25°C in einem Endvolumen von 1 ml durchgeführt. Typischerweise wurden hierfür 0,08 % [w/v] Cytochrom *c*, 0,1 mM KCN und 15 μg

in 0,5 % [v/v] Trition \times 100 solubilisierete Mitochondrien in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 eingesetzt. Die Reaktion wurde nach 20 sec durch die Zugabe von 1 mM NADH gestartet. Die Änderung der Absorption wurde über einen Zeitraum von 300 sec verfolgt. Die Enzymaktivität wurde über die Änderung der Absorption im linearen Kurvenbereich (Zeitraum 50 - 100 sec) bestimmt und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom *c* bei 550 nm beträgt $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.4.10.3 Bestimmung der Cytochrom *c*-Oxidase Aktivität

Die Cytochrom *c*-Oxidase katalysiert die Reoxidation von Cytochrom *c* an der mitochondrialen Innenmembran. Zur Bestimmung der Cytochrom *c*-Oxidase Aktivität wurde die Oxidation von Cytochrom *c* bei 550 nm verfolgt.

Eine 1 % [w/v] Cytochrom *c*-Lösung (in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5) wurde zunächst durch die Zugabe von Natriumdithionit vollständig reduziert (Farbumschlag) und anschließend direkt für die Messungen verwendet. Alle Messungen wurden bei 25 °C in einem Endvolumen von 1 ml durchgeführt. Eine Standardreaktion enthielt 0,08 % [w/v] reduziertes Cytochrom *c* in 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5 und wurde durch die Zugabe von 15 μg in 0,5 % [v/v] Trition X-100 solubilisierter Mitochondrien gestartet. Die Änderung der Absorption wurde über einen Zeitraum von 300 sec verfolgt. Die Enzymaktivität wurde über die Steigung der Absorptionskurve im linearen Bereich (Zeitraum 40 - 80 sec) und mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes berechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom *c* bei 550 nm beträgt $18,5 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

2.5 Proteinchemische Untersuchungsmethoden

2.5.1 Fällung von Proteinen mit TCA

Um Proteine aus wässrigen Lösungen auszufällen, wurden diese mit 18 % [w/v] TCA versetzt und 30 min auf Eis oder über Nacht bei $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Danach wurden die Proteine sedimentiert (45 min, $30.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$), in kaltem Aceton gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (15 min, $19.000 \times g$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$) 10 min bei RT getrocknet. Die Proben wurden in $1 \times$ Laemmli-Puffer (s. Kapitel 2.5.8) aufgenommen und durch Schütteln (15 min) resuspendiert.

2.5.2 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung des Proteingehalts wurde nach Bradford [19] durchgeführt. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Eichgeraden, die mit Hilfe eines vorgefertigten Proteinstandards (Immunglobulin G, Fa. BioRad) erzeugt wurde. Alle Proben

wurden für die Bestimmung mit einem 1:5 verdünnten Bradfordreagenz (Fa. BioRad) versetzt und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurde die Proteinmenge photometrisch (Messung bei 595 nm) bestimmt.

2.5.3 Expression und Reinigung rekombinanter Proteine

Die Expression rekombinanter Proteine erfolgte für alle Konstrukte in der gleichen Weise. Zunächst wurden die Plasmide mittels Elektroporation oder Hitzeschock (vgl. Kapitel 2.1.7) in kompetente *E. coli* BL21 (DE3)pLys S (Promega) oder XL1 blue Zellen eingebracht. Nach Selektion positiver Transformanten wurde ein Klon über Nacht in 10 ml LB_{Amp}-Medium bei 37 °C angezogen. Von dieser Kultur wurden am folgenden Tag 500 ml LB_{Amp}-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft. Sobald die Kultur eine OD₆₀₀ von 0,6 erreicht hatte, wurde die Expression der Proteine durch Zugabe von 1 mM IPTG induziert. Um eine optimale Ausbeute zu gewährleisten, wurde die Kultur ab diesem Zeitpunkt bei 24 °C inkubiert. Die Expression erfolgte über einen Zeitraum von 4 h. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (15 min, 3.000 × g, RT) geerntet und bei –20 °C gelagert.

Die Reinigung der exprimierten Proteine erfolgte gemäß den Angaben in den Herstellerprotokollen der verwendeten Expressionsvektoren.

Die Reinigung von Oxa1-His6 aus *N. crassa* erfolgte unter nativen Bedingungen nach Nargang *et al.* [96]. Als Startmaterial hierfür dienten 1,8 g isolierte Mitochondrien (s. Kapitel 2.4.4) aus dem *N. crassa*-Stamm K5-15-23-1 (s. Tabelle 2.4).

2.5.4 *in vitro* Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine

Um radioaktiv markierte Vorstufenproteine *in vitro* zu synthetisieren, wurde das in pGEM4 klonierte *GUF1*-Gen (vgl. Tabelle 2.1) mit Hilfe der SP6-Polymerase transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysat in Gegenwart von [³⁵S]Methionin translatiert. Ein Standardtranskriptionsansatz enthielt 30 µl Premix (40 mM Hepes/KOH pH 7,4, 6 mM Magnesiumacetat, 2 mM Spermidin, 100 µg/ml BSA, 10 mM DTT, 0,5 mM ATP/CTP/UTP, 0,1 mM GTP), 1 µl RNasin (40 U/µl), 2,5 µl M⁷G(5')ppp(5')G (2,5 mM) und 15 µl Plasmid-DNA. Der Ansatz wurde gemischt und die Transkription durch Zugabe von 1 µl SP6 RNA-Polymerase (25 U/µl) gestartet. Nach einstündiger Inkubation bei 37 °C wurde die RNA durch Zusatz von 5 µl 10 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol für 30 min bei –20 °C gefällt und anschließend für 30 min bei 25.000 × g (4 °C) zentrifugiert. Die gefällte RNA wurde mit 70 % [v/v] Ethanol gewaschen und nach erneuter Zentrifugation (10 min, 25.000 × g, 4 °C) 5 min bei RT getrocknet. Anschließend wurde die mRNA in 30 µl sterilem Wasser (unter Zusatz von 0,75 U RNasin) resuspendiert und bis zur Verwendung für die

Translationsreaktion bei -20°C gelagert.

Für die *in vitro* Translation mitochondrialer Vorstufenproteine wurden typischerweise 140 μl Kaninchen-Retikulozytenlysat, 4 μl RNasin, 8 μl Aminosäure-Mix (enthielt alle proteinogenen Aminosäuren mit Ausnahme von Methionin in einer Konzentration von 1 mM), 16 μl [^{35}S]Methionin (10 μCi) und 30 μl in sterilem Wasser suspendierte mRNA gemischt. Der Ansatz wurde 60 min bei 30°C inkubiert und anschließend 30 min bei $90.000 \times g$ (4°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C aufbewahrt.

2.5.5 Quervernetzung mitochondrialer Translationsprodukte

Die Quervernetzung von mitochondrialen Translationsprodukten mit mitochondrialen Proteinen wurde unter Translationsbedingungen (s. Kapitel 2.4.7) durchgeführt. Nach Inkubation bei 30°C (10 min) wurde das Quervernetzungsreagenz DSP zugegeben und für weitere 20 min bei 30°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 100 mM Glycin und 20 mM Methionin gestoppt. Anschließend wurden die Mitochondrien gewaschen, reisoliert und für die Immunfällung (s. Kapitel 2.5.6) eingesetzt.

2.5.6 Immunfällung von Proteinen

Um Interaktionen mitochondrialer Proteine mit quervernetzten Translationsprodukten nachzuweisen, wurden erstere mit Hilfe von Antikörpern aus mitochondrialem Lysat gefällt. Standardmäßig wurden dafür 150 μg isolierte Mitochondrien eingesetzt. Diese wurden nach *in organello* Translation (s. Kapitel 2.4.7) und ggf. Quervernetzung (s. Kapitel 2.5.5) in 80 μl Lysepuffer I (1 % [w/v] SDS, 50 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM PMSF) 30 min lang solubilisiert und nach kurzer Zentrifugation (5 min $10.000 \times g$, 4°C) mit Lysepuffer II (0,1 % [v/v] Triton X-100, 50 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7,5, 1 mM PMSF) auf 800 μl Probenvolumen verdünnt. Für die Immunfällung wurden die Proben geteilt und entweder mit 5 μl Präimmuneserum oder polyklonalem Antikörper inkubiert (1 h, 4°C). Durch Zugabe von 20 μl in Lysepuffer II äquilibrierter Protein A-Sepharose wurde der Antigen-Antikörperkomplex gebunden und gereinigt. Nach zweimaligem Waschen in Lysepuffer II wurden die Proben in $1 \times$ Laemmli-Puffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Autoradiographie (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10 und Kapitel 2.5.11) analysiert.

2.5.7 *in vitro* Bindung von gereinigtem Oxa1-His6 aus *N. crassa* an mitochondriale Ribosomen

Zur Bindung von gereinigtem Oxa1-His6 aus *N. crassa* (s. Kapitel 2.5.3) an mitochondriale Ribosomen (s. Kapitel 2.4.9) wurde das Protein in einem molaren Über-

schuß von 1:10 mit gereinigten Ribosomen inkubiert. Die Menge gereinigter Ribosomen wird üblicherweise in Absorptionseinheiten A_{260} angegeben. Eine A_{260} gereinigter Ribosomen entspricht einer OD von 1 in einem Volumen von 1 ml. Eine A_{260} gereinigter Ribosomen entspricht einer Menge von 24 pmol. Die Bindung erfolgte für 30 min auf Eis in 100 μ l Bindungspuffer (s. Tabelle 2.6). Um nichtgebundenes Protein abzutrennen, wurde der Ansatz auf 100 μ l 48 % [w/v] Saccharose in Bindungspuffer geschichtet und 2 h bei $150.000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die Bindung von Oxa1 an die Ribosomen wurde mittels SDS-PAGE und Immundekoration (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10 und Kapitel 2.6.4) analysiert.

2.5.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteingemische wurden mit Hilfe eines diskontinuierlichen vertikalen Gelsystems, bestehend aus Sammel-(Maße $15 \times 0,1 \times 2$ cm), Trenn- ($15 \times 0,1 \times 15$ cm) und Bodengel ($15 \times 0,1 \times 1$ cm), aufgetrennt [72]. Die einzelnen Gellösungen setzten sich dabei wie folgt zusammen:

- Sammelgel: 5 % [w/v] Acrylamid, 0,03 % [w/v] Bisacrylamid, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,1 % [w/v] SDS (zur Polymerisation 0,05 % [w/v] APS und 0,1 % [v/v] TEMED)
- Trenngel: 16 % [w/v] Acrylamid, 0,1 % [w/v] Bisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % [w/v] SDS (zur Polymerisation 0,05 % [w/v] APS und 0,15 % [v/v] TEMED)
- Bodengel: 20 % [w/v] Acrylamid, 0,13 % [w/v] Bisacrylamid, 375 mM Tris-HCl pH 8,8, 0,1 % [w/v] SDS (zur Polymerisation 0,05 % [w/v] APS und 0,25 % [v/v] TEMED)

Für die Durchführung der SDS-PAGE wurden die Proben in $1 \times$ Lammlipuffer (2 % [w/v] SDS, 5 % [v/v] β -Mercaptoethanol, 10 % [v/v] Glycerin, 60 mM Tris-HCl pH 6,8, 0,02 % [w/v] Bromphenolblau) aufgenommen.

Die Trennung erfolgte in 385 mM Glycin, 50 mM Tris-HCl und 0,1 % [w/v] SDS bei einem pH von 8,4 für die Dauer von ca. 2 h. Pro Gel wurde ein Strom von 25 mA angelegt. Als Molekulargewichtsstandard wurde ein Größenmarker der Firma Fermentas verwendet. Nach Beendigung der SDS-PAGE wurden die Gele entweder einer Färbung (s. Kapitel 2.5.9) unterzogen oder die getrennten Proteine wurden auf Nitrozellulosemembranen transferiert (s. Kapitel 2.5.10).

2.5.9 Coomassie-Blau-Färbung von SDS-Gelen

Der Nachweis von Proteinen im SDS-Gel erfolgte durch Färbung mit Coomassie-Blau in essigsaurer Methanollösung. Dazu wurden die Proteine 15 min in Lösung I (30 %

[v/v] Methanol, 7 % [v/v] Essigsäure) fixiert und anschließend 30 min in Lösung II (50 % [v/v] Methanol, 10 % [v/v] Essigsäure, 0,3 % [w/v] Coomassie Brilliant Blau R-250) gefärbt. Die Entfärbung der Gele erfolgte in Lösung I. Zur Konservierung wurden die Gele in wasserdurchlässiger Folie (Promega) getrocknet.

2.5.10 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen (Western Blotting)

Für den immunologischen Nachweis von Proteinen bzw. zur Detektion radioaktiver Signale wurden die zuvor elektrophoretisch getrennten Proben aus der Polyacrylamidgelmatrix auf eine Nitrozellulosemembran transferiert [142]. Geblottet wurde in einem 5 l Tank nach dem Wet Blot-Verfahren. Die SDS-Gele wurden dazu zusammen mit der Nitrozellulosemembran (Porengröße 0,2 µm, Protran BA83, Fa. Schleicher und Schuell) zwischen zwei Whatman Filterpapiere (MN 440 B) gelegt und in Transferpuffer (150 mM Glycin, 20 mM Tris-Base, 20 % [v/v] Methanol, 0,08 % [w/v] SDS) äquilibriert.

Der Transfer erfolgte bei 4 °C für ca. 2 h bei einem angelegten Strom von 380 mA. Die immobilisierten Proteine wurden auf der Membran durch fünfminütige Färbung mit 0,2 % [w/v] Ponceau S in 3 % [w/v] TCA sichtbar gemacht.

2.5.11 Autoradiographie und Densitometrie

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach SDS-PAGE (s. Kapitel 2.5.8) und Western Blotting (s. Kapitel 2.5.10) durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Dazu wurde ein Röntgenfilm (BioMax MR, Fa. Kodak) auf die Nitrozellulosemembran aufgelegt und je nach Signalintensität nach 12 h bis 3 Wochen entwickelt. Radioaktive Signale wurden mit Hilfe eines Phosphoimagers (Bas 3000, Fa. Fuji) quantifiziert.

2.6 Immunologische Untersuchungsmethoden

2.6.1 Herstellung polyklonaler Antikörper

Zur Herstellung von polyklonalen Antisera wurden Kaninchen mit rekombinanten Proteinen immunisiert. Für die Erstinjektion wurden 200 µg Protein in einem Volumen von 200 µl (üblicherweise Elutionspuffer) 1:1 mit TiterMax (Sigma) versetzt und 1 min auf dem Vortex-Gerät gemischt. Die Emulsion wurde subkutan in den oberen Schulterbereich des Kaninchens injiziert. Weitere Injektionen folgten im Abstand von 4 Wochen, wobei an Stelle von TiterMax inkomplettes Freund'sches Adjuvans verwendet wurde. Mit Ausnahme der Erstinjektion wurde den Kaninchen 10 - 12 Tage nach jeder Injektion 15 - 20 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei RT (ca. 1 h) wurde das Serum durch zweimalige

Zentrifugation gewonnen (5 min bei $3.000 \times g$, danach 15 min bei $20.000 \times g$, RT). Anschließend wurde der Überstand zur Inaktivierung des Komplementsystems für 30 min auf 56°C erhitzt. Gewonnene Antiseren wurden bei -20°C gelagert.

2.6.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Um eine hohe Spezifität in immunologischen Experimenten zu erhalten, wurden Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus gewonnenem Serum aufgereinigt. Dazu wurde zunächst das Antigen an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden. Zur Aktivierung des Säulenmaterials wurden 0,5 g Sepharose 4B in 10 ml 1 mM HCl suspendiert, für 20 min bei RT über Kopf geschüttelt und mit 200 ml 1 mM HCl gewaschen. Für die Kopplung des Antigens an die Matrix wurden ca. 3 - 5 mg des gereinigten Proteins in einem Volumen von 3,5 ml Kopplungspuffer (500 mM NaCl, 100 mM NaHCO_3 pH 8,3) aufgenommen (Umpufferung mittels PD10-Säule) und 1 h mit dem aktivierten Säulenmaterial bei RT geschüttelt. Nachdem ungebundenes Material entfernt worden war, wurde die Säule gepackt und mit 6 ml Kopplungspuffer gewaschen. Anschließend wurden freie Bindungsstellen mit 1 M Ethanolamin blockiert. Dazu wurde die Säule zunächst mit 4 ml 1 M Ethanolamin gewaschen und anschließend 2 h bei RT in 2 ml 1 M Ethanolamin geschüttelt. Danach wurde die Säule je drei Mal im Wechsel mit Waschpuffer I (500 mM NaCl, 100 mM Acetat pH 4,0) und Waschpuffer II (500 mM NaCl, 100 mM Tris pH 8,0) gewaschen. Zur Lagerung (bei 4°C) wurde die Säule in 5 ml 0,05 % [w/v] Natriumazid, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 äquilibriert.

Um die Antikörper zu reinigen, wurde die Säule bei RT in 10 ml 10 mM Tris pH 7,5 äquilibriert. Für die Bindung der Antikörper wurden 6 ml Serum mit 24 ml 10 mM Tris pH 7,5 gemischt, mit 1 mM PMSF und 1 mM EDTA versetzt und drei Mal über die Säule gegeben. Anschließend wurde die Säule mit je 10 ml 10 mM Tris pH 7,5 und 500 mM NaCl in 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen. Eluiert wurden die Antikörper mit je 10 ml 100 mM Natriumcitrat pH 4,0 und 10 ml 100 mM Glycin pH 2,5, wobei jeweils 1 ml Fraktionen gesammelt wurden. Alle Fraktionen wurden unmittelbar danach mit 200 μl Tris pH 8,8 neutralisiert und bei -20°C gelagert. Zur Lagerung der Säule wurde diese mit 10 ml 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen und in 0,05 % [w/v] Natriumazid, 100 mM Tris-HCl pH 8,0 äquilibriert.

2.6.3 Verwendete Antikörper

Tabelle 2.7 gibt einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper. Die polyklonalen Seren bzw. gereinigten Antikörper wurden für Western Blot-Analysen (vgl. Kapitel 2.5.10) und Immunfällungen (s. Kapitel 2.5.6) eingesetzt. Der monoklonale His6-Antikörper und der HA-Antikörper wurden kommerziell be-

Tabelle 2.7: Verwendete Antikörper und -seren

| Antikörper | Beschreibung | zur Dekoration |
|--------------------------------------|--|----------------|
| α -His6 | gegen Hexahistidin-tag | 1:1.000 |
| α -HA | gegen Hämagglutinin-tag | 1:200 |
| α -Tom70 (Hefe) | gegen His6-Tom70 (40-617) | 1:1.000 |
| α -Oxa1N (Hefe) | gegen Oxa1 N-Terminus, Sequenz: SIDEALTSSAPSLASTSD | 1:500 |
| α -Mrp51 (Hefe) | | 1:500 |
| α -Mrp20 (Hefe) | gegen MBP-Mrp20 | 1:1.000 |
| α -Mrp4 (Hefe) | gegen His6-Mrp4 (1: 394) | 1:500 |
| α -Mrpl36 (Hefe) | gegen GST-Mrpl36 (<i>E. coli</i> L31-Homolog) | 1:1.000 |
| α -Hep1 (Hefe) | gegen His6-Hep1 (74-205) | 1:500 |
| α -Hexokinase (Hefe) | | 1:1.000 |
| α -Bmh2 (Hefe) | gegen Bmh2 C-Terminus | 1:500 |
| α -Oxa1N (<i>N. crassa</i>) | gegen MBP-Oxa1 (70-142) | 1:500 |
| α -Tom70 (<i>N. crassa</i>) | | 1:1.000 |
| α -L23 (<i>N. crassa</i>) | gegen MBP-L23 (1-228) | 1:2.000 |
| α -YmL36 (<i>N. crassa</i>) | gegen His6-YmL36 (48-219) (<i>E. coli</i> L31-Homolog) | 1:2.000 |

zogen (Amersham Biosciences, Europe und Santa Cruz, USA). Der Antikörper gegen Mrp51 wurde freundlicherweise von Tom D. Fox (Cornell University, USA) zur Verfügung gestellt.

2.6.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Für den Nachweis von Proteinen mit Antikörpern wurden Nitrozellulosemembranen zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen 1 h in Blockierlösung (5 % [w/v] Magermilchpulver oder 3 % [w/v] BSA in $1 \times$ TBS) geschwenkt. Anschließend wurden diese 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C mit einer verdünnten Antikörperlösung (in 5 % [w/v] Magermilchpulver oder 3 % [w/v] BSA in $1 \times$ TBS) inkubiert. Antiseren und gereinigte Antikörper wurden entsprechend den Angaben in Tabelle 2.7 eingesetzt. Anschließend wurde drei Mal 10 min in $1 \times$ TBS (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,5) gewaschen und für 45 - 90 min mit einem Antikörperkonjugat von Meerrettich-Peroxidase und IgGs gegen Kaninchen (bzw. Maus bei monoklonalen His- und HA-Antikörpern) inkubiert (1:10.000 in 5 % [w/v] Magermilchpulver oder 1:5.000 in 3 % [w/v] BSA in $1 \times$ TBS). Für die Detektion wurden die Membranen erneut drei Mal 10 min in $1 \times$ TBS gewaschen und 1 min mit Luminol-Reagenz (1,1 mM Luminol, 0,2 mM Cumarinsäure, 0,25 mM H₂O₂, 100 mM Tris-HCl pH 8,5) inkubiert. Die Nitrozellulosemembranen wurden zwischen zwei transparente Folien

gelegt und 5 sec bis 10 min auf Röntgenfilme der Fa. Kodak aufgelegt.

2.7 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

| | |
|-------------------------------------|--|
| Agfa-Gevaert (München) | Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme |
| Amersham Biosciences (Braunschweig) | Protein A-Sepharose |
| Behringwerke (Marburg) | Freund's inkomplettes Adjuvans |
| BioRad (München) | Bradford Proteinreagenzlösung, Meerrettich Peroxidase gekoppelte IgGs aus Ziege gegen Kaninchen und Maus |
| Boehringer (Mannheim) | ATP, dNTPs, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, Proteinase K |
| DIFCO (Detroit, USA) | Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto- Trypton, Hefeextrakt |
| Fermentas | Proteinmarker |
| Fluka (Buchs, Schweiz) | Tris-Base |
| Fuji (Tokyo, Japan) | Super RX Fuji Medical X-Ray Film 100 MF |
| Gerbu (Gaiberg) | Acrylamid, DTT, NADH |
| Gibco-BRL (Eggenstein) | Agarose |
| Glycon Biotech (Luckenwalde) | DDM |
| Kodak (München) | BioMax MR Kodak TR-1 Film |
| Metabion (München) | Primer |
| ICN Pharmaceuticals (Eschwege) | [³⁵ S]Methionin |
| Invitrogen (Karlsruhe) | DH5 α |
| Nestle-Alete (München) | Magermilchpulver |
| New England Biolabs (Schwalbach) | Restriktionsenzyme, T4 DNA Ligase, DNA Größenstandard |
| PeqLab | Gel Extraction Kit |
| Promega (Heidelberg) | BL21(DE3)pLysS, pGem4 Vektor, Pure Yield TM Plasmid Midiprep System |
| Qiagen | pQE30 Vektor, <i>E. coli</i> XL-1 blue |
| Serva (Heidelberg) | Bisacrylamid, fettsäurefreies BSA, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blue R-250, Harnstoff, Hepes, Lysozym, Ponceau S, TEMED, Xylenxyanol |
| Schleicher & Schuell (Kassel) | Protran Nitrozellulosemembran BA83 |
| Sigma (München) | Aminosäuren, APS, Ampicillin, Ethidiumbromid, Glycerin, |

| | |
|--------------------------|--|
| | Lachsspermien-DNA, β -Mercaptoethanol, PMSF, TCA, TiterMax Triton X-100, Valinomycin A |
| Seikagaku (Tokyo, Japan) | Zymolyase |

Ethanol, Isopropanol und Methanol wurden von der Chemikalienausgabe der LMU München bezogen. Alle weiteren Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

2.8 Geräte

| | |
|----------------------------|---|
| Agarosegel Dokumentation | The Imager-Imaging-System, Appligene |
| Blotapparaturen/Blotroller | Werkstatt des Instituts für Physiologische Chemie, München |
| Brutschränke | Heraeus Christ |
| CD-Spektrophotometer | J-715 Spektrophotometer, Jasco |
| Chromatographiesysteme | GE HealthCare |
| Elektroporationssystem | Gene Pulser, BioRad |
| Entwicklermaschine | Gevamatic 60, Agfa-Gevaert |
| Feinwaagen | Sartorius |
| Gelkammern | Werkstatt des Instituts für Physiologische Chemie, München |
| Inkubatoren | Infors |
| Mastercycler Gradient | Eppendorf |
| Phosphoimager | BAS-300, Fuji |
| Spannungsversorgung | Amersham Pharmacia Biosciences |
| Sterilbänke | BDK |
| Thermostate | Eppendorf |
| Überkopfschüttler | Werkstatt des Instituts für Physiologische Chemie, München |
| Vortex-Schüttler | Bender und Hobein |
| Zentrifugen | Beckman Coulter Instruments, Eppendorf, Sigma, Hettich |

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 Identifizierung und funktionelle Charakterisierung der GTPase Guf1 aus *S. cerevisiae*

Um die kotranslationale Proteininsertion in die innere Mitochondrienmembran näher zu charakterisieren und neue regulatorische Faktoren zu identifizieren, wurde eine Datenbanksuche (www.yeastgenome.org) gestartet. Gesucht wurde dabei nach Zielproteinen, die

- über Walker A- und B-Motive (ATP-Bindemotive [148]) verfügen
- mitochondrial lokalisiert sind, d.h. ein N-terminales mitochondriales Zielführungssignal besitzen, und
- funktionell noch nicht charakterisiert waren.

Tabelle 3.1 zeigt eine Liste der erhaltenen Kandidaten. Zu den identifizierten Proteinen gehörte das Protein Guf1. Guf1 steht für GTPase unbekannter Funktion (GTPase of unknown function). Identifiziert wurde Guf1 bereits vor einigen Jahren im Rahmen eines Sequenzierungsprojekts [65]. Bereits damals wurde diese GTPase der Klasse der Elongationsfaktoren zugeordnet, jedoch wurde sie funktionell bis heute nicht charakterisiert.

3.1.1 Guf1 ist eine hochkonserviertes Protein und gehört zur LepA-Familie elongationsfaktorähnlicher GTPasen

Um zunächst Hinweise auf eine mögliche Funktion von Guf1 zu erhalten, wurde eine Sequenzanalyse und Suche nach homologen Proteinen in anderen Organismen gestartet. Homologe von Guf1 fanden sich sowohl in Bakterien als auch in allen mitochondrienhaltigen Eukaryoten. In Archaeobakterien konnten keine zu Guf1 homologen Proteine identifiziert werden.

Tabelle 3.1: Nukleotidbindende Proteine unbekannter Funktion in Mitochondrien

| ORF | kodiertes Gen | Wachstumsphänotyp |
|---------|-------------------|--|
| YOR205c | <i>LRC5/FMP38</i> | Deletion führt zu Wachstumsdefekt auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen |
| YLR289w | <i>GUF1</i> | Deletion führt zu keinerlei Wachstumsdefekten in Vollmedien |
| YOL095c | <i>HMI1</i> | Deletion führt zu Wachstumsdefekt auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen |
| YMR023c | <i>MSS1</i> | Deletion führt in Kombination mit Mutation in der 15S rRNA zu einem respiratorischen Phänotyp |
| YGR028w | <i>MSP1/YTA4</i> | Deletion führt zu keinerlei Wachstumsdefekten in Vollmedien |
| YMR097c | <i>MTG1</i> | Deletion führt zu Wachstumsdefekt auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen und Verlust mitochondrialer DNA; Verlust mitochondrialer Translation |
| YHR168w | <i>MTG2</i> | Deletion führt zu Wachstumsdefekt auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen; Verlust mitochondrialer Translation |
| YGL129c | <i>RSM23</i> | Deletion führt zu Wachstumsdefekt auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen |
| YHR080c | - | nichtessentiell Gen; keine genauen Angaben zum Wachstumsphänotyp der Deletionsmutante |

Die Abb. 3.1 und 3.2 zeigen den Aufbau verschiedener Mitglieder der Guf1-Proteinfamilie und deren phylogenetische Einordnung innerhalb der Klasse der Elongationsfaktoren.

Das zu Guf1 homologe Protein in *E. coli* ist LepA. Dieses war kürzlich als hochkonservierte GTPase identifiziert und charakterisiert worden ([114] [81]; s. auch Kapitel 1.3). Alle Mitglieder der LepA/Guf1-Familie wiesen einen extrem hohen Grad an Sequenzidentität auf (ca. 48 %). Jedes der analysierten Proteine zeichnete sich durch fünf typische Domänen aus, wobei die ersten vier (I-IV, Abb. 3.1) strukturell stark den Domänen I, II, III und V des Elongationsfaktors EF-G ähnelten. Ein Bereich, der der Domäne IV von EF-G entsprach, konnte hingegen nicht identifiziert werden. Stattdessen wiesen alle analysierten Proteine eine fünfte C-terminale Domäne auf, die ebenfalls konserviert war (vgl. Abb. 3.1, LepA_C).

Innerhalb der Klasse der Elongationsfaktoren bilden die LepA/Guf1-Proteine ihre eigene Familie aus (vgl. Abb. 3.2). Trotz der engen Verwandtschaft zwischen den LepA/Guf1-Proteinen und der Familie der EF-G-Proteine unterscheiden sich die

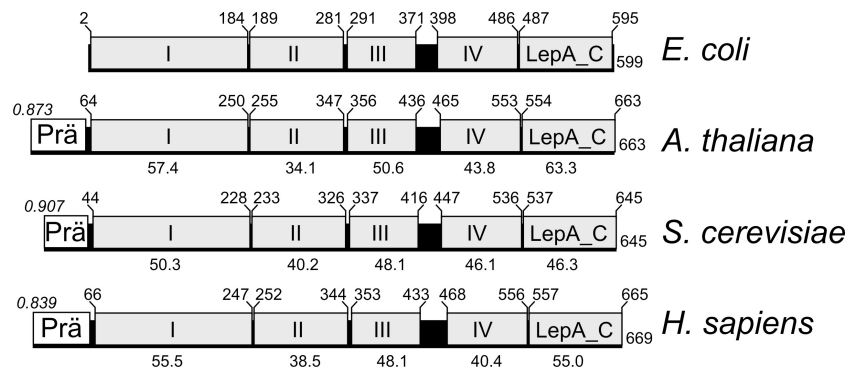


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der strukturellen Domänen in LepA/Guf1-Proteinen. Die Domänen I-IV und LepA_C waren bereits kürzlich definiert worden ([114] [65]). Prä, Mitochondriales Zielführungssignal. Über den Zielführungssignalen angegebene Werte geben die Wahrscheinlichkeit für eine Lokalisation in Mitochondrien an (berechnet mit Hilfe des Target.P Algorithmus). Über den Domänen angegebene Zahlen definieren deren Position in den Proteinen. Die Zahlen unterhalb der Domänen geben die Prozentzahl an identischen Aminosäuren im Vergleich zu LepA an. Für die Analyse wurden folgende Sequenzen verwendet: *E. coli* LepA (AAA24063.1), *A. thaliana* Guf1 (NP_198806.2) und *H. sapiens* Guf1 (Q8N442).

se in phylogenetischer Hinsicht. Neben der C-terminalen LepA/Guf1-spezifischen Domäne (LepA_C, s. Abb. 3.1) deutet auch das Fehlen der EF-G Domäne IV in den LepA/Guf1-Proteinen auf eine eigene Subfamilie innerhalb der Elongationsfaktoren hin. Der Stammbaum spricht für eine entwicklungsgeschichtlich frühe Spaltung der GTPasen in drei Subfamilien, die sich in Bakterien und Mitochondrien im Laufe der Evolution nahezu unverändert erhalten haben. Die Klasse der elongationsfaktorähnlichen GTPasen läßt sich damit in drei Gruppen unterteilen: Die Familie der EF-Tu-Proteine, die der EF-G-Proteine und die Familie der LepA/Guf1-Proteine (vgl. Abb. 3.2).

Neben den oben beschriebenen Merkmalen wiesen alle eukaryotischen Mitglieder der LepA/Guf1-Familie zusätzliche N-terminale Sequenzabschnitte auf (Prä, Abb. 3.1). Diese zeichneten sich durch typische Eigenschaften N-terminaler Zielführungssignale aus, was auf eine Lokalisierung der Guf1-Proteine in Mitochondrien bzw. Chloroplasten schließen läßt.

3.1.2 Guf1 ist in Mitochondrien lokalisiert

Guf1 ist eine hochkonservierte GTPase, die in allen Organismen mit Ausnahme von Archaeobakterien vorkommt. Für alle eukaryotischen Organismen wird eine Lokalisierung in Mitochondrien bzw. Chloroplasten vorhergesagt (s. Kapitel 3.1.1).

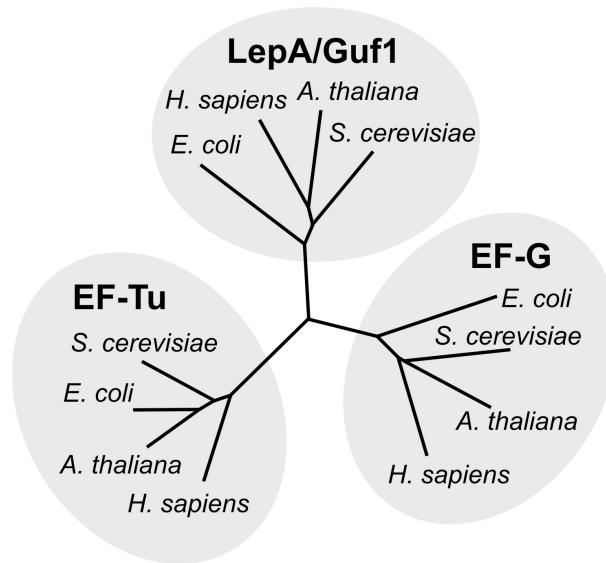


Abbildung 3.2: Ungewurzelter phylogenetischer Stammbaum elongationsfaktorähnlicher GTPasen. Die Sequenzanalyse wurde durchgeführt für die Elongationsfaktoren EF-Tu, EF-G und LepA/Guf1 aus *S. cerevisiae*, *A. thaliana*, *E. coli* und *H. sapiens*. Verwendet wurde dafür der Clustal_X Algorithmus [141] und ein manuelles 'refinement'-Verfahren (MacClade Software Package, Sinauer Associates Inc.)

Um diese Vorhersage für Guf1 aus *S. cerevisiae* biochemisch zu bestätigen, wurde eine Subfraktionierung von Hefezellen durchgeführt. Dazu wurde ein Hefestamm, in dem Guf1 einen C-terminalen $3 \times$ HA-tag trug, verwendet. Abb. 3.3 zeigt die Analyse der einzelnen Fraktionen mittels SDS-PAGE und Western Blot. Als Markerproteine wurden Bmh2 und Hexokinase für das Zytosol sowie Oxa1 und Mrpl36 für gereinigte Mitochondrien eingesetzt.

Im Gegensatz zu den zytosolischen Markerproteinen Hexokinase und Bmh2 wurden die mitochondrial lokalisierten Proteine Oxa1 und Mrpl36 spezifisch mit der mitochondrialen Fraktion angereichert. Für die zytosolischen Marker ergab sich dagegen kein Signal in der mitochondrialen Fraktion. Sie wurden ausschließlich im postmitochondrialen Überstand nachgewiesen.

Um Guf1 spezifisch nachzuweisen, wurde mit einem monoklonalen Antikörper gegen den HA-tag dekoriert. Dieser erkannte sowohl im Zellextrakt (Abb. 3.3, T) als auch in den Mitochondrien (Abb. 3.3, M) aus dem getaggen Guf1-Stamm ein Protein von ca. 72 kDa. Im Gegensatz dazu ergab die Dekoration der zytosolischen Fraktion (s. Abb. 3.3, Ü) kein Signal, ebenso wie der zu Kontrollzwecken geladene Zellextrakt aus Wildtyp-Hefen (Abb. 3.3, wt, T). Damit konnte die vorhergesagte mitochondriale Lokalisation von Guf1 bestätigt werden. Dies wurde zusätzlich durch verschiedene Importexperimente bestätigt (Daten nicht gezeigt).

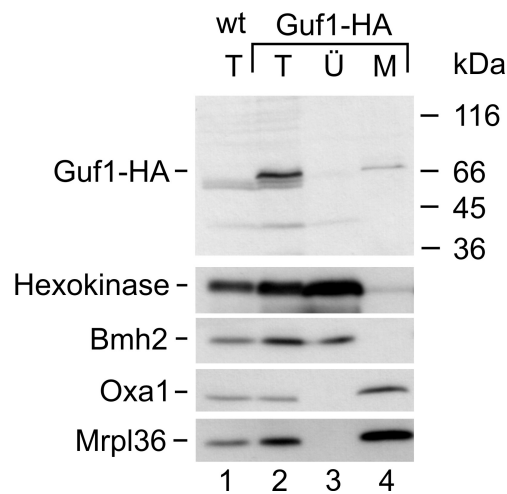


Abbildung 3.3: Guf1 ist in Mitochondrien lokalisiert. Für die Lokalisierung von Guf1 wurden Hefezellen in Mitochondrien und postmitochondrialen Zellextrakt subfraktioniert und mittels SDS-PAGE und Immundekoration analysiert. Pro Probe wurden 50 µg Protein aufgetragen. wt, Wildtyp, T, Totalextrakt, Ü, Postmitochondrialer Überstand, M, Mitochondriale Fraktion.

3.1.3 Guf1 ist ein membranständiges Matrixprotein

Für die exakte Lokalisierung von Guf1 in den Mitochondrien wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Zum einen wurden mitochondriale Membranen mit ungepuffertem Natriumcarbonat oder mit Harnstoff extrahiert. Zum anderen wurden isolierte Mitochondrien und Mitoplasten mit PK behandelt. Alle Proben wurden anschließend mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Als Markerproteine dienten Tom70 für die mitochondriale Außenmembran, Oxa1 für die Innenmembran und Mrpl36 und Hep1 für die mitochondriale Matrix.

Um aus isolierten Mitochondrien Mitoplasten zu erzeugen, wurden diese zunächst in hypotonem Medium inkubiert. Dadurch wird die mitochondriale Außenmembran zerstört, wohingegen die Innenmembran intakt bleibt. Bei einer nachfolgenden Proteasebehandlung sind somit nicht nur die Proteine der Außenmembran einem Abbau zugänglich, sondern auch alle Proteine des Intermembranraumes und Innenmembranproteine, die Segmente in den Intermembranraum exponieren.

Die Analyse der Mitochondrien und Mitoplasten, die mit PK behandelt wurden, ist in Abb. 3.4 dargestellt. Für Guf1 ergab sich das gleiche Bandenmuster wie für die Matrixproteine Mrpl36 und Hep1. Alle drei Proteine waren gegenüber einem Abbau durch PK in intakten Mitochondrien und Mitoplasten resistent (Abb. 3.4, Spuren 2 und 3). Tom70 und Oxa1 dagegen wurden in Mitochondrien bzw. Mitoplasten abgebaut. In Anwesenheit von Detergenz war keines der Markerproteine nachweisbar (Abb. 3.4, Spur 4). Durch die Solubilisierung der mitochondrialen Membranen waren

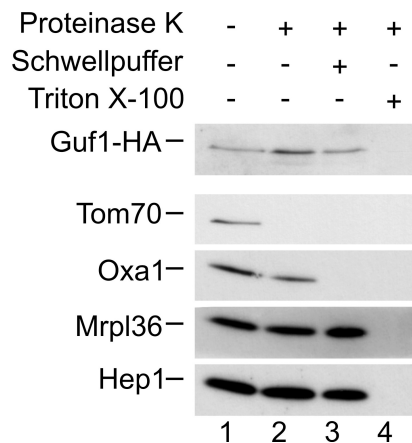


Abbildung 3.4: Guf1 ist ein mitochondriales Matrixprotein. Isolierte Mitochondrien wurden unter isoosmotischen oder hypoosmotischen Bedingungen mit 50 µg/ml PK behandelt und mittels SDS-PAGE und Immundekoration analysiert. Pro Spur wurden je 100 µg Protein aufgetragen. In Spur 4 wurden die Mitochondrien vor dem PK-Verdau mit 1 % [v/v] Triton-X 100 solubilisiert.

alle Proteine einem Abbau durch PK zugänglich. Daraus ergab sich für Guf1 eine Lokalisierung in der mitochondrialen Matrix.

Um zu untersuchen, ob Guf1 möglicherweise peripher an die Innenmembran angelagert ist, wurden mitochondriale Membranen mit ungepuffertem Natriumcarbonat bzw. mit Harnstoff extrahiert. Durch diese Behandlung werden peripher assoziierte Proteine von der Membran abgelöst, integrale Membranproteine dagegen bleiben verankert und können durch Zentrifugation von der löslichen Proteinfraction abgetrennt werden. Abb. 3.5 zeigt die Analyse der mit Natriumcarbonat und Harnstoff extrahierten Proben.

Oxa1 als integrales Membranprotein befand sich erwartungsgemäß unter beiden Bedingungen in der Membranfraction (s. Abb. 3.5, Spuren 2 und 4). Das N-terminal verankerte Protein Tom70 dagegen blieb bei der milderen Harnstoffextraktion in der Membranfraction, während es durch die Behandlung mit Natriumcarbonat aus der Membran extrahiert wurde (vgl. Abb. 3.5, Spuren 3 und 5). Hep1 wurde als Marker für lösliche Matrixproteine verwendet und konnte unter beiden Bedingungen in der löslichen Fraction nachgewiesen werden (s. Abb. 3.5, Spuren 3 und 5).

Mrpl36 ist als ribosomales Protein mit mitochondrialen Ribosomen assoziiert. Diese gelten in Hefemitochondrien als membranständig. Erwartungsgemäß befand sich daher Mrpl36 unter den milden Harnstoffbedingungen teilweise in der Membranfraction, während es durch die Extraktion mit Natriumcarbonat vollständig von den Membranen abgelöst wurde (s. Abb. 3.5, Spuren 3-5).

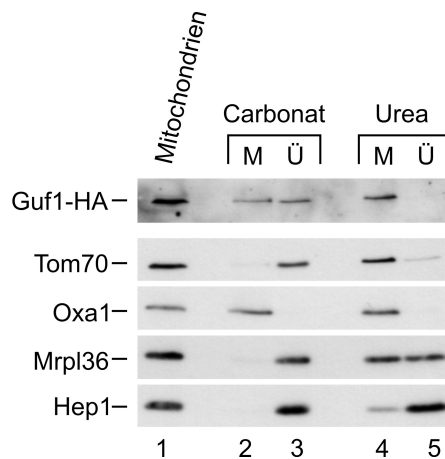


Abbildung 3.5: Guf1 ist ein peripher assoziiertes Membranprotein. Je 100 μg isolierte Mitochondrien wurden mit Carbonat oder Urea extrahiert. Extrahierte Membranen wurden von löslichen Proteinen durch Zentrifugation getrennt und beide Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration analysiert. M, Membranfraktion, Ü, lösliche Proteinfraction (Überstand).

Guf1-HA verblieb bei der Extraktion mit Harnstoff vollständig in der Membranfraktion (s. Abb. 3.5, Spur 4). Durch die Inkubation mit Carbonat hingegen wurde es teilweise von der Membran abgelöst (Abb. 3.5, Spuren 2 und 3). Damit konnte Guf1 als peripher assoziiertes Innenmembranprotein identifiziert werden.

3.1.4 Die Deletion von Guf1 führt zur Beeinträchtigung des Wachstums unter suboptimalen Kulturbedingungen

Um im Folgenden die Funktion von Guf1 näher charakterisieren zu können, wurde zunächst nach Bedingungen gesucht, unter denen sich die Deletion von Guf1 auf das Wachstum von Hefen auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen (z. B. Glycerin) auswirkte. Bereits bekannt war, daß die Deletion des Proteins unter normalen Kulturbedingungen keinerlei Auswirkungen zeigt [65]. Aus diesem Grund wurden verschiedene Wachstumsbedingungen getestet, unter anderem verschiedene Salze im Medium, suboptimale Temperaturen und unterschiedliche Konzentrationen an Kohlenstoffquellen.

In Abb. 3.6A ist das Wachstumsverhalten von Guf1-Deletionsmutanten im Vergleich zu Wildtyp-Hefen unter Kohlenstoff-limitierten Bedingungen dargestellt. Während sich in Medium, das mit 2% [v/v] Glycerin supplementiert worden war, keine Unterschiede im Wachstum der beiden Stämme ergaben, war das Wachstum der Deletionsmutante in Medium mit reduziertem Glyceringehalt (0,5 bzw. 0,1% [v/v]) deutlich beeinträchtigt.

Ein ähnlicher Wachstumsdefekt ergab sich für die Mutante auch bei suboptimalen

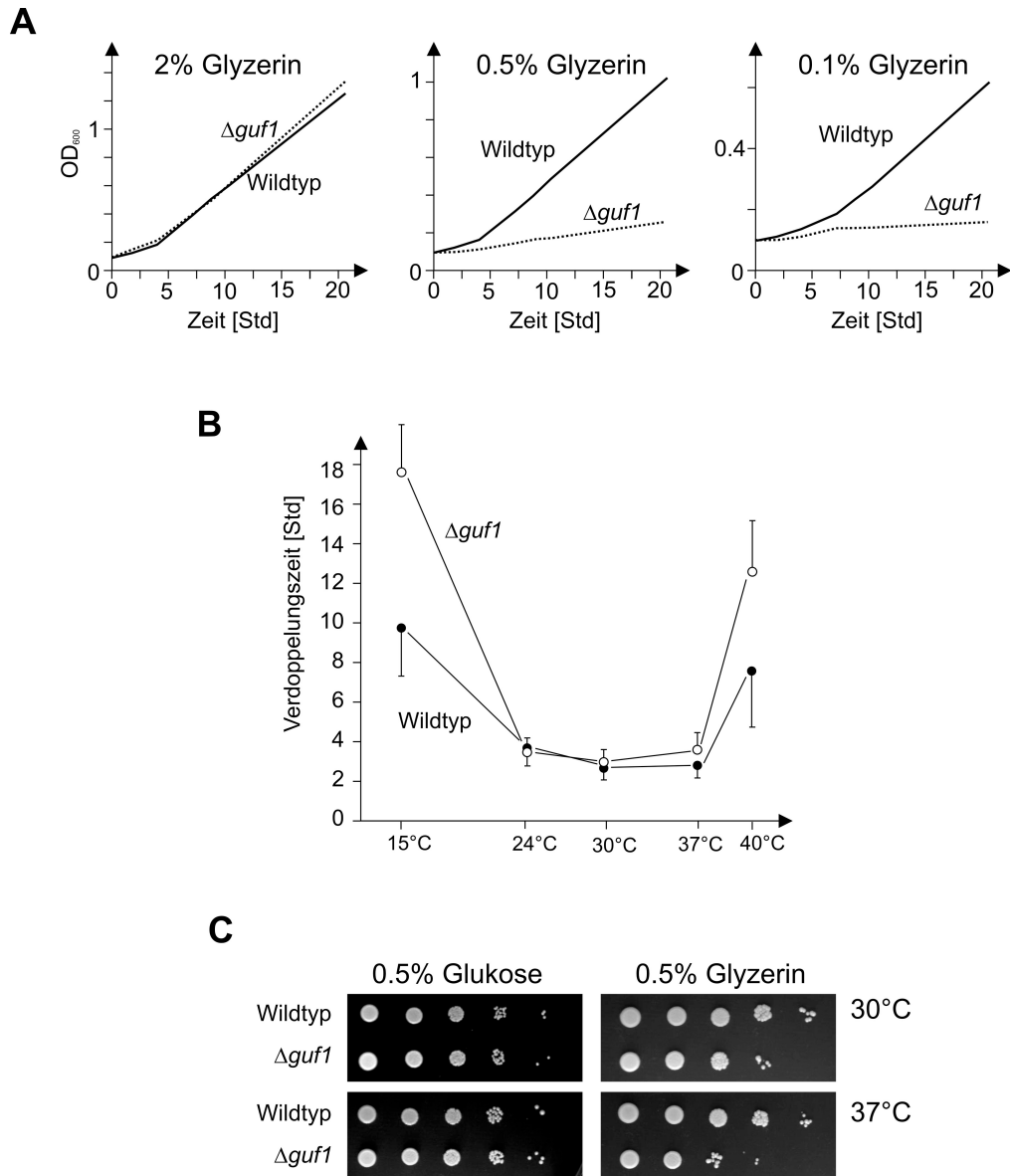


Abbildung 3.6: Das Wachstum von $\Delta guf1$ -Mutanten ist unter suboptimalen Bedingungen beeinträchtigt. A) Wachstum von Wildtyp-Hefen und $\Delta guf1$ -Mutanten (genetischer Hintergrund BY4742) unter Kohlenstoff-limitierten Bedingungen. Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Hefen wurden in YP-Medium mit 2, 0,5 und 0,1% [v/v] Glycerin bei 30 °C inkubiert. Das Wachstum wurde durch Messung der Zelldichte bei 600 nm über einen Zeitraum von ca. 20 h verfolgt. B) Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Zellen wurden in YP-Medium mit 2% [v/v] Glycerin bei den angegebenen Temperaturen inkubiert. Die Berechnung der Verdoppelungszeiten erfolgte anhand von drei unabhängigen Testreihen. C) Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Zellen wurden in YP-Medium mit 2% [w/v] Galaktose bis zu einer OD_{600} von ca. 1,0 bei 30 °C angezogen, gewaschen und auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt. Von einer 1:10 Verdünnungsreihe wurden je 3,5 μ l auf YP-Platten mit 0,5% [w/v] Glukose oder Glycerin aufgetragen und bei 30° bzw. 37 °C inkubiert.

Temperaturen. Abb. 3.6B zeigt die Verdoppelungszeiten des Wildtyp-Hefestammes und der Guf1-Deletionsmutante in Abhängigkeit von der Temperatur. Innerhalb eines Bereichs von ca. 24 °C bis 30 °C ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede für das Wachstum der beiden Stämme. Im Gegensatz dazu benötigte die Deletionsmutante bei suboptimalen Temperaturen (15 °C, 40 °C) deutlich länger, um sich zu verdoppeln. Das Wachstum war unter diesen Bedingungen gegenüber dem des Wildtyp-Hefestammes deutlich beeinträchtigt.

Das verzögerte Wachstum der Deletionsmutante gegenüber dem Wildtyp-Hefestamm unter suboptimalen Bedingungen wurde auch durch Wachstumsanalysen auf festen Medien bestätigt. Abb. 3.6C zeigt das Verhalten von beiden Stämmen bei 30 °C und 37 °C unter Kohlenstoff-limitierten Bedingungen. Auf Medium, welches nur 0,5 % [v/v] Glycerin enthielt, war das Wachstum der $\Delta guf1$ -Mutante im Vergleich zu dem des Wildtyp-Stammes beeinträchtigt. Dieser Effekt wurde durch Inkubation bei 37 °C noch vertärkt. Zu Kontrollzwecken wurden beide Stämme auch auf Medium plattiert, welches die fermentierbare Kohlenstoffquelle Glukose in vergleichbarer Konzentration enthielt. Erwartungsgemäß ergaben sich hier keine Unterschiede. Zusammenfassend läßt sich sagen, daß Guf1 für das Wachstum von Hefen unter optimalen Kulturbedingungen nicht benötigt wird. Unter restriktiven Bedingungen dagegen führt die Deletion von Guf1 zu einer Beeinträchtigung des Wachstums auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen.

3.1.5 Guf1 bindet GTP-abhängig an mitochondriale Ribosomen

Die Zugehörigkeit von Guf1 zur Klasse der Elongationsfaktoren und die enge Verwandtschaft zu EF-G legen eine Funktion in der Proteintranslation nahe. Um dies zu testen, wurde zunächst untersucht, ob Guf1 GTP-abhängig an mitochondriale Ribosomen binden kann. Dazu wurden isolierte Mitochondrien unter Bedingungen inkubiert, welche die mitochondriale Translation begünstigten. Um eine GTP-Abhängigkeit der Bindung festzustellen, wurden die Proben während der Translation mit einem Überschuß an GDP oder dem nichthydrolysierbaren GTP-Analog GTP γ S behandelt. Danach wurden die mitochondrialen Ribosomen durch Zentrifugation pelletiert und die Bindung von Guf1 mittels SDS-PAGE und Immunoblot untersucht. Abb. 3.7 zeigt die Analyse der ribosomalen Pelletfraktionen gegenüber den nichtgebundenen Matrixproteinen im Überstand. Mrp51 und Mrp136 befanden sich als Proteine der großen und kleinen Ribosomenuntereinheit erwartungsgemäß in der Pelletfraktion (Abb. 3.7, P). Hep1 hingegen konnte als Matrixprotein in der Fraktion löslicher Proteine nachgewiesen werden (s. Abb. 3.7, Ü).

Für Guf1 ergab sich eine Verteilung in Abhängigkeit von GTP, GDP bzw. GTP γ S. In Proben, die mit einem Überschuß an GDP behandelt wurden, war Guf1 nicht mit Ribosomen assoziiert und verblieb in der löslichen Matrixfraktion. In Anwesenheit

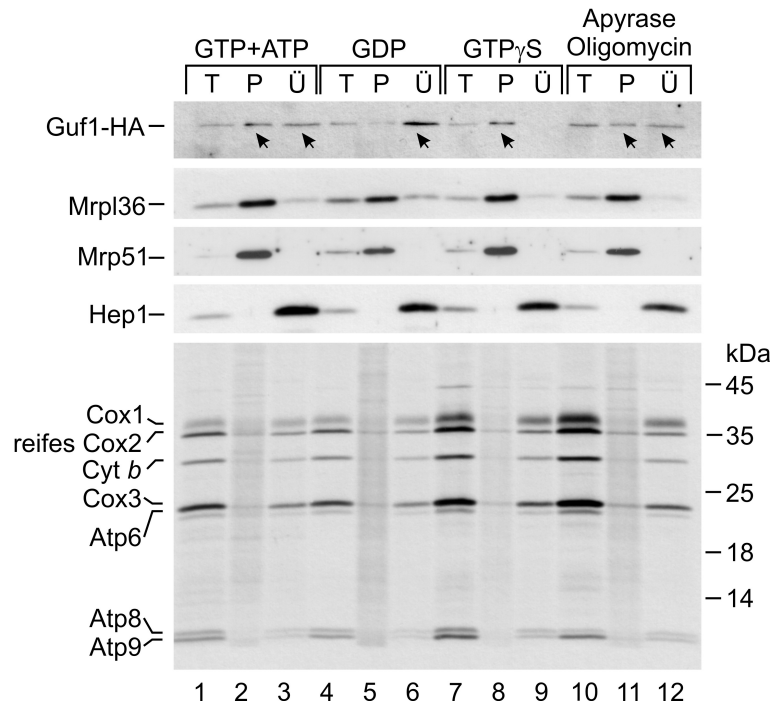


Abbildung 3.7: Guf1 bindet GTP-abhängig an mitochondriale Ribosomen. Isolierte Mitochondrien wurden 10 min in Anwesenheit von [35 S]Methionin unter Translationsbedingungen inkubiert. Die Proben wurden geteilt und anschließend weitere 10 min mit einem Überschuß an ATP/GTP (Spuren 1-3), GDP (Spuren 4-6), GTP γ S (Spuren 7-9) oder Apyrase/Oligomycin (Spuren 10-12) inkubiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, lysiert und die Ribosomen durch 1,4 M Saccharosekissen zentrifugiert und gereinigt. Die isolierten Ribosomen wurden zusammen mit dem mitochondrialen Lysat mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. T, mitochondriales Totallysat, P, ribosomale Pelletfraktion, Ü, postribosomaler Überstand.

von GTP γ S dagegen wurde Guf1 ausschließlich mit den mitochondrialen Ribosomen aufgereinigt (Abb. 3.7, P). Unter normalen Translationsbedingungen und auch unter nukleotiddepletierenden Bedingungen war Guf1 in beiden Fraktionen gleichmäßig verteilt.

Diese Verteilung läßt auf eine GTP-abhängige Bindung von Guf1 an mitochondriale Ribosomen schließen, wobei die GTP-Form als ‘aktive‘ Form an die Ribosomen bindet. In der GDP-Form liegt Guf1 dagegen vorwiegend als ungebundenes Matrixprotein vor.

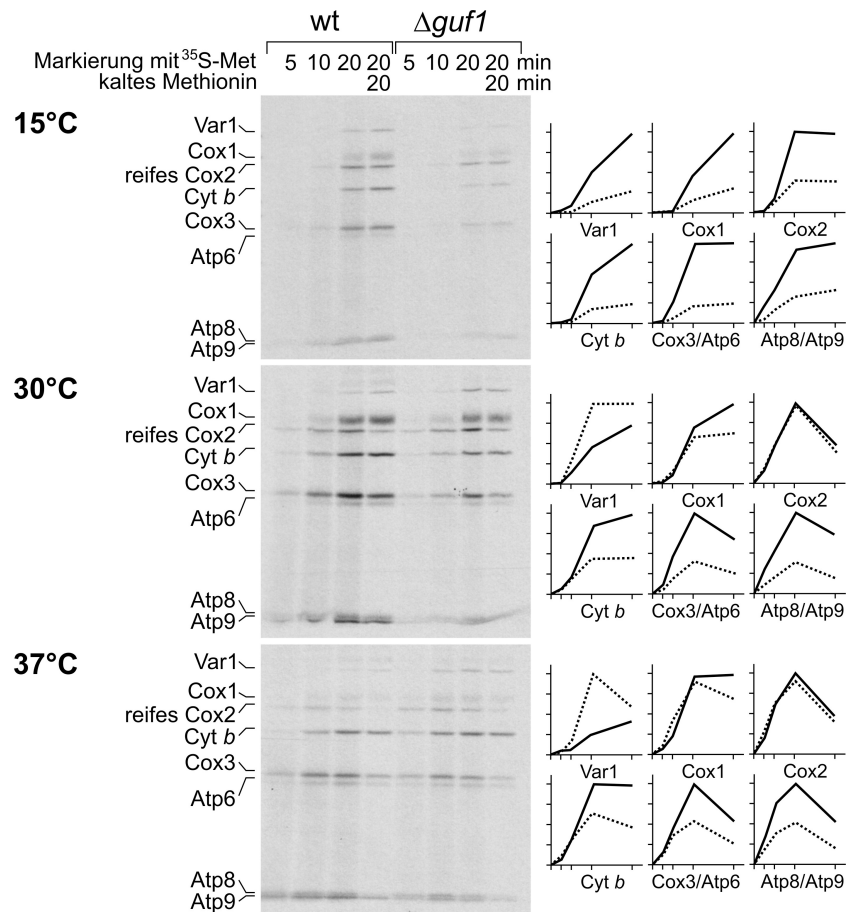


Abbildung 3.8: Guf1 begünstigt die Produktion mitochondrial kodierter Proteine bei niedrigen Temperaturen. Isolierte Mitochondrien aus $\Delta guf1$ - und Wildtyp-Hefestämmen wurden unter Translationsbedingungen in Anwesenheit von $[^{35}\text{S}]$ Methionin inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden Proben von ca. 15 μg mitochondrialem Protein entnommen. Die letzte Probe wurde jeweils mit einem Überschuss an kaltem Methionin versetzt und für weitere 20 min inkubiert. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Alle Signale wurden quantifiziert und sind rechts neben den zugehörigen Autoradiographien dargestellt. (—) Proteinmenge in Wildtyp-Mitochondrien, (···) Proteinmenge in $\Delta guf1$ -Mitochondrien, wt, Wildtyp.

3.1.6 Die mitochondriale Translation ist bei niedrigen Temperaturen durch Guf1 begünstigt

In Kapitel 3.1.5 konnte gezeigt werden, daß Guf1 GTP-abhängig an mitochondriale Ribosomen bindet. Diese GTP-regulierte Bindung und die Zugehörigkeit von Guf1 zur Familie der Elongationsfaktoren legen einen Einfluß auf die mitochondriale Translation nahe. Um dies zu untersuchen, wurden Translationsexperimente mit isolierten Mitochondrien durchgeführt.

Die Produktion der verschiedenen mitochondrial kodierten Proteine wurde verfolgt, indem zu unterschiedlichen Zeitpunkten während der Translation Proben entnommen wurden. Diese wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie (s. Kapitel 2.5.8 und 2.5.11) analysiert. Die Stabilität der synthetisierten Proteine wurde durch eine abschließende 20minütige Inkubation mit kaltem Methionin (vgl. Kapitel 2.4.7) überprüft.

Abb. 3.8 zeigt die Analyse der *in organello* Translationskinetiken bei 15 °, 30 ° und 37 °C. Sowohl in Wildtyp-Mitochondrien als auch in $\Delta guf1$ -Mitochondrien wurden bei allen drei Temperaturen alle Proteine synthetisiert. Diese waren unter den gewählten Bedingungen auch ähnlich stabil (vgl. Abb. 3.8, Spuren 20 min plus 20 min kaltes Methionin). Bei Temperaturen von 30 ° und 37 °C ergaben sich in beiden Mitochondrien keine wesentlichen Unterschiede in der Translation. Wurde die Translation dagegen bei 15 °C durchgeführt, so war die Synthese in den $\Delta guf1$ -Mitochondrien gegenüber den Wildtyp-Mitochondrien stark beeinträchtigt. Die Menge an synthetisiertem Protein war hier nach 20 min deutlich geringer als in den isolierten Wildtyp-Mitochondrien (s. Abb. 3.8, Autoradiographie und Graphiken, 15 °C).

Diese Beobachtungen lassen vermuten, daß Guf1 für die mitochondriale Translation an sich kein zwingend notwendiger Faktor ist. Bei niedrigen Temperaturen unterstützt Guf1 jedoch die Synthesereaktion und gewährleistet eine optimale Produktion der mitochondrial kodierten Proteine.

3.1.7 Hohe Temperaturen und Kohlenstoffmangel führen in Abwesenheit von Guf1 zur Anhäufung fehlerhafter Translationsprodukte

Für das Guf1-Homolog in *E. coli*, LepA, war kürzlich die Rolle eines Optimierungsfaktors während der Proteintranslation vorgeschlagen worden [114]. Mit Hilfe von *in vitro* Translationsexperimenten konnte gezeigt werden, daß LepA die Menge an funktionellem Protein deutlich steigert. Die Ergebnisse aus Kapitel 3.1.6 lassen eine ähnliche Funktion auch für Guf1 vermuten. Sollte Guf1 tatsächlich die Synthese von Proteinen optimieren, liegt die Vermutung nahe, daß die in seiner Abwesenheit produzierten Peptidketten nicht funktionell sind.

Um dies zu testen, wurden neu synthetisierte Proteine auf ihre Tendenz zur Aggregation untersucht. Zu diesem Zweck wurden Mitochondrien sowohl von Wildtyp-Hefen als auch von einem *GUF1*-Deletionsstamm isoliert, die unter Kohlenstofflimitierten Bedingungen kultiviert worden waren. Diese wurden bei unterschiedlichen Temperaturen unter Translationsbedingungen in Gegenwart von [³⁵S]Methionin inkubiert. Das Ausmaß an Aggregation neu synthetisierter Proteine wurde durch Solubilisierung der Mitochondrien und eine anschließende Ultrazentrifugation untersucht.

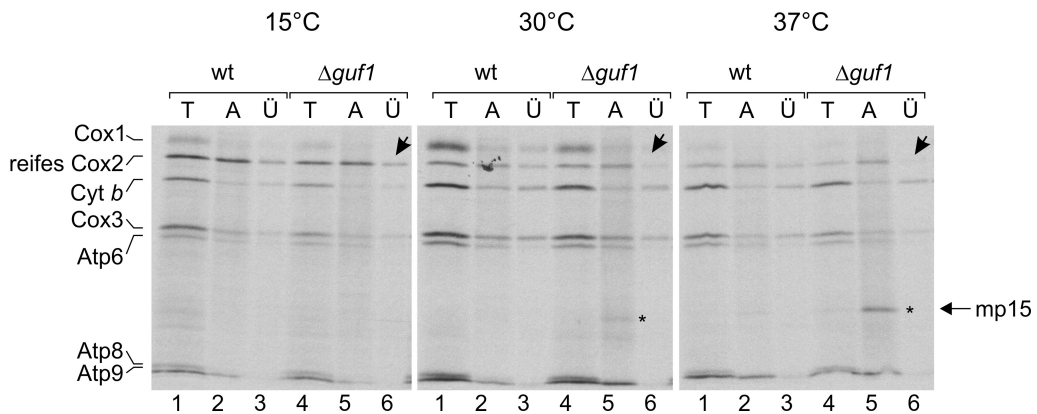


Abbildung 3.9: Aggregation mitochondrial kodierter Proteine in Abwesenheit von Guf1. Mitochondrien wurden von Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Hefestämmen isoliert, die in YP-Medium mit 0,5 % [w/v] Galaktose kultiviert worden waren. Die Mitochondrien wurden unter Translationsbedingungen in Anwesenheit von $[^{35}\text{S}]$ Methionin bei den angegebenen Temperaturen inkubiert, gewaschen und anschließend in 1 % [v/v] Triton-X 100 solubilisiert. Je 10 % der Lysate wurden direkt analysiert. Aus dem übrigen Lysat wurden die Aggregate mittels Zentrifugation gewonnen und gemeinsam mit dem Überstand (je 10 %) aufgetragen. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Autoradiographie. T, mitochondriales Totallysat, A, pelletierte Aggregate, Ü, Überstand aus der Aggregatzentrifugation, wt, Wildtyp.

Abb. 3.9 zeigt die Analyse der pelletierten Aggregate im Vergleich zu den löslichen Bestandteilen. Auffallend war vor allem die starke Tendenz zur Aggregation der Untereinheit zwei der Cytochrom *c*-Oxidase. Dieses wurde bei hohen Temperaturen (30°C, 37°C) nahezu ausschließlich in der unlöslichen Pelletfraktion gefunden. Die löslichen Fraktionen dagegen enthielten kein oder nur sehr wenig Cox2 (s. Abb. 3.9, Pfeile).

Neben der verstärkten Aggregation von Cox2 fiel in den Pelletfraktionen der $\Delta guf1$ -Mitochondrien bei 30° und 37°C auch das Auftreten eines ca. 15 kDa kleinen Proteins auf (mp15, s. Abb. 3.9, Sternchen). Hierbei handelt es sich um ein Translationsprodukt, das durch unvollständige Prozessierung der *COX1*-mRNA entsteht [157]. Dieses Translationsprodukt ist charakteristisch für Mitochondrien, die Defekte in dem eng gekoppelten Translations- und Assemblierungsprozeß des COX-Komplexes aufweisen [157] [87].

Die verstärkte Tendenz zur Aggregation von zumindest einem mitochondrial kodierten Protein und das Auftreten des aberranten Translationsproduktes mp15 in den $\Delta guf1$ -Mitochondrien zeigen, daß die in Abwesenheit von Guf1 synthetisierten Proteine, insbesondere bei hohen Temperaturen, fehlerhaft sind. Dies deutet darauf hin, daß Guf1 tatsächlich als optimierender Faktor während der Translation wirken könnte.

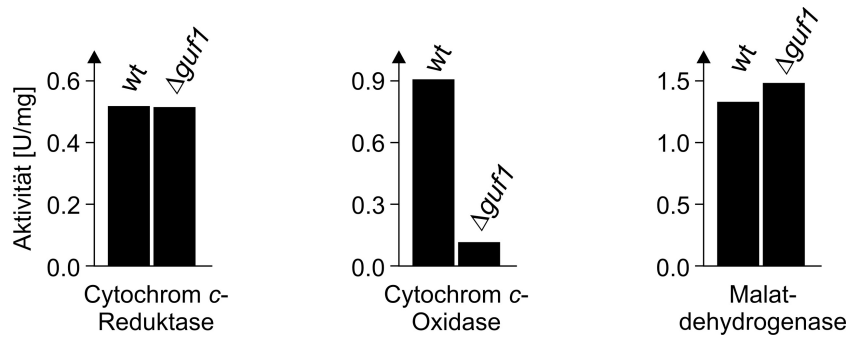


Abbildung 3.10: Aktivitäten verschiedener mitochondrialer Enzymkomplexe in Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Mitochondrien. Die Aktivitäten der Cytochrom *c*-Oxidase, der Cytochrom *c*-Reduktase und des Malatdehydrogenasekomplexes wurden in isolierten Mitochondrien bei einer Temperatur von 25 °C bestimmt. Sowohl Wildtyp- als auch $\Delta guf1$ -Mitochondrien kamen aus Stämmen, die unter Kohlenstoff-limitierten Bedingungen bei 30 °C kultiviert worden waren.

3.1.8 In $\Delta guf1$ -Mitochondrien ist die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase stark verringert

Um die Funktionalität mitochondrialer Translationsprodukte zu prüfen, wurden zusätzlich auch die Aktivitäten verschiedener Atmungskettenkomplexe bestimmt. In Abb. 3.10 sind die Aktivitäten der Cytochrom *c*-Oxidase und der Cytochrom *c*-Reduktase isolierter Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Mitochondrien dargestellt. Zur Kontrolle wurde für beide Mitochondrien auch die Aktivität des Malatdehydrogenasekomplexes bestimmt.

Wie aus Abb. 3.10 hervorgeht, betrug die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase in den $\Delta guf1$ -Mitochondrien nur noch ca. 1/10 der Aktivität in Wildtyp-Mitochondrien. Die Aktivität der Cytochrom *c*-Reduktase dagegen war in beiden Mitochondrien vergleichbar, ebenso wie die des Malatdehydrogenasekomplexes.

Die stark reduzierte Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase in den $\Delta guf1$ -Mitochondrien unterstützt die aus den Aggregationstests erhaltenen Resultate (s. Kapitel 3.1.7). Die aufgrund der gesteigerten Fehlerrate während der Translation nichtfunktionellen Proteine Cox1 und Cox2 werden vermutlich nicht assembliert. Dies führt zu einer deutlichen Reduktion der COX-Aktivität.

3.1.9 Die Expression von Guf1 ist temperaturabhängig

Wie in den vorangehenden Kapiteln gezeigt wurde, wirkt sich die Deletion von Guf1 vor allem auf die Synthese mitochondrial kodierter Proteine unter suboptimalen Bedingungen aus. Zu den beobachteten Effekten gehören zum einen eine starke Beeinträchtigung der Proteinproduktion (s. Kapitel 3.1.6), zum anderen die Anhäufung

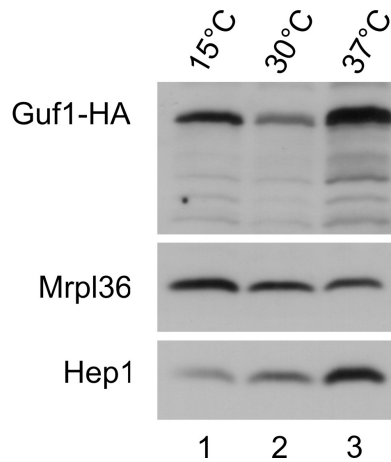


Abbildung 3.11: Guf1 wird temperaturabhängig exprimiert. Für die Analyse wurde das Gesamtprotein aus Hefezellen extrahiert, die in YP-Medium mit 2% [w/v] Galaktose kultiviert worden waren. Die Anzucht erfolgte bei 15 °C, 30 °C und 37 °C. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration untersucht.

fehlerhafter Translationsprodukte (s. Kapitel 3.1.7). In beiden Fällen handelt es sich um Defekte, die stark von der gewählten Temperatur abhängen. Im Gegenzug läßt dies eine temperaturabhängige Expression von Guf1 vermuten.

Um dies zu prüfen, wurden Hefen, die eine HA-getaggte Version von Guf1 exprimierten, unter verschiedenen Bedingungen kultiviert und deren Gesamtprotein mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10). Abb. 3.11 zeigt die endogenen Mengen an Guf1-HA, dem ribosomalen Protein Mrpl36 und dem Hitze induzierbaren Protein Hep1 bei 15 °, 30 ° und 37 °C.

Im Gegensatz zu Mrpl36, dessen Expression unabhängig von der gewählten Temperatur war, erwies sich die Synthese von Guf1 als induzierbar. Bei einer optimalen Temperatur von 30 °C wurde Guf1 nur in relativ geringen Mengen nachgewiesen. Bei 15 °C und auch bei 37 °C dagegen wurde Guf1 vermehrt produziert. Für die Expression bei 15 °C ergab sich eine ca. 3fach größere Menge, bei 37 °C überstieg die Menge an produziertem Guf1 die bei 30 °C um das ca. 10fache. Zur Kontrollzwecken wurden auch die endogenen Mengen an Hep1 untersucht. Dieses wurde, wie erwartet, hitzebedingt induziert (vgl. Abb. 3.11, Spuren 2 und 3).

Dieses Ergebnis zeigt deutlich, daß Guf1 unter Stressbedingungen in verstärktem Maß produziert wird. Eine zusätzliche Analyse der Promotorregion von Guf1 ergab zwei potentielle, jedoch eher untypische Hitzeschockelemente (ncHSE = non-consensus HSE), die für die temperaturregulierte Expression des Proteins verantwortlich sein könnten (vgl. Abb. 3.12). Beide Elemente befanden sich in einem Bereich von -200 bp aufwärts des Start-AUG.


```

1      TCAATTTTAA TTTTATTAA CTGAAATTAAG ACACACCTTT TGTCTTCTTT
51     TTTCTCTCAT CATCTCCGTA TGTTTATGTT GCTATTTTGA TGTAAATAAA
101    AAAGTTGAAT AATAGACGAG GGCAAGTATA ACTCGCCTAT ATTTGTAGCC
151    GCAACCATTG AAAAAGAGCC ATGAAATATGG GAAACTAGTT GCACATAAAA
201    ATGCTGAAAT TTAGAATTAG GCCAGTGAGA CATATACGGT GTTATAAACG

```

Abbildung 3.12: Darstellung der Promotorregion von Guf1. Das Startcodon ist grau unterlegt, die Motive der beiden potentiellen Hitzeschockelemente sind umrandet. Element 1, das aus den Motiven GAA und TCC aufgebaut ist, befindet sich in einem Nukleotidbereich von -190 bis -140 bp aufwärts des Start-AUG. Das zweite potentielle Hitzeschockelement besteht aus Wiederholungen des GAA-Motivs und ist -50 bis -10 bp vor dem Start-AUG lokalisiert.

3.1.10 Die Überexpression von Guf1 in Hefe führt zum Abbau seines N-Terminus

Im vorangehenden Kapitel wurde die temperaturabhängige Expression von Guf1 beschrieben. Dabei konnte eine Überexpression unter Stressbedingungen nachgewiesen werden. Sollte Guf1 wirklich eine Rolle als Optimierungsfaktor während der Translation spielen und, ähnlich wie LepA, das Ribosom rückwärts entlang der mRNA bewegen können ([114] s. auch Kapitel 1.3), wäre eine übermäßige Produktion zumindest unter optimalen Bedingungen nicht wünschenswert. Die Überexpression von LepA in *E. coli* hatte sich als toxisch erwiesen [114].

Um nähere Aufschlüsse über die Expression und endogenen Mengen an Guf1 unter normalen Bedingungen zu erhalten, wurde eine C-terminal HA-getaggte Version des Proteins endogen und mit Hilfe des GAL1- bzw. Triosephosphatisomerasepromotors in Hefe exprimiert. Aus den Hefestämmen wurde das Gesamtprotein extrahiert und mittels SDS-PAGE und Immundekoration analysiert (s. Kapitel 2.5.8/2.5.10). Zusätzlich wurde die Stabilität des Proteins auch in isolierten Mitochondrien untersucht.

Abb. 3.13A und B zeigen die Expression des Proteins bei 30°C im Vergleich zur endogenen Menge. Während Guf1 endogen bei 30°C nur in sehr geringem Ausmaß produziert wurde (Abb. 3.13A, Spur 1) und auch in isolierten Mitochondrien nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte (Abb. 3.13A, Spur 3), wurde es mit Hilfe des GAL1- bzw. des TPI-Promotors stark überexprimiert (Abb. 3.13A und B, Spuren 2, 4 und 6). Neben dem eigentlichen Signal bei etwa 72 kDa waren bei Überexpression des Proteins noch viele weitere Banden zu sehen. Hierbei handelte es sich vermutlich um Abbauprodukte von Guf1. Diese akkumulierten in den isolierten Mitochondrien und auch im Zellextrakt als mehr oder weniger stabile Intermediate

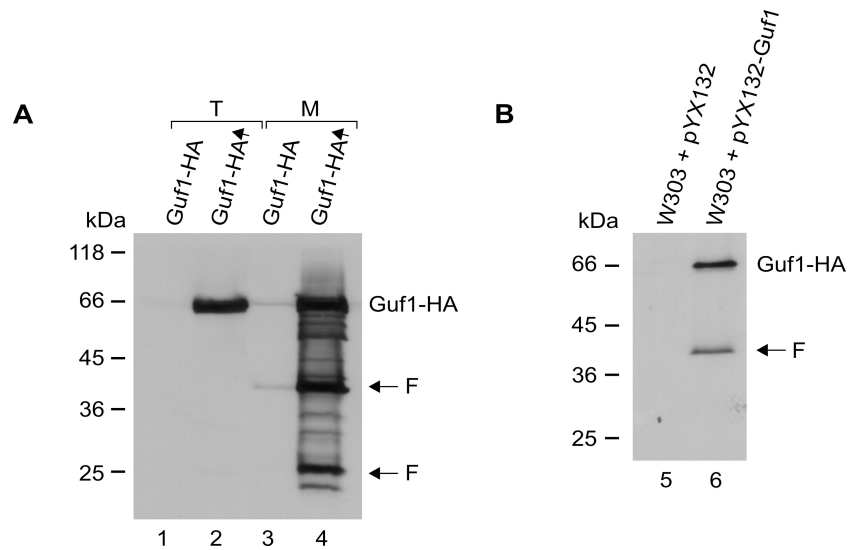


Abbildung 3.13: A) und B) Überexpression von Guf1 in *S. cerevisiae*. Für die Analyse wurden äquivalente Mengen an Gesamtprotein bzw. isolierten Mitochondrien untersucht. Die Proben wurden aus Hefen gewonnen, die bei 30 °C auf S-Medium mit 2 % [w/v] Galaktose oder YP-Medium mit 2 % [w/v] Galaktose angezogen worden waren. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immundekoration analysiert. T, Gesamtzellextrakt aus Hefe, M, isolierte Mitochondrien, Guf1-HA \uparrow , Hefestamm in dem Guf1-HA überexprimiert wird, F, C-terminales Fragment von Guf1.

von ca. 37 kDa und 25 kDa (s. Abb. 3.13A und B, F).

Dieses Ergebnis läßt darauf schließen, daß die Expression von Guf1 einer strengen Kontrolle unterliegt. Während unter ungünstigen Bedingungen eine verstärkte Expression durchaus möglich ist (vgl. Kapitel 3.1.9), führt die übermäßige Expression unter normalen Bedingungen zum Abbau des Proteins.

3.1.11 Die Insertion mitochondrial kodierter Proteine in die Innenmembran ist unabhängig von Guf1

In Hefe ist die Translation mitochondrial kodierter Proteine eng mit deren Insertion in die Innenmembran gekoppelt. In den vorangegangenen Kapiteln wurde bereits der Einfluß von Guf1 als membranständiger GTPase auf die mitochondriale Translation gezeigt. Um zu testen, ob sich die Deletion von Guf1 auch auf den Insertionsprozeß auswirkt, wurde die Zugänglichkeit der Proteine für einen Abbau durch PK in Mitoplasten untersucht (vgl. Kapitel 2.4.5.3). Dazu wurden Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Mitochondrien unter hypotonen Bedingungen geschwollen und die mitochondrial kodierten Proteine *in organello* radioaktiv markiert (s. Kapitel 2.4.7). Anschließend wurden die Proben einer Behandlung mit PK unterzogen.

Abb. 3.14 zeigt die Analyse der mit PK behandelten Mitoplasten. Sowohl in iso-

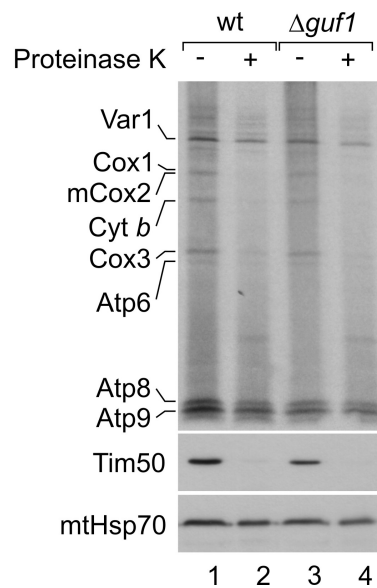


Abbildung 3.14: Insertion mitochondrial kodierter Proteine in die Innenmembran. Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Mitochondrien wurden in hypoosmotischem Puffer geschwollen, reisoliert und anschließend unter Translationsbedingungen in Anwesenheit von [^{35}S]Methionin inkubiert. Die Proben wurden geteilt und je eine Hälfte einem 15-minütigen PK-Verdau (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) unterzogen. Anschließend wurden die Proben mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. wt, Wildtyp.

lierten Wildtyp-Mitochondrien als auch in den ΔGuf -Mitochondrien waren alle Innenmembranproteine dem Abbau in gleichem Maße zugänglich (s. Spuren 2 und 4, Abb. 3.14). Var1 als Matrixprotein wurde nicht abgebaut. Auch Atp8 und 9, die nach Assemblierung in den ATPase-Komplex einem Abbau durch PK nicht zugänglich sind, wurden nicht abgebaut. Alle weiteren Innenmembranproteine (Cox1, Cox2, Cob, Cox3 und Atp6) wurden dagegen abgebaut.

Zu Kontrollzwecken wurde in den Proben auch der Abbau von Tim50 und Hep1 verfolgt. Tim50 als Innenmembranprotein mit Intermembranraumdomäne wurde in den Mitoplasten durch PK abgebaut. Hep1 als lösliches Matrixprotein dagegen war einem Abbau nicht zugänglich.

Neben dem Abbau inserierter Proteine mit PK wurde der Insertionsprozeß auch mit Hilfe von Quervernetzungsexperimenten überprüft. Neu entstehende Proteine werden in einem kotranslationalen Prozeß in die Innenmembran aufgenommen (s. Kapitel 1.4). Die mitochondriale Insertase Oxa1 interagiert dabei direkt mit den wachsenden Polypeptidketten. Diese Interaktion kann durch Quervernetzungs- und Immunfällungsexperimente nachgewiesen werden.

Um zu untersuchen, ob in *GUF1*-Deletionsmutanten die Interaktion zwischen Oxa1

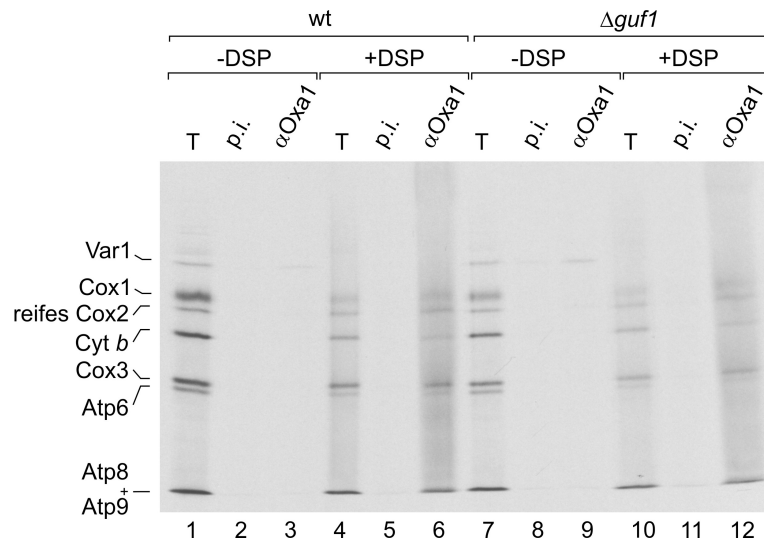


Abbildung 3.15: Interaktion von Oxa1 mit wachsenden Aminosäureketten während der Proteininsertion. Isolierte Wildtyp- und $\Delta guf1$ -Mitochondrien wurden 10 min bei 30 °C unter Translationsbedingungen in Anwesenheit von [35 S]Methionin inkubiert. Die Proben wurden geteilt und eine Hälfte 10 min mit 1 % DMSO behandelt (-DSP), die andere Hälfte mit 200 μ M DSP in 1 % DMSO (+DSP). Nachdem überschüssiges Quervernetzungsreagenz gequenchet worden war, wurden die Mitochondrien reisoliert, in 1 % [v/v] Triton-X 100 lysiert und für Immunfällungen mit Präimmenserum (p. i.) oder Oxa1-spezifischem Antikörper (α -Oxa1) verwendet. Zu Kontrollzwecken wurden 5 % des Lysats als Kontrolle geladen (T).

und den naszierenden Ketten gegeben ist, wurden isolierte Mitochondrien unter Translationbedingungen inkubiert und neu entstehende Aminosäureketten über ein Quervernetzungsreagenz mit Oxa1 verknüpft (s. Kapitel 2.5.5). Für den spezifischen Nachweis der Interaktion wurde die Insertase anschließend mit einem polyklonalen Antikörper gefällt und vernetzte Ketten kopräzipitiert. Wie in Abb. 3.15 zu sehen ist, konnten in Wildtyp- und auch in $\Delta guf1$ -Mitochondrien naszierende Ketten mit Oxa1 gefällt werden. Diese waren aufgrund ihrer unterschiedlichen Länge gleichmäßig in den Spuren 6 und 12 verteilt. Die Menge der synthetisierten Ketten war in beiden Proben etwa gleich groß (Abb. 3.15, Spuren 6 und 12). Proben, in denen mit Präimmenserum gefällt worden war, enthielten dagegen keine naszierenden Ketten. Zu Kontrollzwecken wurden zusätzlich Proben analysiert, die kein Quervernetzungsreagenz enthielten. Diese ergaben erwartungsgemäß kein Signal.

Obwohl die Translation und Insertion von Proteinen in die Innenmembran von Mitochondrien eng gekoppelt sind, zeigte die Deletion von *GUF1* keinerlei Auswirkungen auf den Insertionsprozeß. Dieser ist unabhängig von der Produktion der Proteine und von einem funktionellen Guf1-Protein.

3.1.12 Die Deletion von *GUF1* im *Oxa1ΔC(1-332)* Hintergrund ist unter suboptimalen Wachstumsbedingungen synthetisch letal

Um die Kopplung von mitochondrialer Translation und Insertion und die potentielle Rolle von Guf1 in diesem Prozeß weiter zu charakterisieren, wurde eine Doppelmutante erzeugt, in der sowohl Guf1 als auch der C-Terminus von Oxa1 deletiert worden waren. Durch die Deletion der letzten 70 Aminosäurereste von Oxa1 wird die Interaktion mit dem mitochondrialen Ribosom geschwächt und damit die Insertion beeinträchtigt. Die Deletion von Guf1 dagegen führt unter Stressbedingungen zu verlangsamer bzw. fehlerhafter Translation neu synthetisierter Proteine (s. Kapitel 3.1.6 und 3.1.7).

Wie aus Abb. 3.16 hervorgeht, führte die simultane Deletion beider Komponenten und damit die Beeinträchtigung beider Prozesse zugleich zu einer synthetischen Letalität der Doppelmutante unter Stressbedingungen. Die Einzelmutationen dagegen beeinflussten das Wachstum der Hefen nicht.

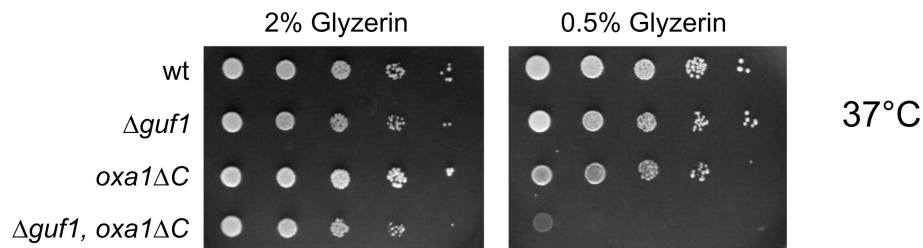


Abbildung 3.16: Die Deletion von *GUF1* und dem C-Terminus von Oxa1 führt unter suboptimalen Bedingungen zu synthetischer Letalität. Die angegebenen Stämme wurden in YP-Medium mit 2% [w/v] Galaktose bis zu einer OD_{600} von ca. 1,0 angezogen, gewaschen und auf eine OD_{600} von 0,5 eingestellt. Von einer 1:10 Verdünnungsreihe wurden je 3,5 μ l auf YP-Platten mit 2 oder 0,5% [w/v] Glycerin aufgetragen und bei 37°C inkubiert.

Dies ist ein weiterer Hinweis auf eine Funktion von Guf1 für die Synthese funktioneller Proteine in Mitochondrien. Die *Oxa1ΔC*-Mutation führt alleine noch nicht zu einem respiratorischen Phänotyp, auch wenn sie die Insertion mitochondrialer Proteine in die Innenmembran stört. Wird allerdings zusätzlich auch Guf1 ausgeschaltet, so unterschreitet die Menge neu synthetisierter und funktioneller Proteine die Schwelle, die zur Aufrechterhaltung der Zellatmung notwendig ist. Dies führt zu der unter restriktiven Bedingungen beobachteten Letalität.

3.2 Rekonstitution des Oxa1-Ribosomen-Komplexes *in vitro*

(in Zusammenarbeit mit Dr. Eli O. van der Sluis, AK Beckmann, Genzentrum der LMU München, Deutschland)

In Mitochondrien ist die Produktion der dort kodierten Proteine eng mit deren Insertion in die Innenmembran verknüpft [137] [61]. Neben dem mitochondrialen Ribosom spielt dabei die Translokase Oxa1 eine wichtige Rolle. Als homooligomerer Komplex vermittelt Oxa1 die Aufnahme der mitochondrialen Translationsprodukte in die Innenmembran von Mitochondrien (s. Kapitel 1.4). Die Deletion von Oxa1 führt zur Akkumulation der produzierten Proteine in der Matrix und infolgedessen zu respiratorischer Defizienz [55] [1].

Obwohl der Oxa1-Komplex bereits seit längerem als hauptsächliche Insertase für mitochondrial kodierte Proteine gilt [136], ist über dessen Struktur und Funktionsweise wenig bekannt. Auch die Interaktion mit mitochondrialen Ribosomen ist bislang nur biochemisch charakterisiert worden.

Um Aufschlüsse über die Struktur des Oxa1-Komplexes und den kotranslationalen Insertionsprozeß in Mitochondrien zu erhalten, sollte ein Komplex aus Oxa1 und mitochondrialen Ribosomen für kryo-elektronenmikroskopische Analysen rekonstituiert werden. Zu diesem Zweck wurden mitochondriale Ribosomen und Oxa1 jeweils getrennt voneinander gereinigt. Die Bindung beider Komponenten erfolgte anschließend *in vitro*.

3.2.1 Affinitätsreinigung von Oxa1-His6 aus *N. crassa*

Oxa1 aus *N. crassa* wurde bereits kürzlich als funktionelles Mitglied der Oxa1/YidC/Alb3-Familie identifiziert und charakterisiert [96]. Im Rahmen dieser Arbeiten konnte unter anderem gezeigt werden, daß Oxa1 aus *N. crassa* das in Hefe kodierte Oxa1 funktionell ersetzen kann. Eine Interaktion *in vitro* mit gereinigten mitochondrialen Ribosomen aus Hefe, wie sie später in den Bindungsassays erfolgen sollte, konnte somit als funktionell angenommen werden.

Für die strukturelle Analyse des mitochondrialen Oxa1-Ribosomen-Komplexes wurde die Translokase Oxa1 aus *N. crassa* über einen C-terminalen His6-tag gereinigt. Die Reinigung des Oxa1-Komplexes erfolgte aus isolierten Mitochondrien unter den bereits etablierten Bedingungen ([96]; s. auch Kapitel 2.5.3).

Abb. 3.17 zeigt eine Analyse der Affinitätsreinigung. In den Fraktionen 4 und 5 der Elution konnte ein Protein von ca. 45 kDa angereichert werden (vgl. Abb. 3.17, Pfeil). Dies entsprach der für Oxa1-His6 aus *N. crassa* bestimmten Größe [96]. Die Identität

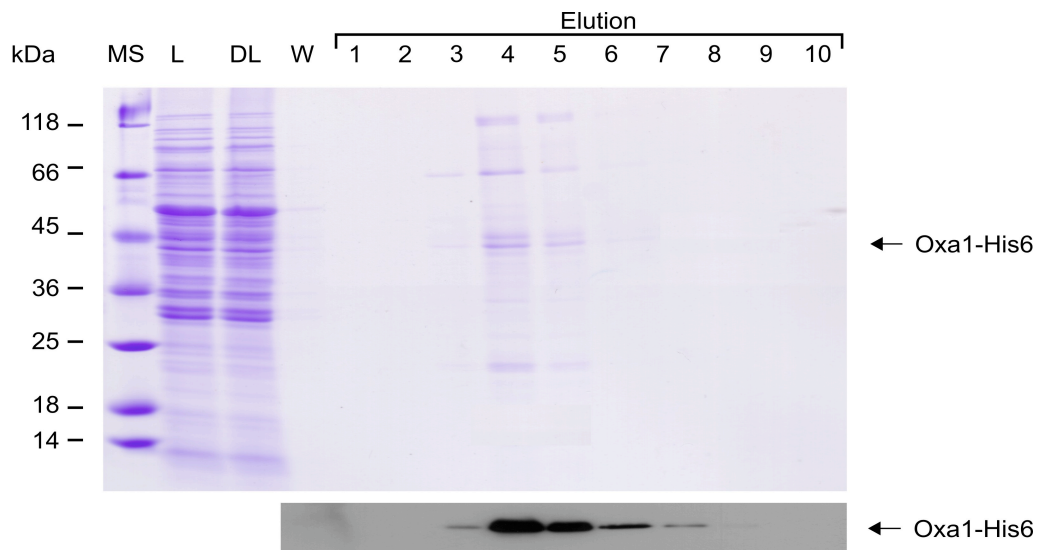


Abbildung 3.17: Reinigung von Oxa1-His6 aus *N. crassa*. Isolierte Mitochondrien des Stammes K-5-15-23-1 wurden in 1% [w/v] DDM solubilisiert. Nach Zentrifugation des Lysats wurde dieses zur Bindung von Oxa1-His6 mit äquilibrierter NiNTA versetzt. Anschließend wurde das Säulenmaterial gepackt, gewaschen und gebundenes Protein mit Imidazol eluiert. Einzelne Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung (oben) bzw. Immundekoration mit monoklonalem His-Antikörper (unten) analysiert. MS, Molekulargewichtsstandard, L, Mitochondriales Lysat, DL, Durchlauf, W, Waschfraktion.

des gereinigten Komplexes wurde durch Immundekoration mit einem monoklonalen His-Antikörper bestätigt (s. Abb. 3.17, unten, Pfeil). Das gereinigte Oxa1-His6 verhielt sich entsprechend den Erwartungen während des Reinigungsprozesses. Damit konnte von einem intakten Proteinkomplex ausgegangen werden.

Neben der prominenten Oxa1-Bande waren zusätzlich noch einige weitere Banden in den Fraktionen 4 und 5 der Elution sichtbar (vgl. Abb. 3.17, Coomassie-Gel). Diese waren bereits zuvor mittels massenspektrometrischer Analyse als unspezifisch angereicherte Proteine aus dem Reinigungsprozeß identifiziert worden [111]. Einige dieser Proteine konnten durch zusätzliche Reinigungsschritte, wie z. B. Ionenaustauschchromatographie und erneute Affinitätsreinigung, entfernt werden.

Pro Reinigung wurden jeweils ca. 1,5-2 g isolierte Mitochondrien eingesetzt. Aus diesen konnten ca. 1 mg gereinigtes Oxa1-His6 gewonnen werden, das für die Durchführung der Bindungsstudien (vgl. Kapitel 3.2.3) verwendet wurde.

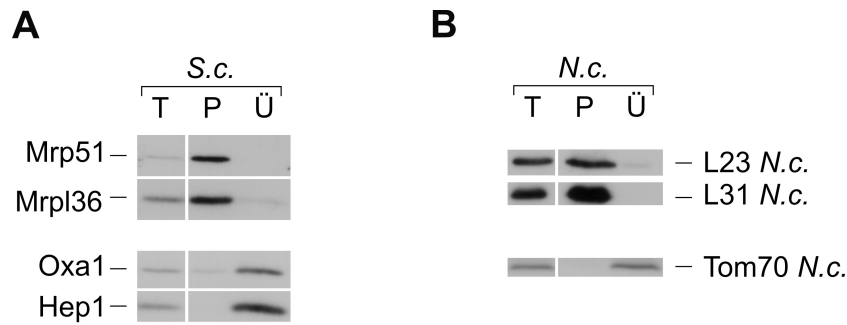


Abbildung 3.18: Reinigung mitochondrialer Ribosomen aus A) *S. cerevisiae* (*S. c.*) und B) *N. crassa* (*N. c.*). Isolierte Mitochondrien wurden in 1% Triton X-100 lysiert und die Ribosomen durch 1,4 M Saccharosekissen zentrifugiert. Die isolierten Ribosomen (P) wurden zusammen mit dem mitochondrialen Lysat (10% T) und dem postribosomalen Überstand (Ü) mittels SDS-PAGE und Immundekoration eingesetzt.

3.2.2 Reinigung mitochondrialer Ribosomen aus *S. cerevisiae* und *N. crassa*

Zur Durchführung der *in vitro* Bindungsexperimente wurden mitochondriale Ribosomen aus *S. cerevisiae* und *N. crassa* isoliert. Die Reinigung erfolgte in einem zweistufigen Prozeß. Zunächst wurden die Ribosomen aus isolierten Mitochondrien durch Zentrifugation über ein Saccharosekissen angereichert. Im Anschluß daran wurden diese über einen linearen Saccharosegradienten gereinigt (s. Kapitel 2.5.7).

Die Anreicherung der mitochondrialen Ribosomen durch Zentrifugation über ein Saccharosekissen ist in den Abb. 3.18A und B dargestellt. Die Abbildungen zeigen die Analyse des mitochondrialen Lysats (10% T) sowie des ribosomalen Pellets (P) und des postribosomalen Überstandes (Ü) aus dem Zentrifugationsprozeß. Als ribosomale Marker dienen im Falle von Hefe Antikörper gegen die Proteine Mrp51 und Mrpl36. Um mitochondriale Ribosomen aus *N. crassa* nachzuweisen, wurden Antikörper gegen die Proteine L23 und Yml36 (Homologe zu *E. coli* L23 und L31) verwendet (Abb. 3.18, L23 *N. c.*, L31 *N. c.*). Als Marker für mitochondriale Matrix- bzw. Membranproteine dienen Oxa1 und Hep1 (Hefe) sowie Tom70 im Falle von *N. crassa*.

Die ribosomalen Proteine Mrp51, Mrpl36 bzw. L23 und Yml36 befanden sich nach der Zentrifugation durch das Saccharosekissen ausschließlich in den ribosomalen Pelletfraktionen (s. Abb. 3.18A und B, P). Proteine der mitochondrialen Matrix bzw. der Innen- oder Außenmembran verblieben dagegen im löslichen Überstand (s. Abb. 3.18A und B, Ü).

Durch diesen ersten Zentrifugationsschritt wurden die mitochondrialen Ribosomen folglich nicht nur spezifisch angereichert, sondern auch weitestgehend von verunreinigendem Material getrennt. Eine zusätzliche Reinigung und zugleich auch die Analyse der Ribosomen erfolgte durch die anschließende Zentrifugation im Dichtegradienten (vgl. Abb. 3.19/3.20).

Mitochondriale Ribosomen sind aus Proteinen sowie ribosomaler RNA (vgl. auch Kapitel 1.2) aufgebaut. Die rRNA kann spezifisch durch Absorptionsmessung bei 260 nm detektiert werden. Dieser Umstand wurde für den Nachweis der mitochondrialen Ribosomen im Saccharosegradienten ausgenutzt. Die Gradienten wurden dazu in einzelnen Fraktionen geerntet, gleichzeitig wurde von jeder Fraktion die Absorption bei 260 nm gemessen. Damit konnte die genaue Position der Ribosomen im Gradienten bestimmt werden. Diese ist abhängig von der Wanderungsgeschwindigkeit der Ribosomen im Gradienten (vgl. auch Kapitel 1.2).

Die Abb. 3.19A und 3.20A zeigen die Absorptionsspektren verschiedener ribosomaler Gradienten bei 260 nm. In Abb. 3.19A ist die Reinigung mitochondrialer Ribosomen aus *S. cerevisiae* dargestellt, in Abb. 3.20A die Reinigung der Ribosomen aus *N. crassa*-Mitochondrien.

Eines der wichtigsten Ziele bei der Reinigung der mitochondrialen Ribosomen war, eine Kontamination mit zytosolischen 80S Ribosomen auszuschließen. Parallel zu den Reinigungen mitochondrialer Ribosomen wurden deshalb auch zytosolische 80S Ribosomen aus Hefe auf Saccharosegradienten geladen. Deren Wanderungsprofil ist in den Abb. 3.19A und 3.20A zusätzlich dargestellt.

In beiden Reinigungen ergab sich für die isolierten mitochondrialen Ribosomen ein spezifisches Wanderungsverhalten gemäß ihrer Sedimentationskoeffizienten. Dieser liegt für mitochondriale Ribosomen aus Hefe bei 72S [40] und für mitochondriale Ribosomen aus *N. crassa* bei 73S [86] (vgl. Kapitel 1.2). Die gereinigten Ribosomen aus Hefe und aus *N. crassa* ergaben ein prominentes Signal ungefähr in der Mitte der Gradienten (vgl. Abb. 3.19A und 3.20A). Beide wanderten erwartungsgemäß weniger weit in den Saccharosegradienten ein, als die zur Kontrolle aufgetragenen zytosolischen Ribosomen aus Hefe (80S, Abb. 3.19A und 3.20A). Eine Verunreinigung der mitochondrialen Ribosomen mit zytosolischen 80S Ribosomen konnte folglich ausgeschlossen werden.

Neben ihrer Reinheit wurde durch die Analyse der Ribosomen im Dichtegradienten auch gleichzeitig ihr Zerfall in einzelne Untereinheiten untersucht. Die Untereinheiten weisen Sedimentationskoeffizienten von 54S und 37S ([40]; große und kleine UE, *S. cerevisiae*) bzw. 50S und 37S ([86]; große und kleine UE *N. crassa*) auf und migrieren entsprechend weniger weit im Saccharosegradienten.

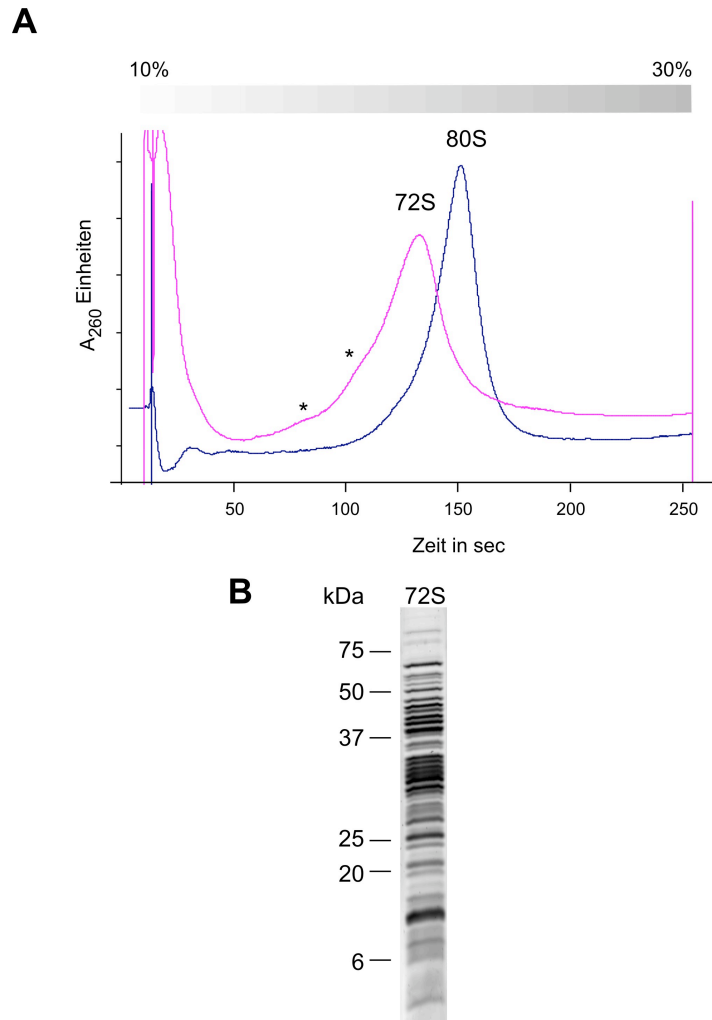


Abbildung 3.19: Reinigung mitochondrialer Ribosomen aus *S. cerevisiae*. A) Isolierte Wildtyp-Mitochondrien wurden in 1 % Triton X-100 solubilisiert. Nach Zentrifugation des Lysats wurde dieses auf 1,4 M Saccharosekissen geladen und erneut zentrifugiert. Die pelletierten Ribosomen wurden anschließend resuspendiert und auf lineare Saccharosegradienten (10-30 %) aufgetragen. Die Verteilung der Ribosomen im Gradienten wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm analysiert. B) Proteinmuster gereinigter mitochondrialer Ribosomen aus *S. cerevisiae*. Für die Analyse wurden ca. 25 µg gereinigte Ribosomen mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung eingesetzt.

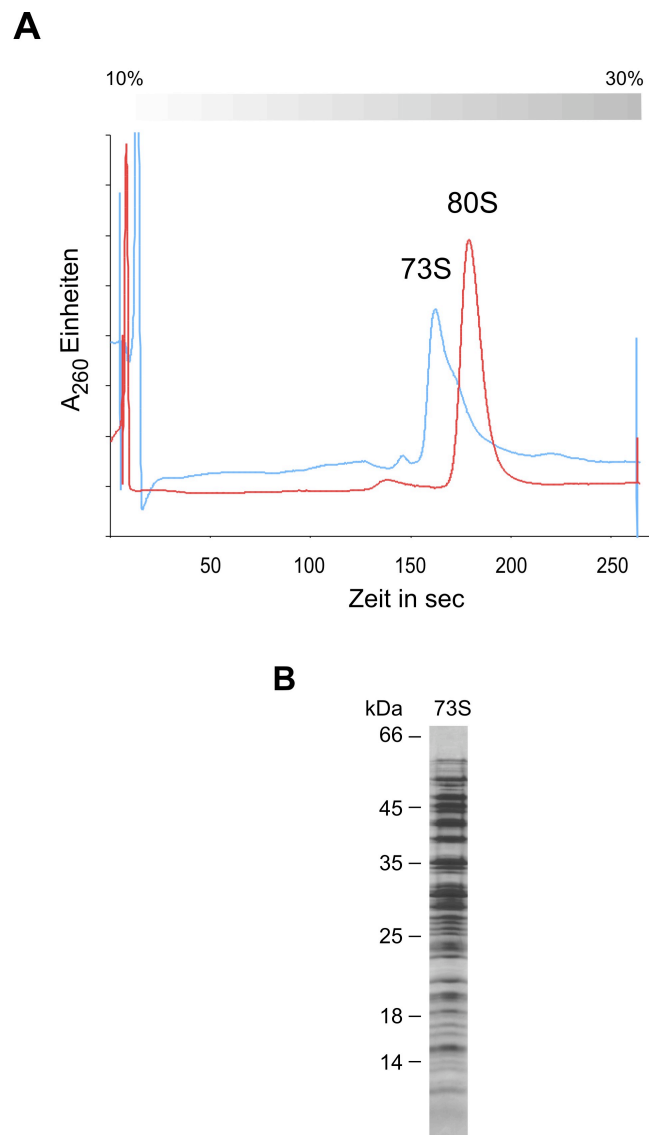


Abbildung 3.20: Reinigung mitochondrialer Ribosomen aus *N. crassa*. A) Isolierte Mitochondrien des Stammes K5-15-23-1 wurden in 1% Triton X-100 solubilisiert. Nach Zentrifugation des Lysats wurde dieses auf 1,4 M Saccharosekissen geladen und erneut zentrifugiert. Die pelletierten Ribosomen wurden anschließend resuspendiert und auf lineare Saccharosegradienten (10-30%) aufgetragen. Die Verteilung der Ribosomen im Gradienten wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm analysiert. B) Proteinmuster gereinigter mitochondrialer Ribosomen aus *N. crassa*. Für die Analyse wurden ca. 25 μ g gereinigte Ribosomen mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung analysiert.

Einzelne Untereinheiten konnten im Falle von *N. crassa* gar nicht und im Falle von *S. cerevisiae* nur in sehr geringem Ausmaß nachgewiesen werden (s. Abb. 3.19, Sternchen). Der Großteil der isolierten Ribosomen war intakt und wanderte spezifisch bei 72S bzw. 73S.

Durch die Reinigung und Analyse der mitochondrialen Ribosomen im Saccharosegradienten wurden somit zwei wichtige Faktoren überprüft: Zum einen wurde eine Verunreinigung mit zytosolischen 80S Ribosomen ausgeschlossen. Zum anderen wurde die Intaktheit der Ribosomen nachgewiesen.

Zusätzlich zur photometrischen Analyse der mitochondrialen Ribosomen wurden diese auch biochemisch mittels SDS-PAGE und Coomassiefärbung (s. Abb. 2.5.8 und 2.5.9) untersucht. Die Abb. 3.19B und 3.20B zeigen die für die mitochondrialen Ribosomen erhaltenen Proteinmuster. Typisch für diese war die gleichförmige leiterartige Struktur der Proteinbanden.

Für die Isolierung mitochondrialer Ribosomen wurden, je nach verwendetem Organismus, unterschiedliche Mengen an Mitochondrien eingesetzt. Während für die Reinigung aus *N. crassa* meist 1,5-2 g isolierte Mitochondrien als Startmaterial dienten, wurden für die Reinigung aus *S. cerevisiae* nur etwa 20 mg an isolierten Mitochondrien verwendet. Die Ausbeuten für die Reinigung aus Hefe waren entsprechend geringer. Pro Reinigung konnten hier nur ca. 0,4 A₂₆₀ gereinigte Ribosomen gewonnen werden (Die Menge gereinigter Ribosomen wird in Absorptionseinheiten A₂₆₀ angegeben. Eine A₂₆₀ gereinigter Ribosomen entspricht einer OD von 1 in einem Volumen von 1 ml; [97]). Eine Reinigung aus *N. crassa* ergab hingegen im Schnitt ca. 20 A₂₆₀ gereinigter Ribosomen.

3.2.3 Bindung von Oxa1-His6 an gereinigte Ribosomen *in vitro*

In den beiden vorangehenden Kapiteln wurde die Reinigung des Oxa1-Komplexes und der mitochondrialen Ribosomen beschrieben. Für die strukturelle Untersuchung des Oxa1-Ribosomen-Komplexes mittels Kryo-Elektronenmikroskopie mußten beide Komponenten *in vitro* rekonstituiert werden. Dazu wurde zunächst nach geeigneten Bedingungen gesucht. Getestet wurden u. a. verschiedene Salze, Detergenzien und Zusätze. Die besten Ergebnisse wurden mit den in Tabelle 2.6 (s. Kapitel 2.5.7) angegebenen Puffern erreicht. Diese wurden auch für die in Abb. 3.21 dargestellte Bindung von Oxa1-His6 an isolierte Ribosomen aus *N. crassa* verwendet.

Um eine möglichst hohe Zahl an mitochondrialen Ribosomen zu erhalten, die Oxa1-His6 gebunden hatten, wurde dieses in einem molaren Überschuß von 1:10 zu den gereinigten Ribosomen gegeben. Die Stabilität und Spezifität der Bindung wurde anschließend durch Zentrifugation der Ribosomen und Oxa1 durch ein Saccharosekissen

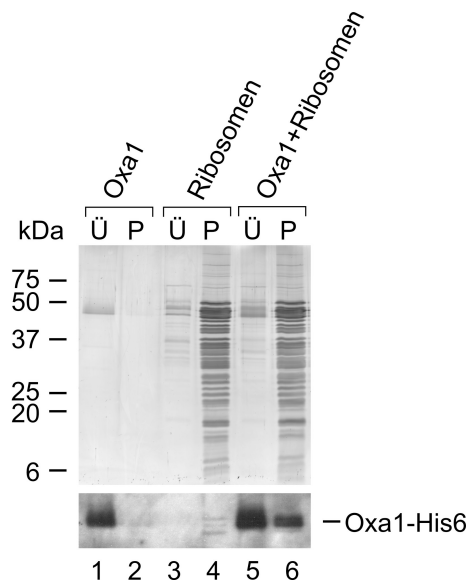


Abbildung 3.21: Bindung von Oxa1 an isolierte Ribosomen aus *N. crassa in vitro*. Gereinigtes Oxa1-His6 wurde in einem 10fachen Überschuß mit isolierten Ribosomen inkubiert. Nach Zentrifugation der Proben durch Saccharosekissen wurden die ribosomalen Pelletfraktionen (P) gegenüber den löslichen Fraktionen (Ü) mittels SDS-PAGE und Coomassieblaufärbung bzw. Immundekoration analysiert.

analysiert. Zu Kontrollzwecken wurden auch gereinigte Ribosomen und Oxa1-His6 allein auf Saccharosekissen geladen.

Abb. 3.21 zeigt die Analyse eines Bindungsexperiments. Die pelletierten Ribosomen (P) wurden im Vergleich zum Überstand (Ü) aufgetragen. Wie in den Spuren 4 und 6 des Coomassie-Gels (s. Abb. 3.21) zu sehen ist, wurden die Ribosomen durch die Zentrifugation erfolgreich pelletiert. Diese konnten durch das für sie typische leiterartige Bandenmuster nachgewiesen werden.

Über die Anlagerung von Oxa1-His6 an die Ribosomen konnte im Coomassie-Gel keine Aussage gemacht werden, da zu viele ribosomale Proteine die Oxa1-Bande überlagerten. Die Bindung wurde daher mittels Immundekoration mit Oxa1-spezifischem Antiserum untersucht.

In Proben, die sowohl gereinigtes Oxa1-His6 als auch isolierte Ribosomen enthielten, konnte Oxa1-His6 mit den Ribosomen pelletiert werden. Dieses war deutlich in der ribosomalen Fraktion nachweisbar (s. Abb. 3.21, Spur 6). In Proben, die ausschließlich gereinigtes Oxa1-His6 enthielten, ergab die Dekoration kein Signal in der Pelletfraktion. Hier verblieb Oxa1 vollständig im Überstand (s. Abb. 3.21, Spuren 1 und 2). In Spuren, in denen nur gereinigte Ribosomen aufgetragen waren, war Oxa1 ebenfalls nicht detektierbar (s. Abb. 3.21, Spuren 3 und 4).

Oxa1 wanderte folglich nur in die Pelletfraktion, sobald mitochondriale Ribosomen

in den Proben enthalten waren. Eine Aggregation des gereinigten Oxa1-Komplexes und daraus folgende Pelletierung konnte ausgeschlossen werden (vgl. Abb. 3.21, Spuren 1 und 2). Damit konnte die Migration des gereinigten Oxa1 in die Pelletfraktion spezifisch auf die Bindung an die isolierten Ribosomen *in vitro* zurückgeführt werden.

Kapitel 4

Diskussion

4.1 Charakterisierung der mitochondrialen GTPase Guf1

Im Gegensatz zur zytosolischen Translationsmaschinerie produziert das Translationssystem der Mitochondrien nur noch sehr wenige Proteine. Dabei handelt es sich zumeist um stark hydrophobe Membranproteine. Ihre optimale Synthese ist Voraussetzung für eine korrekte Assemblierung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe.

4.1.1 Guf1 als optimierender Faktor der Translation

In dieser Arbeit wurde ein Protein charakterisiert, das an der Optimierung der mitochondrialen Proteintranslation beteiligt ist. Hierbei handelt es sich um die GTPase Guf1. Guf1 war bereits vor längerer Zeit als 'GTPase unbekannter Funktion' identifiziert worden [65]. Schon damals wurde das Protein der Klasse der elongationsfaktorähnlichen GTPasen zugeordnet, jedoch wurde es bis heute funktionell nicht charakterisiert.

Durch phylogenetische Analysen konnte gezeigt werden, daß es sich bei Guf1 um ein hochkonserviertes Protein handelt. Homologe fanden sich in allen höheren Eukaryoten und auch in Bakterien, was eine ebenso hochkonservierte Funktion des Proteins vermuten ließ.

Das zu Guf1 homologe Protein in *E. coli* ist LepA. Eine Analyse dieses Proteins hatte kürzlich dessen strukturelle Verwandtschaft zu EF-G gezeigt [114]. Durch *in vitro* Translationsexperimente und Ribosomenbindeexperimente konnte bestätigt werden, daß LepA, ähnlich wie EF-G, eine Rolle während der Proteinelongation spielt [114]. Im Gegensatz zu EF-G wurde für LepA jedoch gezeigt, daß es das Ribosom während der Elongation rückwärts entlang der mRNA bewegt. Qin *et al.* schlugen daher

für LepA eine Rolle als Optimierungsfaktor vor, der im Falle einer unvollständigen Translokation durch EF-G das Ribosom aktiv rückwärts bewegen und somit eine nochmalige Vorwärtsbewegung ermöglichen könnte [114].

Eine ähnliche Funktion ist auch für das mitochondriale Homolog aus Hefe, Guf1, denkbar. Bereits die nähere Analyse der Aminosäuresequenz des Proteins machte eine Funktion als 'Optimierungsfaktor Guf1' während der mitochondrialen Translation wahrscheinlich. Diese Analyse zeigte zum einen die nahe Verwandtschaft zwischen Guf1 und EF-G, was eine Rolle während der Proteinsynthese unterstützt. Sie zeigte andererseits allerdings auch, daß sich Guf1 in struktureller Hinsicht von EF-G unterscheidet. Im Gegensatz zu EF-G fand sich in keinem der analysierten Guf1-Proteine ein der EF-G-Domäne IV entsprechender Sequenzabschnitt. Dieser Bereich fehlte völlig. Die Bedeutung dieser Domäne für den Elongationsprozeß wurde bereits eingehend untersucht [118] [126] [83]. Sie interagiert mit dem Zentrum für Codon-Anticodon-Erkennung des Ribosoms und ist für eine effiziente Translokation essentiell. Eine Deletion dieser Domäne IV läßt zwar die Bindung von EF-G an das Ribosom und die Hydrolyse von GTP noch zu, sie führt jedoch zum Verlust der Translokationsaktivität [118] [126]. In Übereinstimmung damit führte die Anwesenheit von LepA in *in vitro*-Experimenten anstelle einer Vorwärts- zu einer Rückwärtsbewegung gereinigter Ribosomen entlang der mRNA [114].

Eine ähnliche Funktionsweise ist aufgrund der hohen Homologie auch für Guf1 wahrscheinlich. Guf1 könnte, ähnlich wie LepA, das Ribosom während der Translation rückwärts bewegen. Bei einer vorangegangenen fehlerhaften Vorwärtsbewegung könnte dies einen erneuten Translokationsversuch durch EF-G ermöglichen. Auf diese Weise wäre, trotz fehlerhafter Translokation, eine optimale Progression der Proteinelongation gewährleistet.

Ein direkter Nachweis für einen solchen Mechanismus, ähnlich wie er für LepA erbracht wurde, konnte im Fall von Guf1 allerdings nicht erbracht werden. Im Gegensatz zu dem seit Jahren etablierten *in vitro*-Translationssystem mit gereinigten Komponenten aus *E. coli* existiert für mitochondriale Ribosomen kein vergleichbares System. Die Charakterisierung von Guf1 war daher auf Analysen *in vivo* und *in organello* beschränkt.

Die Möglichkeit, daß Guf1 eine Rolle als optimierender Faktor in der Translation spielen könnte, wurde durch Ribosomen-Bindeexperimente bestätigt. Für Guf1 konnte, ebenso wie für LepA, eine GTP-abhängige Bindung an Ribosomen gezeigt werden (s. Kapitel 3.1.5).

Die Bindung von Guf1 an mitochondriale Ribosomen erwies sich als dynamischer GTP-abhängiger Prozeß. Ähnlich wie dies auch bereits für die Elongationsfaktoren EF-Tu und EF-G gezeigt worden war [134] [125] [17], liegt Guf1 vermutlich in einer

aktiven GTP-gebundenen Form vor und in einer inaktiven GDP-Form. Guf1 in aktiver Form kann an mitochondriale Ribosomen binden. Liegt Guf1 dagegen in der GDP-Form vor, erfolgt keine Bindung an mitochondriale Ribosomen. Die Hydrolyse von GTP ist Voraussetzung für die Dissoziation des Guf1-Ribosomen-Komplexes. In Anwesenheit des nichthydrolysierbaren GTP-Analogs GTP γ S blieb gebundenes Guf1 fest mit den mitochondrialen Ribosomen assoziiert (s. Kapitel 3.1.5).

Die regulierte Bindung von Guf1 an mitochondriale Ribosomen ist im Einklang mit einer Funktion während der Translation, ähnlich wie sie auch für LepA vorgeschlagen wurde. Zugleich unterstützt die Analogie des GTP-getriebenen Bindemechanismus auch die Zuordnung von Guf1 zur Klasse der Elongationsfaktoren.

4.1.2 Die Bedeutung von Guf1 für die Translation unter suboptimalen Bedingungen

Trotz der Zuordnung von Guf1 zur Klasse der Elongationsfaktoren und einer möglichen optimierenden Funktion im Translationsprozeß war die physiologische Relevanz des Proteins unklar. Frühere Untersuchungen hatten bereits gezeigt, daß die Deletion von Guf1 unter normalen Kulturbedingungen keinerlei Auswirkungen auf das Wachstum von Hefen zeigte [65]. Eine wichtige Funktion in der mitochondrialen Translation, wie sie für eine derart hochkonservierte GTPase erwartet worden wäre, hätte zumindest auf einer nichtfermentierbaren Kohlenstoffquelle einen deutlichen Wachstumsdefekt erwarten lassen. Dies war jedoch nicht der Fall. In verschiedenen Testreihen konnte gezeigt werden, daß sich die Deletion von Guf1 unter normalen Bedingungen nicht auf das Wachstum der Hefen auswirkt (s. Kapitel 3.1.4). In Übereinstimmung damit zeigte auch die Deletion von LepA in *E. coli* keinerlei Auswirkungen auf das Wachstum der Bakterien unter normalen Bedingungen [29] [114].

Die hypothetische Rolle von Guf1 als 'Optimierungsfaktor' legte andererseits auch die Möglichkeit nahe, daß seine Funktionalität unter normalen Bedingungen nicht zwingend notwendig ist. Vielmehr wurde eine essentielle Funktion des Proteins unter Stressbedingungen vermutet. Im Gegensatz zu optimalen Kulturbedingungen konnte unter kohlenstofflimitierten Bedingungen bzw. bei suboptimalen Temperaturen ein eingeschränktes Wachstum für Δ *guf1*-Mutanten festgestellt werden (s. Kapitel 3.1.4). Der Wachstumsdefekt wurde besonders deutlich, sobald die Stressbedingungen miteinander kombiniert wurden (z. B. hohe Temperaturen und Kohlenstoffmangel).

Die Tatsache, daß die Deletion von Guf1 erst unter Stressbedingungen zu einem signifikanten Phänotyp führt, unterstützt eine mögliche Rolle als Optimierungsfaktor während der Translation. Während dessen Funktion unter optimalen Bedingungen nicht zwingend notwendig ist, ist sie unter Einfluß verschiedener Stressfaktoren von

entscheidender Bedeutung. Unter diesen Bedingungen ist eine optimale Proteinsynthese nicht mehr gewährleistet. Die Anwesenheit eines optimierenden Faktors kann die Proteinsynthese jedoch entscheidend verbessern. Dadurch wird eine Anpassung an die ungünstigen Bedingungen gewährleistet.

Unterstützt wurde diese Hypothese durch die Beobachtung, daß die Expression von Guf1 temperaturabhängig reguliert ist und Guf1 insbesondere bei hohen Temperaturen verstärkt produziert wird (s. Kapitel 3.1.9). Eine prozeßoptimierende Funktion von Guf1 vor allem unter Stressbedingungen ist also durchaus wahrscheinlich.

Um die Bedeutung des Proteins für die mitochondriale Translation nachzuweisen, wurde die Synthese der mitochondrial kodierten Proteine *in organello* unter verschiedenen Bedingungen verfolgt. Dabei wurde, wie bereits aufgrund der Wachstumsanalysen vermutet, festgestellt, daß Guf1 für den Translationsprozeß an sich zunächst nicht notwendig ist (vgl. Kapitel 3.1.6). Aus den Translationskinetiken bei 15 °C war jedoch deutlich zu erkennen, daß sich Guf1 auf die Effizienz des Syntheseprozesses auswirkt. Obwohl auch bei 15 °C alle Proteine synthetisiert wurden, war ihre Produktion in der Deletionsmutante gegenüber der im Wildtyp eingeschränkt. Ursache dafür war vermutlich eine Verlangsamung der Proteinsynthese aufgrund einer ungenaueren Translokation der mitochondrialen Ribosomen.

Die Translation von Proteinen ist ein komplexer dynamischer Prozeß, der insbesondere während der Proteinelongation durch eine wiederkehrende Folge von Teilprozessen gekennzeichnet ist [115]. Einer der wichtigsten Schritte ist die korrekte Bewegung des Ribosoms entlang der mRNA um exakt ein Basentriplett. Dieser Schritt wird von dem Elongationsfaktor EF-G katalysiert und wurde bis vor kurzem als in sich perfekter Prozeß angesehen. Die Charakterisierung von LepA aus *E. coli* und dessen Bedeutung für die Translation *in vitro* ließ jedoch vermuten, daß zumindest die Translokation nicht immer fehlerfrei abläuft.

Insbesondere bei suboptimalen Temperaturen ist also aufgrund der verlangsamten biochemischen Reaktion eine fehlerhafte Translation nicht unwahrscheinlich. Ein optimierender Faktor wie LepA oder auch Guf1 kann den Prozeß unter solchen Bedingungen durchaus verbessern und eine Anpassung an nichtoptimale Bedingungen ermöglichen.

Für die Proteinsynthese bei 37 °C ergab sich ein völlig anderes Bild. Hier konnte, trotz Deletion von Guf1, kein Unterschied in der Proteinproduktion im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (vgl. Abb. 3.8). Der temperatursensitive Phänotyp der $\Delta guf1$ -Mutante ließ allerdings vermuten, daß die synthetisierten Proteine nicht voll funktionsfähig sind. Eine Erhöhung der Temperatur führt automatisch

auch zu einer Beschleunigung der biochemischen Reaktionen, folglich auch zu einer schnelleren und evtl. ungenauen Translokation des Ribosoms. Gleichzeitig bedeuten hohe Temperaturen aber auch eine schnellere Codon-Anticodon-Erkennung, was bei einer unvollständigen Translokation zum Einbau einer falschen Aminosäure führen könnte. Ohne die Hilfe eines optimierenden Faktors, der eine fehlerhafte Translokation ausgleichen kann, in diesem Fall Guf1, hätte dies die Synthese von fehlerhaften Proteinen zur Folge.

Diese Hypothese konnte durch zwei voneinander unabhängige Experimente bestätigt werden. Zum einen war die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase, deren Kernkomponenten Cox1, 2 und 3 alle im mitochondrialen Genom kodiert sind, in den $\Delta guf1$ -Mitochondrien stark verringert (vgl. Kapitel 3.1.8). Zum anderen wurde gerade für die Untereinheiten Cox1 und Cox2 eine Anhäufung fehlerhafter Translationsprodukte festgestellt (vgl. Kapitel 3.1.7). Im Falle von Cox2 äußerte sich dies durch eine verstärkte Tendenz zur Aggregation. Die fehlerhafte Synthese von Cox1 hingegen äußerte sich durch die Akkumulation eines aberranten Translationsproduktes (mp15). Dieses tritt häufig dann auf, sobald die Synthese bzw. Insertion und Assemblierung von Cox1 in den COX-Komplex beeinträchtigt ist [157].

Diese Analysen bestätigen somit die aus den Wachstumstests erhaltenen Ergebnisse. Während Guf1 unter optimalen Bedingungen nicht notwendig ist, ist das Protein für eine effiziente Translation unter suboptimalen Bedingungen von großer Wichtigkeit. Durch seine prozeßoptimierende Wirkung vermindert es einerseits die Fehlerrate während der Translation. Andererseits gewährleistet Guf1 eine effektive Translation bei niedrigen Temperaturen und ermöglicht dadurch eine unmittelbare Anpassung an ungünstige Wachstumsbedingungen.

4.1.3 Die Bedeutung von Guf1 für die Produktion von Membranproteinen in Mitochondrien

Im Gegensatz zu den löslichen Elongationsfaktoren Tu und G wurde LepA als membranassoziierte GTPase identifiziert [81]. Dies und die Tatsache, daß das Gen für LepA in einem Operon mit dem der Leaderpeptidase kodiert ist [80], ließ eine Rolle speziell bei der Produktion von Membranproteinen bzw. sekretorischen Proteinen vermuten. Experimentell konnte eine solche Funktion allerdings bisher nicht bestätigt werden.

Eine Rolle speziell in der Produktion von Membranproteinen ist durchaus auch für Guf1 denkbar. Dieses wurde ebenfalls als membranständiges Matrixprotein identifiziert (s. Kapitel 3.1.2 und 3.1.3). Die Membranbindung könnte durch die LepA/Guf1-spezifische C-terminale Domäne, die allen Guf1-Homologen zu eigen ist, vermittelt werden. Ähnliches wurde auch bereits für LepA vermutet [114]. Obwohl eine Analyse der Aminosäuresequenz keine direkten Hinweise auf eine Membranassoziation von

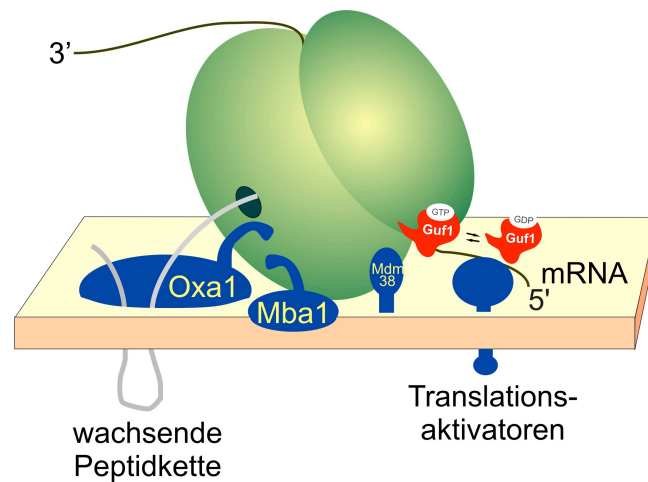


Abbildung 4.1: Modell für die Koordination von Synthese und Insertion mitochondrial kodierter Proteine in die Mitochondrienmembran. Das mitochondriale Ribosom ist während der kotranslationalen Proteininsertion an der Innenmembran lokalisiert. Dort interagiert es mit mitochondrialen Translationsaktivatoren [95] [33] [68], der Translokase Oxa1 [137] [61], mit Mba1 [102] und anderen beteiligten Faktoren, z. B. Mdm38 [36]. Als optimierender Faktor der Translation wirkt die membranständige GTPase Guf1.

Guf1/LepA über diese Domäne ergeben hatte, ist eine Bindung an die Membran über diese Domäne durchaus denkbar. Alle anderen Domänen von Guf1 bzw. LepA wiesen starke Ähnlichkeit zu Domänen in EF-G auf. Die Möglichkeit, daß eine dieser Domänen die Membranassoziation vermittelt, ist eher unwahrscheinlich.

Das mitochondriale Genom in *S. cerevisiae* kodiert vorwiegend für stark hydrophobe Membranproteine. Um deren Aggregation zu verhindern, ist die Translation der Proteine eng mit ihrer Insertion in die mitochondriale Innenmembran gekoppelt [137] [61] [95]. Ein membranassoziierter Elongationsfaktor, der in die Optimierung der Synthese involviert ist, könnte gleichzeitig indirekt die kotranslationale Insertion koordinieren und so eine effiziente Assemblierung der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe ermöglichen (s. Abb. 4.1).

Durch verschiedene Experimente konnte gezeigt werden, daß Guf1 tatsächlich eine Rolle in der Produktion von Membranproteinen spielt. Ein erster Hinweis darauf ergab sich aus der bereits erläuterten reduzierten Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität in $\Delta guf1$ -Mitochondrien (s. Abb. 3.10). Weder die Synthese noch die Insertion der mitochondrial kodierten COX-Untereinheiten war unter den gewählten Bedingungen beeinträchtigt. Vielmehr deuteten die verstärkte Tendenz zur Aggregation von Cox2 und das Auftreten des aberranten Proteins mp15 auf eine erhöhte Fehlerrate bei der Translation hin. Darüberhinaus führte die simultane Deletion von Guf1 und des

C-Terminus der Translokase Oxa1 zu einem synthetischen Wachstumsdefekt unter Stressbedingungen (vgl. Kapitel 3.1.12).

Der C-Terminus von Oxa1 ist von essentieller Bedeutung für die Insertion der mitochondrial kodierten Membranproteine. Er stellt die Verbindung zwischen dem membranintegrierten Teil von Oxa1 und dem Ribosom während der kotranslationalen Insertion her und gewährleistet die funktionelle Kopplung beider Prozesse [137] [61]. Die Deletion dieser C-terminalen Domäne führt zwar nicht zu einem respiratorischen Phänotyp, jedoch beeinträchtigt sie die Insertion der mitochondrial kodierten Proteine.

Die Tatsache, daß die Deletion von Guf1 in Kombination mit der C-terminalen Oxa1-Deletion zu einem respiratorischen Defekt unter Stressbedingungen führt, bestätigt eine Funktion von Guf1 in der Biogenese von Membranproteinen. Gleichzeitig spricht sie auch für die funktionelle Kopplung von Translation und Insertion. Während sich die C-terminale Deletion auf den Insertionsprozeß auswirkt, beeinflusst die Deletion von Guf1 den Translationsprozeß. Unter normalen Bedingungen wird die Doppeldeletion toleriert, da hier ein funktionelles Guf1 nicht zwingend notwendig ist und nur die Insertion durch die C-terminale Oxa1-Deletion beeinträchtigt ist. Unter restriktiven Bedingungen dagegen ist die Funktion von Guf1 von entscheidender Bedeutung, in diesem Fall sind also Translation und Insertion betroffen. Durch die Doppeldeletion werden nicht mehr genügend funktionelle Proteine produziert und inseriert, um die Zellatmung aufrechtzuerhalten. Dies führt zu der beobachteten Letalität.

Die vorgeschlagene Funktion von Guf1 als translationsoptimierender Faktor wirft jedoch die Frage auf, weshalb eine Deletion nicht zu einem ausgeprägteren Phänotyp führt. Mehrere Arbeiten legen die Vermutung nahe, daß die mitochondrial kodierten Proteine vermutlich im Überschuß über ihre nukleär kodierten Assemblierungspartner produziert werden [78] [2]. Unter normalen Bedingungen wird nur ein geringer Anteil der synthetisierten Proteine in die mitochondrialen Atmungskettenkomplexe eingebaut. Ein Großteil der produzierten Proteine wird dagegen vermutlich abgebaut [63] [2].

Obwohl ein derartiges Szenario ökonomisch nicht sinnvoll erscheint, ermöglicht es die Auswahl funktioneller Polypeptidketten und verhindert die Entstehung von nicht-funktionellen oder gar schädlichen OXPHOS-Komplexen. Wie die Selektion der Proteine funktioniert, ist nicht genau verstanden. Hinweise lassen jedoch vermuten, daß diese zeitlich an den Insertions- und Assemblierungsprozeß gekoppelt ist [63].

Unter normalen bzw. optimalen Bedingungen wird sich also eine Deletion von Guf1 nicht unmittelbar auf das Wachstum der Hefen auswirken. Die Synthese von fehlerhaften Peptidketten ist unter diesen Bedingungen zum einen vermutlich sehr gering. Zum anderen ermöglicht die Produktion im Überschuß und die nachgeschaltete Qual-

titätskontrolle durch die Membranproteasen die Selektion funktioneller Polypeptide aus einem großen Pool synthetisierter Proteine. Trotz möglicher Fehler bei der Proteinsynthese ist dadurch die Assemblierung von funktionellen Atmungskettenkomplexen gewährleistet.

Unter restriktiven Bedingungen sind die Zellen dagegen gezwungen, ihre Proteinproduktion an die vorhandenen Nährstoffbedingungen anzupassen. Ein Synthese im starken Überschuß ist daher nicht möglich. Eine vermehrte Produktion fehlerhafter Proteine, wie dies bei einer Deletion von Guf1 der Fall ist, kann unter diesen Bedingungen nicht so einfach toleriert werden. Durch das Fehlen des optimierenden Faktors werden nicht mehr genügend funktionelle Proteine produziert, um die Zellatmung aufrechtzuerhalten. Dies führt zu den beobachteten Wachstumsdefekten unter suboptimalen Wachstumsbedingungen.

4.2 Charakterisierung des Oxa1-Ribosomen-Komplexes

4.2.1 Die mitochondriale Translokase Oxa1

Die physische und funktionelle Kopplung der Translokase Oxa1 mit dem mitochondrialen Ribosom ist für den kotranslationalen Insertionsprozeß in Hefe von essentieller Bedeutung. Obwohl Oxa1 in den letzten Jahren recht gut charakterisiert werden konnte (zur Übersicht s. [136]), ist über seine Struktur und Funktionsweise wenig bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Eli O. van der Sluis (AK Beckmann, Genzentrum der LMU München, Deutschland) ein Komplex aus gereinigtem Oxa1, gebunden an mitochondriale Ribosomen, *in vitro* rekonstituiert. Dieser Komplex sollte als Grundlage für strukturelle Untersuchungen mittels Kryo-EM dienen.

Für die Analysen wurde Oxa1 aus dem Schimmelpilz *N. crassa* gereinigt. Dieses war bereits vor kurzem als funktionelles Mitglied der Oxa1/YidC/Alb3-Familie identifiziert und charakterisiert worden [96].

Obwohl die Sequenzidentität innerhalb der Oxa1/YidC/Alb3-Familie generell eher gering ist, zeichnen sich alle Mitglieder durch eine konservierte Kernregion aus [27] [38]. Diese besteht aus fünf Transmembrandomänen, die in charakteristischer Art aufeinander folgen. Zusätzlich sind einige Mitglieder der Oxa1/YidC/Alb3-Familie durch eine C-terminale Domäne gekennzeichnet. Hierbei handelt es sich um eine lösliche Domäne von ca. 100 Aminosäureresten mit der Tendenz zu Bildung von coiled-coil-Strukturen [56]. Für das Oxa1 aus Hefe konnte kürzlich gezeigt werden, daß diese Domäne eine entscheidende Rolle im kotranslationalen Insertionsprozeß spielt und die Bindung an das mitochondriale Ribosom vermittelt [137] [61].

Ähnlich wie das Homolog aus Hefe verfügt auch Oxa1 aus *N. crassa* über diesen konservierten Aufbau [96]. Obwohl die Sequenzidentität zwischen beiden Proteinen

nur bei ca. 25 % liegt, kann Oxa1 aus *N. crassa* das Homolog aus Hefe funktionell ersetzen. Die Expression von Oxa1 (*N. c.*) in Hefe behebt nicht nur den respiratorischen Defekt der Oxa1-Deletion, sie führt auch zur Bildung annähernd normaler Cox2-Mengen in den Mitochondrien [96]. Cox2 ist das mitochondrial kodierte Protein in Hefe, dessen Insertion am stärksten von einem funktionellen Oxa1-Protein abhängt. Die Deletion von Oxa1 führt zur Akkumulation und nachfolgend zum Abbau des Cox2-Vorläufers in der Matrix [52] [51]. Die Tatsache, daß Oxa1 (*N. c.*) zur Bildung stabiler Mengen an Cox2 in Hefe führt, zeigt, daß das mitochondriale Ribosom während der kotranslationalen Insertion funktionell mit dem Oxa1-Homolog aus *N. crassa* interagieren kann. Dies ermöglicht eine effektive Insertion der mitochondrial kodierte Proteine und führt zur funktionellen Assemblierung mitochondrialer Atmungskettenkomplexe.

Sowohl in Hefe als auch in *N. crassa* liegt Oxa1 als homooligomerer Komplex vor. Bereits in früheren Arbeiten konnte gezeigt werden, daß beide eine molekulare Masse von 200 bis 300 kDa aufweisen [137] [96]. Obwohl eine exakte Aussage über die Stöchiometrie in detergenzhaltigem Puffer schwierig ist, legt die bestimmte Masse eine Zahl von vier Oxa1-Untereinheiten pro Komplex nahe.

Wie die Oligomerisierung der Oxa1-Proteine vermittelt wird, ist noch nicht verstanden. Arbeiten mit C-terminalen Deletionsmutanten aus Hefe zeigten, daß die lösliche Domäne nicht für die Komplexbildung nötig ist. Unabhängig von der Deletion des C-Terminus oligomerisierte das verkürzte Oxa1-Protein zu einem stabilen Komplex [137]. Je nach Ausmaß der C-terminalen Deletion führte diese jedoch zu einem mehr oder weniger starken respiratorischen Phänotyp, was die Bedeutung dieser Domäne für die funktionelle Kopplung von Translation und Insertion bewies.

4.2.2 Mitochondriale Ribosomen und ihre funktionelle Kopplung mit Oxa1

Für die Rekonstitution des Oxa1-Ribosomen-Komplexes wurden mitochondriale Ribosomen aus *N. crassa* und *S. cerevisiae* gereinigt.

Obwohl insbesondere in den letzten Jahren viel zum Wissen und besseren Verständnis der mitochondrialen Translation beigetragen wurde, ist über die genaue Funktionsweise und die dabei ablaufenden Mechanismen wenig bekannt. Verschiedene Studien deuten darauf hin, daß das Translationssystem der Mitochondrien dem der Prokaryoten ähnelt. So können beispielsweise die Translationsfaktoren EF-Tu und IF-2 aus Hefemitochondrien ihre prokaryotischen Gegenstücke funktionell ersetzen [107] [42]. Ein Ersatz zytoplasmischer Faktoren war dagegen nicht möglich.

Trotz dieser Ähnlichkeiten zum prokaryotischen System gibt es aber auch Hinweise auf wesentliche Unterschiede zwischen beiden Translationssystemen. Allein schon die Abweichungen der Verhältnisse von RNA zu Protein in beiden Ribosomen (30:70 für

mitochondriale Ribosomen gegenüber 70:30 in prokaryotischen Ribosomen) verdeutlichen, daß sich beide Ribosomenarten auf struktureller Ebene erheblich voneinander unterscheiden. Dies wird insbesondere auch durch das unterschiedliche Verhalten von prokaryotischen und mitochondrialen Ribosomen *in vitro* deutlich. Während der Umgang mit isolierten prokaryotischen Ribosomen relativ problemlos ist und seit Jahren ein funktionelles *in vitro*-Translationssystem existiert, konnte ein vergleichbares System für mitochondriale Ribosomen noch nicht etabliert werden. Im Gegensatz zu den prokaryotischen Ribosomen sind diese *in vitro* schwierig zu handhaben. Sie zeigten während der Reinigung eine starke Tendenz zur Aggregation, ein Verhalten, das durch die Anwesenheit von Detergenz und Kardiolipin in allen Puffern deutlich reduziert werden konnte. Ursache für diese Tendenz zur Aggregation *in vitro* ist vermutlich die enge Bindung der Ribosomen an die innere Mitochondrienmembran. Tatsächlich gelten die mitochondrialen Ribosomen verschiedener Organismen als membranständige Proteinkomplexe [74] [149] und ähneln in ihrem Verhalten eher peripheren Membranproteinen als löslichen Proteinen. Die enge Kopplung der Ribosomen an die Membran könnte auch erklären, weshalb es bisher noch nicht möglich war, ein funktionelles Translationssystem zu etablieren. Angesichts ihres Verhaltens in wässrigen Lösungen ist es durchaus möglich, daß die Ribosomen die Umgebung einer Membran oder auch bestimmte Proteinkomplexe aus der Membran benötigen, um Proteine translatieren zu können. Die Untersuchung ihrer Struktur ist also insbesondere auch in dieser Hinsicht von großem Interesse.

Wie bereits zuvor beschrieben, wird die Bindung des Ribosoms an die Membran unter anderem von der C-terminalen Domäne des Membranproteins Oxa1 vermittelt. Durch verschiedene Studien konnte die Bedeutung der Bindung für die funktionelle Insertion von Proteinen in die innere Mitochondrienmembran gezeigt werden [137] [61]. Dabei wurde deutlich, daß die Bindung von Oxa1 an das Ribosom über eine konservierte Bindungsstelle am Ribosom vermittelt wird. Quervernetzungsexperimente lassen vermuten, daß Oxa1 das Ribosom über das Protein Mrp20 kontaktiert [61].

Das zu Mrp20 homologe Protein in *E. coli* ist L23. Für dieses Protein, das nahe dem Tunnelausgang für wachsende Peptidketten lokalisiert ist [156] [128], wurde bereits mehrfach gezeigt, daß es Teil einer universellen Bindestelle ist. Es dient, gemeinsam mit dem Protein L29, als Anlagerungsstelle für den Triggerfaktor [67], das prokaryotische SRP [49] und SecYEG [89]. Ähnliche Befunde lieferten auch strukturelle Untersuchungen zytosolischer 80S Ribosomen. Sowohl das eukaryotische SRP [49] [50] als auch das Sec-Translokon [8] gehen während der kotranslationalen Proteinsortierung Bindungen mit dem L23-Homolog Rpl25 und Rpl35 (L29 in *E. coli*) ein.

Die Tatsache, daß die Bindung verschiedener Faktoren an das Ribosom in allen drei

Translationssystemen über diese Bindungsstelle erfolgt, verdeutlicht ihre universelle Konservierung. Trotzdem lassen vor allem strukturelle Untersuchungen an mitochondrialen Säugerribosomen eine gewisse Spezialisierung der Mitoribosomen vermuten [132]. Diese Analysen zeigten unter anderem, daß sich der Tunnelausgang des mitochondrialen Ribosoms stark von dem des prokaryotischen Ribosoms unterscheidet. Im Gegensatz zum prokaryotischen Ribosom, bei dem die unteren zwei Drittel des Tunnels hauptsächlich von ribosomaler RNA gebildet werden [156] [128], werden im mitochondrialen Ribosom Tunnel und Ausgang von ribosomalen Proteinen gebildet [132]. Damit ist die grundlegende Struktur gegenüber prokaryotischen Ribosomen drastisch verändert.

Neben dem eigentlichen Tunnelausgang wurde zusätzlich noch eine zweite Öffnung beobachtet, die spezifisch für mitochondriale Ribosomen ist. Diese befand sich in einem Abstand zum eigentlichen Tunnelausgang, was die Autoren über eine mögliche Funktion dieser Öffnung bei der kotranslationalen Proteininsertion über Oxa1 spekulieren ließ [132]. Interessanterweise wurde anstelle des Proteins L29, das in den analysierten Rinder-Ribosomen fehlt, eine deckelartige Struktur beobachtet. Für diese wurde eine mögliche regulatorische Funktion bei der schrittweisen Insertion der Membranproteine vorgeschlagen [132].

Da es sich bei den beschriebenen Resultaten allerdings um Beobachtungen handelt, die allein durch die Untersuchung gereinigter Ribosomen gewonnen wurden, kann über die Richtigkeit dieser Vermutungen keine Aussage gemacht werden. Diese Vermutungen einer Anpassung speziell an die Bedürfnisse einer optimalen kotranslationalen Membraninsertion erscheinen reizvoll. Allerdings gibt es für eine derartige Spezialisierung noch keinerlei funktionellen Nachweis. Zudem muß auch bemerkt werden, daß sich das mitochondriale Säugerribosom, nicht nur was seinen RNA- und Proteingehalt angeht, stark von den mitochondrialen Ribosomen aus Hefe und *N. crassa* unterscheidet, sondern sehr wahrscheinlich auch in seinem Aufbau. Die Sedimentationskoeffizienten von 72S bzw. 73S der Hefe- und *N. crassa*-Mitoribosomen legen einen Aufbau ähnlich dem der prokaryotischen Ribosomen nahe. Zugleich läßt ihr unterschiedlicher Protein- und RNA-Gehalt aber auch strukturelle Anpassungen an spezielle Bedingungen, ähnlich denen der Säuger-Mitoribosomen, vermuten. Inwieweit diese Vermutungen wirklich zutreffen und welche Anpassungen evtl. mit der kotranslationalen Insertion in Zusammenhang stehen, wird sich durch die Aufklärung der Struktur des rekonstituierten Oxa1-Ribosomen-Komplexes zeigen.

Kapitel 5

Zusammenfassung

Das mitochondriale Genom in Hefe kodiert nur noch für acht Proteine. Sieben davon sind Kernkomponenten der mitochondrialen Atmungskettenkomplexe. Ihre effiziente und koordinierte Synthese ist Voraussetzung für die Energiegewinnung durch oxidative Phosphorylierung.

Um die Funktionalität der stark hydrophoben Membranproteine zu gewährleisten, ist ihre Translation mit der Insertion in die mitochondriale Innenmembran gekoppelt. Hierbei handelt es sich um einen hochkomplexen Prozeß, der von mehreren Komponenten katalysiert wird. Neben dem mitochondrialen Ribosom spielt die membranintegrierte Translokase Oxa1 eine zentrale Rolle. Darüberhinaus sind mit Mba1, Mdm38 und verschiedenen Translationaktivatoren zahlreiche weitere Proteine an der Koordination von Proteinsynthese und Membraninsertion beteiligt.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die mitochondriale GTPase Guf1 charakterisiert. Vergleichende Sequenzanalysen zeigten, daß Guf1 ein hochkonserviertes Protein ist und zur Klasse der Elongationsfaktoren gehört. Innerhalb dieser Klasse bilden die Guf1-Proteine neben den EF-Tu- und den EF-G-Proteinen eine eigene Familie aus. Durch verschiedene Experimente *in vivo* und *in organello* konnte der Einfluß von Guf1 auf die mitochondriale Translation nachgewiesen werden. Seine Funktion ist vor allem unter Stressbedingungen (hohe und niedrige Temperaturen, Kohlenstofflimitierten Bedingungen) von entscheidender Bedeutung. Eine Deletion des Gens für Guf1 führt bei niedrigen Temperaturen zu einer Reduktion der mitochondrialen Proteinsynthese. Hohe Temperaturen dagegen führen zur Synthese fehlerhafter Polypeptidketten. Dies wirkt sich auf die Funktionalität mitochondrialer Atmungskettenkomplexe aus und führt, insbesondere unter restriktiven Bedingungen, zu einem respiratorischen Phänotyp.

Weiterhin konnte gezeigt werden, daß Guf1 GTP-abhängig an mitochondriale Ribosomen bindet. Der Mechanismus der Bindung entspricht dem, der auch für die

Elongationsfaktoren Tu und G beschrieben ist [17]. Während Guf1 in der 'aktiven' GTP-Form an Ribosomen binden kann, liegt Guf1 in der 'inaktiven' GDP-Form vorwiegend in ungebundener Form vor. Für die Dissoziation des Faktors vom Ribosom ist die Hydrolyse von GTP notwendig.

Die funktionelle Kopplung der mitochondrialen Translation mit der Insertion der Proteine wurde durch eine Doppeldeletion von Guf1 und dem C-Terminus von Oxa1 bestätigt. Diese führte unter suboptimalen Bedingungen zu einem synthetischen Wachstumsdefekt.

Diese Ergebnisse zeigen, daß Guf1 die mitochondriale Translation hinsichtlich Effizienz und Korrektheit optimiert und insbesondere unter Stressbedingungen die bestmögliche Synthese mitochondrial kodierter Proteine gewährleistet.

Um die Interaktion von Oxa1 mit mitochondrialen Ribosomen auf struktureller Ebene zu charakterisieren, wurde im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit ein funktioneller Komplex dieser beiden Komponenten für kryo-elektronenmikroskopische Analysen rekonstituiert.

Für die Durchführung der Analysen wurde Oxa1-His6 aus *N. crassa* gereinigt. Dieses wurde *in vitro* an gereinigte und funktionell assemblierte Ribosomen aus *S. cerevisiae* und *N. crassa* gebunden. Die Bindung wurde in etablierten Assays analysiert. Die erhaltenen Resultate sprechen für eine erfolgreiche und funktionelle Rekonstitution des Oxa1-Ribosomen-Komplexes.

Literaturverzeichnis

- [1] Altamura, N., Capitanio, N., Bonnefoy, N., Papa, S., Dujardin, G., The *Saccharomyces cerevisiae* *OXA1* gene is required for the correct assembly of cytochrome *c* oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase, *FEBS Lett.*, **382** (1-2), 111–5, 1996
- [2] Arnold, I., Langer, T., Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta*, **1592** (1), 89–96, 2002
- [3] Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., Steitz, T. A., The Complete Atomic Structure of the Large Ribosomal Subunit at 2.4 Å Resolution, *Science*, **289** (5481), 905–20, 2000
- [4] Barat, C., Datta, P. P., Raj, V. S., Sharma, M. R., Kaji, H., Kaji, A., Agrawal, R. K., Progression of the Ribosome Recycling Factor through the Ribosome Dissociates the Two Ribosomal Subunits, *Mol. Cell*, **27** (2), 250–61, 2007
- [5] Batey, R. T., Rambo, R. P., Lucast, L., Rha, B., Doudna, J. A., Crystal Structure of the Ribonucleoprotein Core of the Signal Recognition Particle, *Science*, **287** (5456), 1232–9, 2000
- [6] Bauer, M., Behrens, M., Esser, K., Michaelis, G., Pratje, E., *PET1402*, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast, *Mol. Gen. Genet.*, **245** (3), 272–8, 1994
- [7] Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R. E., Brunner, J., Müller, M., YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids, *EMBO Rep.*, **2** (8), 709–14, 2001
- [8] Beckmann, R., Spahn, C. M. T., Eswar, N., Helmers, J., Penczek, P. A., Sali, A., Frank, J., Blobel, G., Architecture of the Protein-Conducting Channel Associated with the Translating 80S Ribosome, *Cell*, **107** (3), 361–72, 2001

-
- [9] van den Berg, B., Clemons, Jr., W.M., Collinson, I., Modis, Y., Hartmann, E., Harrison, S.C., Rapoport, T.A., X-ray structure of a protein-conducting channel, *Nature*, **427** (6969), 36–44, 2004
- [10] Birnboim, H.C., Doly, J., A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res.*, **7** (6), 1513–23, 1979
- [11] van Bloois, E., Haan, G.-J., de Gier, J.-W., Oudega, B., Luirink, J., Distinct Requirements for Translocation of the N-tail and C-tail of the *Escherichia coli* Inner Membrane Protein CyoA, *J. Biol. Chem.*, **281** (15), 10002–9, 2006
- [12] van Bloois, E., Haan, G.J., de Gier, J.-W., Oudega, B., Luirink, J., F₁F_o ATP synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the *E. coli* inner membrane, *FEBS Lett.*, **576** (1-2), 97–100, 2004
- [13] van Bloois, E., Koningstein, G., Bauerschmitt, H., Herrmann, J.M., Luirink, J., *Saccharomyces cerevisiae* Cox18 complements the essential Sec-independent function of *Escherichia coli* YidC, *FEBS J.*, **274** (21), 5704–13, 2007
- [14] van Bloois, E., Nagamori, S., Koningstein, G., Ullers, R.S., Preuss, M., Oudega, B., Harms, N., Kaback, H.R., Herrmann, J.M., Luirink, J., The Sec-independent Function of *Escherichia coli* YidC Is Evolutionary-conserved and Essential, *J. Biol. Chem.*, **280** (13), 12996–3003, 2005
- [15] Bonnefoy, N., Chalvet, F., Hamel, P., Slonimski, P.P., Dujardin, G., *OXA1*, a *Saccharomyces cerevisiae* Nuclear Gene whose Sequence is Conserved from Prokaryotes to Eukaryotes Controls Cytochrome Oxidase Biogenesis, *J. Mol. Biol.*, **239** (2), 201–12, 1994
- [16] Borst, P., Grivell, L.A., The Mitochondrial Genome of Yeast, *Cell*, **15** (3), 705–23, 1978
- [17] Bourne, H.R., Sanders, D.A., McCormick, F., The GTPase superfamily: a conserved switch for diverse cell functions, *Nature*, **348** (6297), 125–32, 1990
- [18] Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P., Boeke, J.D., Designer Deletion Strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a Useful set of Strains and Plasmids for PCR-mediated Gene Disruption and Other Applications, *Yeast*, **14** (2), 115–32, 1998
- [19] Bradford, M.M., A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding, *Anal. Biochem.*, **72** (1-2), 248–54, 1976

-
- [20] Burger, G., Gray, M. W., Lang, B. F., Mitochondrial genomes: anything goes, *Trends Genet.*, **19** (12), 709–16, 2003
- [21] Celebi, N., Yi, L., Facey, S. J., Kuhn, A., Dalbey, R. E., Membrane Biogenesis of Subunit II of Cytochrome *bo* Oxidase: Contrasting Requirements for Insertion of N-terminal and C-terminal Domains, *J. Mol. Biol.*, **357** (5), 1428–36, 2006
- [22] Chen, M., Xie, K., Nouwen, N., Driessen, A. J. M., Dalbey, R. E., Conditional Lethal Mutations Separate the M13 Procoat and Pf3 Coat Functions of YidC, *J. Biol. Chem.*, **278** (26), 23295–300, 2003
- [23] Chiron, S., Suleau, A., Bonnefoy, N., Mitochondrial Translation: Elongation Factor Tu Is Essential in Fission Yeast and Depends on an Exchange Factor Conserved in Humans but Not in Budding Yeast, *Genetics*, **169** (4), 1891–901, 2005
- [24] Clemons Jr, W. M., May, J. L. C., Wimberly, B. T., McCutcheon, J. P., Capel, M. S., Ramakrishnan, V., Structure of a bacterial 30S ribosomal subunit at 5.5 Å resolution, *Nature*, **400** (6747), 833–40, 1999
- [25] Connolly, T., Rapiejko, P. J., Gilmore, R., Requirement of GTP Hydrolysis for Dissociation of the Signal Recognition Particle from Its Receptor, *Science*, **252** (5010), 1171–3, 1991
- [26] Dahl, L. D., Wieden, H.-J., Rodnina, M. V., Knudsen, C. R., The Importance of P-loop and Domain Movements in EF-Tu for Guanine Nucleotide Exchange, *J. Biol. Chem.*, **281** (30), 21139–46, 2006
- [27] Dalbey, R. E., Kuhn, A., YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins, *J. Cell Biol.*, **166** (6), 769–74, 2004
- [28] Daum, G., Gasser, S. M., Schatz, G., Import of Proteins into Mitochondria, *J. Biol. Chem.*, **257** (21), 13075–80, 1982
- [29] Dibb, N. J., Wolfe, P. B., *lep* Operon Proximal Gene Is Not Required for Growth or Secretion by *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **166** (1), 83–7, 1986
- [30] Driessen, A. J. M., Nouwen, N., Protein Translocation Across the Bacterial Cytoplasmic Membrane, *Annu. Rev. Biochem.*, 2008, im Druck, online erschienen im Dez. 2007

-
- [31] Ferbitz, L., Maier, T., Patzelt, H., Bukau, B., Deuerling, E., Ban, N., Trigger factor in complex with the ribosome forms a molecular cradle for nascent proteins, *Nature*, **431** (7008), 590–6, 2004
- [32] Fiori, A., Mason, T.L., Fox, T.D., Evidence that Synthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrially Encoded Ribosomal Protein Var1p May Be Membrane Localized, *Eukaryotic Cell*, **2** (3), 651–3, 2003
- [33] Fox, T.D., Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting, *Experientia*, **52** (12), 1130–5, 1996
- [34] Frank, J., The ribosome - a macromolecular machine par excellence, *Chem. Biol.*, **7** (6), R133–41, 2000
- [35] Frank, J., Agrawal, R.K., A ratchet-like inter-subunit reorganization of the ribosome during translocation, *Nature*, **406** (6793), 318–22, 2000
- [36] Frazier, A.E., Taylor, R.D., Mick, D.U., Warscheid, B., Stoepel, N., Meyer, H.E., Ryan, M.T., Guiard, B., Rehling, P., Mdm38 interacts with ribosomes and is a component of the mitochondrial protein export machinery, *J. Cell Biol.*, **172** (4), 553–64, 2006
- [37] Funes, S., Gerdes, L., Inaba, M., Soll, J., Herrmann, J.M., The *Arabidopsis thaliana* chloroplast inner envelope protein ARTEMIS is a functional member of the Alb3/Oxa1/YidC family of proteins, *FEBS Lett.*, **569** (1-3), 89–93, 2004
- [38] Funes, S., Nargang, F.E., Neupert, W., Herrmann, J.M., The Oxa2 Protein of *Neurospora crassa* Plays a Critical Role in the Biogenesis of Cytochrome Oxidase and Defines a Ubiquitous Subbranch of the Oxa1/YidC/Alb3 Protein Family, *Mol. Biol. Cell*, **15** (4), 1853–61, 2004
- [39] Gan, X., Arita, K., Isono, S., Kitakawa, M., Yoshino, K., Yonezawa, K., Kato, A., Inoue, H., Isono, K., Identification and comparative analysis of the large subunit mitochondrial ribosomal proteins of *Neurospora crassa*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **254** (1), 157–64, 2006
- [40] Gan, X., Kitakawa, M., Yoshino, K., Oshiro, N., Yonezawa, K., Isono, K., Tag-mediated isolation of yeast mitochondrial ribosome and mass spectrometric identification of its new components, *Eur. J. Biochem.*, **269** (21), 5203–14, 2002
- [41] Gao, N., Zavialov, A.V., Li, W., Sengupta, J., Valle, M., Gursky, R.P., Ehrenberg, M., Frank, J., Mechanism for the Disassembly of the Posttermination Complex Inferred from Cryo-EM Studies, *Mol. Cell*, **18** (6), 663–74, 2005

- [42] Garofalo, C., Kramer, G., Appling, D. R., Characterization of the C2 sub-domain of yeast mitochondrial initiation factor 2, *Arch. Biochem. Biophys.*, **439** (1), 113–20, 2005
- [43] Garofalo, C., Trinko, R., Kramer, G., Appling, D. R., Hardesty, B., Purification and characterization of yeast mitochondrial initiation factor 2, *Arch. Biochem. Biophys.*, **413** (2), 243–52, 2003
- [44] de Gier, J.-W. L., Luirink, J., The ribosome and YidC, *EMBO Rep.*, **4** (10), 939–43, 2003
- [45] Gietz, R. D., Woods, R. A., Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method, *Meth. Enzymol.*, **350**, 87–96, 2002
- [46] Gray, M. W., Evolution of organellar genomes, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, **9** (6), 678–87, 1999
- [47] Green-Willms, N. S., Fox, T. D., Costanzo, M. C., Functional Interactions between Yeast Mitochondrial Ribosomes and mRNA 5' Untranslated Leaders, *Mol. Cell. Biol.*, **18** (4), 1826–34, 1998
- [48] Haffter, P., McMullin, T. W., Fox, T. D., Functional Interactions Among Two Yeast Mitochondrial Ribosomal Proteins and an mRNA-Specific Translational Activator, *Genetics*, **127** (2), 319–26, 1991
- [49] Halic, M., Blau, M., Becker, T., Mielke, T., Pool, M. R., Wild, K., Sinning, I., Beckmann, R., Following the signal sequence from ribosomal tunnel exit to signal recognition particle, *Nature*, **444** (7118), 507–11, 2006
- [50] Halic, M., Gartmann, M., Schlenker, O., Mielke, T., Pool, M. R., Sinning, I., Beckmann, R., Signal Recognition Particle Receptor Exposes the Ribosomal Translocon Binding Site, *Science*, **312** (5774), 745–7, 2006
- [51] He, S., Fox, T. D., Membrane Translocation of Mitochondrially Coded Cox2p: Distinct Requirements for Export of N and C Termini and Dependence on the Conserved Protein Oxa1p, *Mol. Biol. Cell*, **8** (8), 1449–60, 1997
- [52] Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., Stuart, R. A., Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space, *FEBS Lett.*, **418** (3), 367–70, 1997
- [53] Hell, K., Herrmann, J. M., Pratje, E., Neupert, W., Stuart, R. A., Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95** (5), 2250–5, 1998

- [54] Hell, K., Neupert, W., Stuart, R. A., Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA, *EMBO J.*, **20** (6), 1281–8, 2001
- [55] Herrmann, J. M., Koll, H., Cook, R. A., Neupert, W., Stuart, R. A., Topogenesis of Cytochrome Oxidase Subunit II, *J. Biol. Chem.*, **270** (45), 27079–86, 1995
- [56] Herrmann, J. M., Neupert, W., Stuart, R. A., Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear-encoded Oxa1p, *EMBO J.*, **16** (9), 2217–26, 1997
- [57] Houben, E. N. G., ten Hagen-Jongman, C. M., Brunner, J., Oudega, B., Luijck, J., The two membrane segments of leader peptidase partition one by one into the lipid bilayer via a Sec/YidC interface, *EMBO Rep.*, **5** (10), 970–5, 2004
- [58] Houben, E. N. G., Scotti, P. A., Valent, Q. A., Brunner, J., de Gier, J.-W. L., Oudega, B., Luijck, J., Nascent Lep inserts into the *Escherichia coli* inner membrane in the vicinity of YidC, SecY and SecA, *FEBS Lett.*, **476** (3), 229–33, 2000
- [59] Houben, E. N. G., Urbanus, M. L., van der Laan, M., ten Hagen-Jongman, C. M., Driessen, A. J. M., Brunner, J., Oudega, B., Luijck, J., YidC and SecY Mediate Membrane Insertion of a Type I Transmembrane Domain, *J. Biol. Chem.*, **277** (39), 35880–6, 2002
- [60] Janke, C., Magiera, M. M., Rathfelder, N., Taxis, C., Reber, S., Maekawa, H., Moreno-Borchart, A., Doenges, G., Schwob, E., Schiebel, E., Knop, M., A versatile toolbox for PCR-based tagging of yeast genes: new fluorescent proteins, more markers and promoter substitution cassettes, *Yeast*, **21** (11), 947–62, 2004
- [61] Jia, L., Dienhart, M., Schramp, M., McCauley, M., Hell, K., Stuart, R. A., Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1, *EMBO J.*, **22** (24), 6438–47, 2003
- [62] Jiang, F., Yi, L., Moore, M., Chen, M., Rohl, T., Van Wijk, K.-J., de Gier, J.-W. L., Henry, R., Dalbey, R. E., Chloroplast YidC Homolog Albino3 Can Functionally Complement the Bacterial YidC Depletion Strain and Promote Membrane Insertion of Both Bacterial and Chloroplast Thylakoid Proteins, *J. Biol. Chem.*, **277** (22), 19281–8, 2002

- [63] Käser, M., Langer, T., Protein degradation in mitochondria, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **11** (3), 181–90, 2000
- [64] Kawashima, T., Berthet-Colominas, C., Wulff, M., Cusack, S., Leberman, R., The structure of the *Escherichia coli* EF-Tu-EF-Ts complex at 2.5 Å resolution, *Nature*, **379** (6565), 511–8, 1996
- [65] Kiser, G. L., Weinert, T. A., *GUF1*, A Gene Encoding a Novel Evolutionarily Conserved GTPase in Budding Yeast, *Yeast*, **11** (13), 1311–6, 1995
- [66] Kitakawa, M., Isono, K., The mitochondrial ribosomes, *Biochimie*, **73** (6), 813–25, 1991
- [67] Kramer, G., Rauch, T., Rist, W., Vorderwülbecke, S., Patzelt, H., Schulze-Specking, A., Ban, N., Deuerling, E., Bukau, B., L23 protein functions as a chaperone docking site on the ribosome, *Nature*, **419** (6903), 171–4, 2002
- [68] Krause-Buchholz, U., Schöbel, K., Lauffer, S., Rödel, G., *Saccharomyces cerevisiae* translational activator Cbs1p is associated with translationally active mitochondrial ribosomes, *Biol. Chem.*, **386** (5), 407–15, 2005
- [69] Kushnirov, V. V., Rapid and reliable protein extraction from yeast, *Yeast*, **16** (9), 857–60, 2000
- [70] van der Laan, M., Bechtluft, P., Kol, S., Nouwen, N., Driessen, A. J. M., F₁F_o ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis, *J. Cell Biol.*, **165** (2), 213–22, 2004
- [71] van der Laan, M., Houben, E. N. G., Nouwen, N., Luirink, J., Driessen, A. J. M., Reconstitution of Sec-dependent membrane protein insertion: nascent FtsQ interacts with YidC in a SecYEG-dependent manner, *EMBO Rep.*, **2** (6), 519–23, 2001
- [72] Laemmli, U. K., Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4, *Nature*, **227** (5259), 680–5, 1970
- [73] Laursen, B. S., Sørensen, H. P., Mortensen, K. K., Sperling-Petersen, H. U., Initiation of Protein Synthesis in Bacteria, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **69** (1), 101–23, 2005
- [74] Liu, M., Spremulli, L., Interaction of Mammalian Mitochondrial Ribosomes with the Inner Membrane, *J. Biol. Chem.*, **275** (38), 29400–6, 2000
- [75] Longtine, M. S., McKenzie III, A., Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., Pringle, J. R., Additional Modules for Versatile

- and Economical PCR-based Gene Deletion and Modification in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, **14** (10), 953–61, 1998
- [76] Luirink, J., ten Hagen-Jongman, C. M., van der Weijden, C. C., Oudega, B., High, S., Dobberstein, B., Kusters, R., An alternative protein targeting pathway in *Escherichia coli*: studies on the role of FtsY, *EMBO J.*, **13** (10), 2289–96, 1994
- [77] Luirink, J., von Heijne, G., Houben, E., de Gier, J.-W., Biogenesis of Inner Membrane Proteins in *Escherichia coli*, *Annu. Rev. Microbiol.*, **59**, 329–55, 2005
- [78] Luzikov, V. N., Proteolytic control over formation of enzymic complexes of the mitochondrial inner membrane, *Revis. Biol. Celular*, **21**, 491–503, 1989
- [79] Mainprize, I. L., Beniac, D. R., Falkovskaia, E., Cleverley, R. M., Gierasch, L. M., Ottensmeyer, F. P., Andrews, D. W., The Structure of *Escherichia coli* Signal Recognition Particle Revealed by Scanning Transmission Electron Microscopy, *Mol. Biol. Cell*, **17** (12), 5063–74, 2006
- [80] March, P. E., Inouye, M., Characterization of the *lep* Operon of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **260** (12), 7206–13, 1985
- [81] March, P. E., Inouye, M., GTP-binding membrane protein of *Escherichia coli* with sequence homology to initiation factor 2 and elongation factors Tu and G, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82** (22), 7500–4, 1985
- [82] Margus, T., Remm, M., Tenson, T., Phylogenetic distribution of translational GTPases in bacteria, *BMC Genomics*, **8** (15), 2007
- [83] Martemyanov, K. A., Gudkov, A. T., Domain IV of elongation factor G from *Thermus thermophilus* is strictly required for translocation, *FEBS Lett.*, **452** (3), 155–159, 1999
- [84] McMullin, T. W., Fox, T. D., *COX3* mRNA-specific Translational Activator Proteins Are Associated with the Inner Mitochondrial Membrane in *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.*, **268** (16), 11737–41, 1993
- [85] Ménétret, J. F., Neuhof, A., Morgan, D. G., Plath, K., Radermacher, M., Rapoport, T. A., Akey, C. W., The Structure of Ribosome-Channel Complexes Engaged in Protein Translocation, *Mol. Cell*, **6** (5), 1219–32, 2000
- [86] Michel, R., Hallermayer, G., Harmey, M. A., Miller, F., Neupert, W., The 73 S ribosome of *Neurospora crassa* is the native mitochondrial ribosome, *Biochim. Biophys. Acta*, **478** (3), 316–30, 1977

- [87] Mick, D. U., Wagner, K., van der Laan, M., Frazier, A. E., Perschil, I., Pawlas, M., Meyer, H. E., Warscheid, B., Rehling, P., Shy1 couples Cox1 translational regulation to cytochrome *c* oxidase assembly, *EMBO J.*, **26** (20), 4347–58, 2007
- [88] Miller, J. D., Bernstein, H. D., Walter, P., Interaction of *E. coli* Ffh/4.5S ribonucleoprotein and FtsY mimics that of mammalian signal recognition particle and its receptor, *Nature*, **367** (6464), 657–9, 1994
- [89] Mitra, K., Frank, J., Driessen, A., Co- and post-translational translocation through the protein-conducting channel: analogous mechanisms at work?, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **13** (11), 957–64, 2006
- [90] Mitra, K., Schaffitzel, C., Shaikh, T., Tama, F., Jenni, S., Brooks III, C. L., Ban, N., Frank, J., Structure of the *E. coli* protein-conducting channel bound to a translating ribosome, *Nature*, **438** (7066), 318–24, 2005
- [91] Moore, M., Goforth, R. L., Mori, H., Henry, R., Functional interaction of chloroplast SRP/FtsY with the ALB3 translocase in thylakoids: substrate not required, *J. Cell Biol.*, **162** (7), 1245–54, 2003
- [92] Mulero, J. J., Fox, T. D., *PET111* Acts in the 5'-Leader of the *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrial COX2 mRNA to Promote Its Translation, *Genetics*, **133** (3), 509–16, 1993
- [93] Nagamori, S., Smirnova, I. N., Kaback, H. R., Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins, *J. Cell Biol.*, **165** (1), 53–62, 2004
- [94] Nagata, S., Tsunetsugu-Yokota, Y., Naito, A., Kaziro, Y., Molecular cloning and sequence determination of the nuclear gene coding for mitochondrial elongation factor Tu of *Saccharomyces cerevisiae*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **80** (20), 6192–6, 1983
- [95] Naithani, S., Saracco, S. A., Butler, C. A., Fox, T. D., Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific Translational Activator Proteins on the Inner Surface of the Mitochondrial Inner Membrane of *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell*, **14** (1), 324–33, 2003
- [96] Nargang, F. E., Preuss, M., Neupert, W., Herrmann, J. M., The Oxa1 Protein Forms a Homooligomeric Complex and Is an Essential Part of the Mitochondrial Export Translocase in *Neurospora crassa*, *J. Biol. Chem.*, **277** (15), 12846–53, 2002

- [97] Neupert, W., Miller, F., Michel, R., Hallermayer, G., Mitochondrial ribosomes of *Neurospora crassa*: Isolation, analysis, and use, *Meth. Enzymol.*, **56**, 79–92, 1979
- [98] Nilsson, J., Nissen, P., Elongation factors on the ribosome, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **15** (3), 349–54, 2005
- [99] Nirenberg, M. W., Matthaei, J. H., The Dependence of Cell-Free Protein Synthesis in *E. coli* upon Naturally Occurring or Synthetic Polyribonucleotides, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **47** (10), 1588–602, 1961
- [100] Noble, C. G., Song, H., Structural studies of elongation and release factors, *Cell. Mol. Life Sci.*, 2008, im Druck, online erschienen im Jan. 2008
- [101] Ogle, J. M., Carter, A. P., Ramakrishnan, V., Insights into the decoding mechanism from recent ribosome structures, *Trends Biochem. Sci.*, **28** (5), 259–66, 2003
- [102] Ott, M., *Biogenese der mitochondrialen Innenmembran: Organisation der ko-translationalen Proteininsertion durch Oxa1 und Mba1*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2006
- [103] Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N., Herrmann, J. M., Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria, *EMBO J.*, **25** (8), 1603–10, 2006
- [104] Pel, H. J., Maat, C., Rep, M., Grivell, L. A., The yeast nuclear gene *MRF1* encodes a mitochondrial peptide chain release factor and cures several mitochondrial RNA splicing defects, *Nucleic Acids Res.*, **20** (23), 6339–46, 1992
- [105] Perez-Martinez, X., Broadley, S. A., Fox, T. D., Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p, *EMBO J.*, **22** (21), 5951–61, 2003
- [106] Peske, F., Rodnina, M. V., Wintermeyer, W., Sequence of Steps in Ribosome Recycling as Defined by Kinetic Analysis, *Mol. Cell*, **18** (4), 403–12, 2005
- [107] Piechulla, B., Küntzel, H., Mitochondrial Polypeptide Elongation Factor EF-Tu of *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **132** (2), 235–40, 1983
- [108] du Plessis, D. J. F., Nouwen, N., Driessen, A. J. M., Subunit a of Cytochrome *o* Oxidase Requires Moth YidC and SecYEG for Membrane Insertion, *J. Biol. Chem.*, **281** (18), 12248–52, 2006

- [109] Pool, M. R., Signal recognition particles in chloroplasts, bacteria, yeast and mammals (Review), *Mol. Membr. Biol.*, **22** (1-2), 3–15, 2005
- [110] Poyton, R. O., Bellus, G., McKee, E. E., Sevarino, K. A., Goehring, B., *In Organello* mitochondrial protein and RNA synthesis systems from *Saccharomyces cerevisiae*, *Meth. Enzymol.*, **264**, 36–42, 1996
- [111] Preuß, M., *Biogenese der Innenmembran von Mitochondrien: Funktion von Mba1 und Oxa1 bei der Insertion von Proteinen*, Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2004
- [112] Preuss, M., Leonhard, K., Hell, K., Stuart, R. A., Neupert, W., Herrmann, J. M., Mba1, a Novel Component of the Mitochondrial Protein Export Machinery of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Cell Biol.*, **153** (5), 1085–96, 2001
- [113] Preuss, M., Ott, M., Funes, S., Luirink, J., Herrmann, J. M., Evolution of Mitochondrial Oxa Proteins from Bacterial YidC, *J. Biol. Chem.*, **280** (13), 13004–11, 2005
- [114] Qin, Y., Polacek, N., Vesper, O., Staub, E., Einfeldt, E., Wilson, D. N., Nierhaus, K. H., The Highly Conserved LepA Is a Ribosomal Elongation Factor that Back-Translocates the Ribosome, *Cell*, **127** (4), 721–33, 2006
- [115] Ramakrishnan, V., Ribosome Structure and the Mechanism of Translation, *Cell*, **108** (4), 557–72, 2002
- [116] Rasmussen, S. W., A 37.5 kb Region of Yeast Chromosome X Includes the *SME1*, *MEF2*, *GSH1* and *CSD3* Genes, a TCP-1-related Gene, an Open Reading Frame Similar to the *DAL80* Gene, and a tRNA^{Arg}, *Yeast*, **11** (9), 873–83, 1995
- [117] Rödel, G., Translational activator proteins required for cytochrome *b* synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*, *Curr. Genet.*, **31** (5), 375–9, 1997
- [118] Rodnina, M. V., Savelsbergh, A., Katunin, V. I., Wintermeyer, W., Hydrolysis of GTP by elongation factor G drives tRNA movement on the ribosome, *Nature*, **385** (6611), 37–41, 1997
- [119] Rosenthal, L. P., Bodley, J. W., Purification and Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondrial Elongation Factor Tu, *J. Biol. Chem.*, **262** (23), 10955–9, 1987
- [120] Rothstein, R. J., One-step gene disruption in yeast, *Meth. Enzymol.*, **101**, 202–11, 1983

- [121] Sambrook, J., Russell, D. W., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury, 3. Aufl., 2001
- [122] Samuelson, J. C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G. J., Dalbey, R. E., YidC mediates membrane protein insertion in bacteria, *Nature*, **406** (6796), 637–41, 2000
- [123] Samuelson, J. C., Jiang, F., Yi, L., Chen, M., de Gier, J.-W., Kuhn, A., Dalbey, R. E., Function of YidC for the Insertion of M13 Procoat Protein in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **276** (37), 34847–52, 2001
- [124] Sargent, F., The twin-arginine transport system: moving folded proteins across membranes, *Biochem. Soc. Trans.*, **35** (5), 835–47, 2007
- [125] Savelsbergh, A., Katunin, V. I., Mohr, D., Peske, F., Rodnina, M. V., Wintermeyer, W., An Elongation Factor G-Induced Ribosome Rearrangement Precedes tRNA-mRNA Translocation, *Mol. Cell*, **11** (6), 1517–23, 2003
- [126] Savelsbergh, A., Matassova, N. B., Rodnina, M. V., Wintermeyer, W., Role of Domains 4 and 5 in Elongation Factor G Functions on the Ribosome, *J. Mol. Biol.*, **300** (4), 951–61, 2000
- [127] Schaffitzel, C., Oswald, M., Berger, I., Ishikawa, T., Abrahams, J. P., Koerten, H. K., Koning, R. I., Ban, N., Structure of the *E. coli* signal recognition particle bound to a translating ribosome, *Nature*, **444** (7118), 503–6, 2006
- [128] Schuwirth, B. S., Borovinskaya, M. A., Hau, C. W., Zhang, W., Vila-Sanjurjo, A., Holton, J. M., Cate, J. H. D., Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 Å Resolution, *Science*, **310** (5749), 827–34, 2005
- [129] Scotti, P. A., Urbanus, M. L., Brunner, J., de Gier, J.-W. L., von Heijne, G., van der Does, C., Driessen, A. J. M., Oudega, B., Lührink, J., YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase, *EMBO J.*, **19** (4), 542–9, 2000
- [130] Selmer, M., Dunham, C. M., Murphy IV, F. V., Weixlbaumer, A., Petry, S., Kelley, A. C., Weir, J. R., Ramakrishnan, V., Structure of the 70S Ribosome Complexed with mRNA and tRNA, *Science*, **313** (5795), 1935–42, 2006
- [131] Serek, J., Bauer-Manz, G., Struhalla, G., van den Berg, L., Kiefer, D., Dalbey, R., Kuhn, A., *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins, *EMBO J.*, **23** (2), 294–301, 2004
- [132] Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., Agrawal, R. K., Structure of the Mammalian Mitochondrial Ribosome Reveals an

- Expanded Functional Role for Its Component Proteins, *Cell*, **115** (1), 97–108, 2003
- [133] Smits, P., Smeitink, J. A. M., van den Heuvel, L. P., Huynen, M. A., Ettema, T. J. G., Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome, *Nucleic Acids Res.*, **35** (14), 4686–703, 2007
- [134] Stark, H., Rodnina, M. V., Rinke-Appel, J., Brimacombe, R., Wintermeyer, W., van Heel, M., Visualization of elongation factor Tu on the *Escherichia coli* ribosome, *Nature*, **389** (6649), 403–6, 1997
- [135] Stiburek, L., Fornuskova, D., Wenchich, L., Pejznochova, M., Hansikova, H., Zeman, J., Knockdown of Human Oxa1 Impairs the Biogenesis of F₁F_o-ATP Synthase and NADH:Ubiquinone Oxidoreductase, *J. Mol. Biol.*, **374** (2), 506–16, 2007
- [136] Stuart, R. A., Insertion of proteins into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1592** (1), 79–87, 2002
- [137] Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., Herrmann, J. M., Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria, *EMBO J.*, **22** (24), 6448–57, 2003
- [138] Terpstra, P., Butow, R. A., The Role of Var1 in the Assembly of Yeast Mitochondrial Ribosomes, *J. Biol. Chem.*, **254** (24), 12662–9, 1979
- [139] Terpstra, P., Zanders, E., Butow, R. A., The Association of Var1 with the 38 S Mitochondrial Ribosomal Subunit in Yeast, *J. Biol. Chem.*, **254** (24), 12653–61, 1979
- [140] Teyssier, E., Hirokawa, G., Tretiakova, A., Jameson, B., Kaji, A., Kaji, H., Temperature-sensitive mutation in yeast mitochondrial ribosome recycling factor (RRF), *Nucleic Acids Res.*, **31** (14), 4218–26, 2003
- [141] Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools, *Nucleic Acids Res.*, **25** (24), 4876–82, 1997
- [142] Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J., Electrophoretic transfer of proteins from ployacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications., *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **76** (9), 4350–4, 1979

- [143] Urbanus, M. L., Fröderberg, L., Drew, D., Björk, P., de Gier, J.-W. L., Brunner, J., Oudega, B., Luirink, J., Targeting, Insertion, and Localization of *Escherichia coli* YidC, *J. Biol. Chem.*, **277** (15), 12718–23, 2002
- [144] Urbanus, M. L., Scotti, P. A., Fröderberg, L., Sääf, A., de Gier, J.-W. L., Brunner, J., Samuelson, J. C., Dalbey, R. E., Oudega, B., Luirink, J., Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC, *EMBO Rep.*, **2** (6), 524–9, 2001
- [145] Valent, Q. A., Scotti, P. A., High, S., de Gier, J.-W. L., von Heijne, G., Lentzen, G., Wintermeyer, W., Oudega, B., Luirink, J., The *Escherichia coli* SRP and SecB targeting pathways converge at the translocon, *EMBO J.*, **17** (9), 2504–12, 1998
- [146] Valle, M., Zavialov, A., Sengupta, J., Rawat, U., Ehrenberg, M., Frank, J., Locking and Unlocking of Ribosomal Motions, *Cell*, **114** (1), 123–34, 2003
- [147] Vambutas, A., Ackerman, S. H., Tzagoloff, A., Mitochondrial translational initiation and elongation factors in *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem.*, **201** (3), 643–52, 1991
- [148] Walker, J. E., Saraste, M., Runswick, M. J., Gay, N. J., Distantly related sequences in the α - and β -subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold, *EMBO J.*, **1** (8), 945–51, 1982
- [149] Watson, K., The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Cell Biol.*, **55** (3), 721–6, 1972
- [150] Wilden, B., Savelsbergh, A., Rodnina, M. V., Wintermeyer, W., Role and timing of GTP binding and hydrolysis during EF-G-dependent tRNA translocation on the ribosome, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **103** (37), 13670–5, 2006
- [151] Wilson, D. N., Schluenzen, F., Harms, J. M., Yoshida, T., Ohkubo, T., Albrecht, R., Buerger, J., Kobayashi, Y., Fucini, P., X-ray crystallography study on ribosome recycling: the mechanism of binding and action of RRF on the 50S ribosomal subunit, *EMBO J.*, **24** (2), 251–60, 2005
- [152] Xie, K., Dalbey, R. E., Inserting proteins into the bacterial cytoplasmic membrane using the Sec and YidC translocases, *Nat. Rev. Microbiol.*, **6** (3), 234–44, 2008

- [153] Yi, L., Celebi, N., Chen, M., Dalbey, R. E., Sec/SRP Requirements and Energetics of Membrane Insertion of Subunits a, b, and c of the *Escherichia coli* F₁F_o ATP Synthase, *J. Biol. Chem.*, **279** (38), 39260–7, 2004
- [154] Yi, L., Dalbey, R. E., Oxa1/Alb3/YidC system for insertion of membrane proteins in mitochondria, chloroplasts and bacteria (Review), *Mol. Membr. Biol.*, **22** (1-2), 101–11, 2005
- [155] Youngman, E. M., He, S. L., Nikstad, L. J., Green, R., Stop Codon Recognition by Release Factors Induces Structural Rearrangement of the Ribosomal Decoding Center that is Productive for Peptide Release, *Mol. Cell*, **28** (4), 533–43, 2007
- [156] Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H. D., Noller, H. F., Crystal Structure of the Ribosome at 5.5 Å Resolution, *Science*, **292** (5518), 883–96, 2001
- [157] Zambrano, A., Fontanesi, F., Solans, A., de Oliveira, R. L., Fox, T. D., Tzagoloff, A., Barrientos, A., Aberrant Translation of Cytochrome *c* Oxidase Subunit 1 mRNA Species in the Absence of Mss51p in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Biol. Cell*, **18** (2), 523–35, 2007

Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Veröffentlichungen entstanden:

Bauerschmitt, H., Funes, S., Herrmann, J. M., The Membrane-Bound GTPase Guf1 Promotes Mitochondrial Protein Synthesis Under Suboptimal Conditions, *J. Biol. Chem.*, 2008, eingereicht

Bauerschmitt, H., Funes, S., Herrmann, J. M., Synthesis and Sorting of Mitochondrial Translation Products, *Membrane Trafficking*, Hg. A. Vancura, Bd. 457 von *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Totowa, 2008, im Druck

van Bloois, E., Koningstein, G., Bauerschmitt, H., Herrmann, J. M., Luirink, J., *Saccharomyces cerevisiae* Cox18 complements the essential Sec-independent function of *Escherichia coli* YidC, *FEBS J.*, **274** (21), 5704-13, 2007

Weber, A., Paschen, S. A., Heger, K., Wilfling, F., Frankenberg, T., Bauerschmitt, H., Seiffert, B. M., Kirschnek, S., Wagner, H., Häcker, G., BimS-induced apoptosis requires mitochondrial localization but not interaction with anti-apoptotic Bcl-2 proteins, *J. Cell Biol.*, **177** (4), 625-36, 2007

Ott, M., Prestele, M., Bauerschmitt, H., Funes, S., Bonnefoy, N., Herrmann, J. M., Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria, *EMBO J.*, **25** (8), 1603-10, 2006

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während der letzten Jahre mit Rat und Tat unterstützt haben:

Insbesondere bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Dr. Walter Neupert für seine Unterstützung, seine immerwährende Diskussionsbereitschaft und die sehr lehrreiche Zeit an seinem Institut.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll danke ich vielmals für die Bereitschaft, meine Arbeit vor der Fakultät für Biologie zu vertreten.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Prof. Dr. Johannes Herrmann, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Seine Anregungen, seine Ideen und seine stete Bereitschaft zur Diskussion haben entscheidend zum Gelingen meiner Arbeit beigetragen.

Mein Dank gilt auch Prof. Dr. Roland Beckmann und Dr. Eli van der Sluis, mit denen ich im Rahmen des Oxa1-Ribosomen-Projektes zusammenarbeiten durfte. Ihre Begeisterung für das Projekt, ihr Einsatz sowie ihre immerwährende Diskussionsbereitschaft waren mir eine große Unterstützung und Hilfe.

Im Laufe der letzten Jahre ist mir viel Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft von den Mitarbeitern des Lehrstuhls entgegengebracht worden. Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle vor allem bei all den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Herrmann, insbesondere bei Sole für die sehr gute Zusammenarbeit, für ihre unendliche Geduld bei der Beantwortung meiner Fragen und ihre stete Hilfsbereitschaft. Bei Nikola, Martin O., Martin P., Karl, Melanie, Markus, Tanja, Petra, Marc, Stephan und auch Zdravko für ihre Hilfe und Unterstützung zu jeder Zeit. Insbesondere danken möchte ich auch meinem permanenten Essenspartner Martin S. für seine Freundschaft, seine Hilfsbereitschaft und sein stets offenes Ohr für all meine Fragen und Probleme. Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Sandra und Marica, die mir in den letzten Jahren eine unersetzliche Hilfe waren. Die Arbeit mit beiden hat mir sehr viel Spaß und Freude bereitet.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Stefan Paschen, der mir durch seine zahlreichen Erklärungen und Anregungen viele Dinge leichter gemacht hat. Ihm danke ich insbesondere auch für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des Apoptose-Projektes.

Mein Dank gilt außerdem den Sekretärinnen Christine Werner, Helga Döge und Karin Hauck, die mir durch Ihre großartige Arbeit und Unterstützung viele Verwaltungsgänge erspart haben.

Außerdem möchte ich Frau Reisenauer, Frau Lapschansky und Frau Köber danken, die mir die Arbeit im Labor durch ihre Unterstützung um vieles erleichtert haben. Bedanken möchte ich mich auch bei Zdenka Stanic, die mich jahrelang bei

der Anzucht von *Neurospora crassa* unterstützt hat.

Eine besondere Freude war für mich auch die Zusammenarbeit mit Peter Reiser, Gerd Friedt und Willi Bender im Rahmen meines Laborjobs der Allgemeinen Geräte-
wartung. Ihnen möchte ich besonders danken für ihre Hilfe und Unterstützung. Ebenso bedanken möchte ich bei Eva Frischbier und allen anderen Mitarbeitern des Tierstalls für die hervorragende Betreuung der Versuchstiere.

Mein Dank gilt insbesondere meinen Eltern und Großeltern, die mir diesen Lebensweg ermöglicht haben, für ihre uneingeschränkte Unterstützung und Anteilnahme zu jeder Zeit. Bedanken möchte ich mich außerdem bei meinen Geschwistern Michael und Katja mit Ellen und Bernd für ihre Aufmunterungen, ihr stetes Interesse und ihre liebevolle Anteilnahme.

Danken möchte ich auch Dir, lieber Michel, für Deine Liebe, Deine Geduld und Deine Unterstützung während dieser Zeit.

Curriculum Vitae

Heike Bauerschmitt

geboren am 09. September 1977

in Pegnitz

Beruflicher Werdegang

- seit 05/2004 Doktorarbeit am Institut für Physiologische Chemie
LMU München
Thema: *Koordination von Synthese und Membraninsertion mitochondrialer Translationsprodukte*
- 2003 - 2004 Diplomarbeit am Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie
Universität Bayreuth
Thema: *Untersuchungen zur Identifizierung eines transienten Chlorophyllspeichers während der Seneszenz*
- 1998 - 2003 Studium der Biologie (Diplom)
Universität Bayreuth
Fächerkombination: Botanik, Genetik, Biochemie
- 1988 - 1997 Gymnasium Pegnitz
Leistungskurse: Biologie, Englisch
- 1984 - 1988 Grundschule Pegnitz

Lehre

- 2005 - 2007 Betreuung des Grundpraktikums Biochemie I
Fachrichtung Medizin
LMU München
- 2001 - 2004 Betreuung verschiedener Grund- und Vertiefungspraktika
Fachrichtung Botanik
Universität Bayreuth