

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Biologie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Biogenese der mitochondrialen Innenmembran:  
Organisation der ko-translationalen Proteininsertion  
durch Oxa1 und Mba1**

Martin Ott  
aus Weilheim

2005

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 10.11.2005

Dissertation eingereicht am: 10. November 2005

1. Gutachter: Professor Dr. Jürgen Soll

2. Gutachter: Professor Dr. Dario Leister

Sondergutachter: Professor Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Dezember 2005

Meinem Vater



# Inhaltsverzeichnis

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Einleitung</b>  | <b>1</b>  |
| 1.1 Biogenese von Membranproteinen                                  | 2         |
| 1.2 Biogenese von Membranproteinen in Bakterien                     | 3         |
| 1.3 Biogenese von Membranproteinen des Endoplasmatischen Retikulums | 4         |
| 1.4 Proteinbiogenese von Mitochondrien                              | 5         |
| 1.5 Sortierung von Proteinen in die mitochondriale Innenmembran     | 7         |
| 1.6 Biogenese mitochondrial kodierter Proteine                      | 8         |
| 1.7 Insertionsmaschinerie für mitochondrial kodierte Proteine       | 10        |
| 1.8 Fragestellung und Zielsetzung                                   | 13        |
| <br>  |           |
| <b>2. Material und Methoden</b>                                     | <b>15</b> |
| 2.1 Molekularbiologische Methoden                                   | 15        |
| 2.1.1 Verwendete Plasmide   | 15        |
| 2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>                 | 16        |
| 2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)                               | 16        |
| 2.1.4 Restriktionsverdau von DNA                                    | 17        |
| 2.1.5 Ligation  | 17        |
| 2.1.6 Zwischenklonierung  | 17        |
| 2.1.7 Präparation elektrokompetenter Zellen                         | 17        |
| 2.1.8 Präparation hitzeschockkompetenter Zellen                     | 18        |
| 2.1.9 Transformation mittels Elektroporation                        | 18        |
| 2.1.10 Transformation mittels Hitzeschock                           | 18        |
| 2.1.11 Analytische und präparative Gelelektrophorese                | 19        |
| 2.1.12 Konzentrationsbestimmung                                     | 19        |
| 2.1.13 Klonierungsstrategien  | 19        |

|   |    |
|---|----|
| 2. Genetische Methoden.....   | 21 |
| 2.2.1 Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> .....  | 21 |
| 2.2.2 Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i> .....  | 21 |
| 2.2.3 Anzucht von <i>S. cerevisiae</i> .....  | 22 |
| 2.2.4 Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....   | 22 |
| 2.2.5 Überprüfen eines Rekombinationsereignisses in <i>S. cerevisiae</i> .....                  | 23 |
| 2.2.6 Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i> .....                                | 23 |
| 2.2.7 Konstruktion der Hefestämme.....  | 24 |
| 2.3 Proteinbiochemische Methoden.....   | 25 |
| 2.3.1 SDS-Gelelektrophorese.....  | 25 |
| 2.3.2 Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen.....  | 25 |
| 2.3.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot).....                    | 26 |
| 2.3.4 Autoradiographie und Densitometrie.....   | 26 |
| 2.3.5 Synthese von <sup>35</sup> S-markierten Proteinen <i>in vitro</i> .....                   | 26 |
| 2.3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen.....  | 27 |
| 2.3.7 Fällung von Proteinen durch Trichloressigsäure.....                                       | 27 |
| 2.3.8 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinkomplexen<br>durch Gelfiltration.....        | 27 |
| 2.3.9 Anreicherung einer ribosomalen Fraktion<br>aus isolierten Mitochondrien.....              | 28 |
| 2.3.10 Fraktionierung ribosomaler Untereinheiten auf<br>einem Saccharosegradienten.....         | 28 |
| 2.3.11 Fraktionieren von Membranproteinen.....  | 29 |
| 2.4 Zellbiologische Methoden.....   | 29 |
| 2.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefe.....  | 29 |
| 2.4.2 Erzeugung von Mitoplasten.....  | 30 |
| 2.4.3 Import von Proteinen in Mitochondrien.....  | 30 |
| 2.4.4 Radioaktive Markierung mitochondrialer<br>Translationprodukte <i>in organello</i> .....   | 31 |
| 2.4.5 Quervernetzung mitochondrialer Translationsprodukte<br>mit mitochondrialen Proteinen..... | 31 |

|  |           |
|--|-----------|
| 2.4.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten.....   | 32        |
| 2.4.6.1 Bestimmung der Malatdehydrogenase-Aktivität.....   | 32        |
| 2.4.6.2 Bestimmung der NADH-Cytochrom <i>c</i> -Reduktase-Aktivität.....   | 33        |
| 2.4.6.3 Bestimmung der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase-Aktivität.....  | 33        |
| 2.4.6.4 Bestimmung der Oligomycin-sensitiven ATPase-Aktivität.....   | 33        |
| <b>2.5 Immunologische Methoden.....</b>  | <b>33</b> |
| 2.5.1 Herstellung spezifischer Antisera in Kaninchen.....  | 33        |
| 2.5.2 Verwendete Antikörper.....   | 34        |
| 2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern.....   | 35        |
| 2.5.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen<br>(Western Blot).....                           | 36        |
| 2.5.5 Immunpräzipitation unter stringenten Bedingungen.....  | 36        |
| <b>2.6 Puffer und Medien.....</b>  | <b>37</b> |
| <b>2.7 Geräte.....</b>   | <b>38</b> |
| <br>   |           |
| <b>3. Ergebnisse.....</b>  | <b>39</b> |
| <b>3.1 Charakterisierung der C-terminalen Domäne von Oxa1.....</b>   | <b>39</b> |
| 3.1.1 Der C-Terminus von Oxa1 ist notwendig für das Wachstum<br>auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle.....     | 40        |
| 3.1.2 Stabilität und Topologie von C-terminal deletierten Oxa1-Proteinen.....  | 41        |
| 3.1.3 Deletionen im C-Terminus von Oxa1 führen zu<br>einer Einschränkung der Aktivität von Komplexen der Atmungskette..... | 42        |
| 3.1.4 Oxa1 ko-fraktioniert mit mitochondrialen Ribosomen.....  | 43        |
| 3.1.5 Die Interaktion von Oxa1 mit dem Ribosom<br>ist sensitiv gegenüber Salz- und RNase Verdau.....                       | 46        |
| 3.1.6 Der C-Terminus von Oxa1 bindet mitochondriale<br>Ribosomen <i>in vitro</i> .....                                     | 47        |
| 3.1.7 Die mitochondriale Translationsmaschinerie bindet die<br>Translokationskomponente Oxa1.....                          | 48        |
| <b>3.2 Bakterielle und mitochondriale Mitglieder der<br/>Oxa1/YidC-Familie sind funktionell austauschbar.....</b>          | <b>49</b> |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.2.1 Der konservierte Kernbereich von YidC<br>kann <i>in vitro</i> in Mitochondrien importiert werden.....                           | 50        |
| 3.2.2 Der konservierte Kernbereich von YidC<br>kann <i>in vivo</i> in Mitochondrien importiert werden.....                            | 52        |
| 3.2.3 Nur die Expression von mtYidC-RBD komplementiert<br>eine Oxa1-Deletion.....   | 53        |
| 3.2.4 Die Expression von mtYidC-RBD in einem $\Delta$ Oxa1-Stamm führt zu einer<br>teilweisen Wiederherstellung der Atmungskette..... | 54        |
| 3.2.5 Die Komplementation von Oxa1 durch mtYidC-RBD führt zu<br>einer teilweisen Insertion von Cox2.....                              | 55        |
| 3.2.6 Die Ribosomenbindestelle von Oxa1 führt zur Bindung von YidC<br>an mitochondriale Ribosomen.....                                | 56        |
| 3.2.7 Nur die Expression von mtYidC-RBD<br>komplementiert eine Cox18-Deletion.....  | 54        |
| <b>3.3 Charakterisierung von Mba1</b>   | <b>58</b> |
| 3.3.1 Mba1 ist spezifisch mit der großen Untereinheit des mitochondrialen<br>Ribosoms assoziiert.....                                 | 58        |
| 3.3.2 $\Delta$ mba1 und oxa1 $\Delta$ C zeigen einen synthetischen Wachstumsdefekt.....   | 59        |
| 3.3.3 Die Interaktion von Mba1 mit dem Ribosom benötigt weder Oxa1<br>noch naszierende Ketten.....                                    | 60        |
| 3.3.4 Die Interaktion von Oxa1 und Mba1 mit naszierenden Polypeptiden<br>geschieht unabhängig von der jeweils anderen Komponente..... | 62        |
| 3.3.5 Auch ohne Mba1 und Oxa1 bleiben mitochondriale Ribosomen<br>Membran- assoziiert.....  | 63        |
| 3.3.6 Mitochondrien ohne Mba1 und den C-Terminus von Oxa1<br>zeigen einen starken Insertionsdefekt.....                               | 65        |
| <b>4. Diskussion</b>  | <b>67</b> |
| 4.1 Charakterisierung der C-terminalen Domäne von Oxa1.....   | 67        |
| 4.1.1 Der C-Terminus von Oxa1 ist notwendig für die<br>Biogenese der Atmungskette.....  | 67        |



|   |           |
|---|-----------|
| 4.1.2 Der C-Terminus vermittelt die Bindung von Oxa1<br>an mitochondriale Ribosomen.....                    | 68        |
| 4.2 Bakterielle und mitochondriale Mitglieder der Oxa1/YidC-Familie sind<br>funktionell austauschbar.....   | 69        |
| 4.2.1 Funktionelle Austausch von Oxa1 und Cox18 durch YidC.....   | 70        |
| 4.2.2 Modell einer Evolution der mitochondrialen<br>Oxa1- und Cox18-Proteine aus dem bakteriellen YidC..... | 71        |
| 4.3 Charakterisierung von Mba1.....   | 72        |
| 4.3.1 Mba1 interagiert mit mitochondrialen Ribosomen.....   | 73        |
| 4.3.2 Mitochondriale Ribosomen sind unabhängig von<br>Oxa1 und Mba1 mit der Innenmembran assoziiert.....    | 74        |
| 4.4 Organisation einer ko-translationalen Proteininsertion<br>in die mitochondriale Innenmembran.....       | 74        |
| <b>5. Zusammenfassung</b>   | <b>77</b> |
| <b>6. Literaturverzeichnis</b>  | <b>79</b> |
| <b>Veröffentlichungen</b>   | <b>85</b> |
| <b>Danksagung</b>   | <b>87</b> |
| <b>Lebenslauf</b>   | <b>89</b> |

## Abkürzungsverzeichnis

|                  |   |
|------------------|---|
| A <sub>xyz</sub> | Absorption bei xyz nm                                   |
| Abb.             | Abbildung   |
| Amp              | Ampicillin  |
| APS              | Ammoniumperoxodisulfat                                  |
| ATP              | Adenosintriphosphat                                     |
| BSA              | Rinderserumalbumin                                      |
| Cox2             | Untereinheit 2 der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase          |
| Da               | Dalton  |
| DHFR             | Dihydrofolatreduktase                                   |
| DMSO             | Dimethylsulfoxid  |
| DNA              | Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> ) |
| DTT              | Dithiothreitol  |
| <i>E. coli</i>   | <i>Escherichia coli</i>                                 |
| EDTA             | Ethylendiamintetraacetat                                |
| ER               | Endoplasmatisches Retikulum                             |
| FG               | Feuchtgewicht   |
| g                | Erdbeschleunigung                                       |
| h                | Stunde  |
| HEPES            | N-2-hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure        |
| Hsp              | Hitzeschockprotein                                      |
| kb               | Kilobasen   |
| LB               | Medium nach Luria und Bertani                           |
| min              | Minute  |
| MOPS             | n-Morpholinoethansulfonsäure                            |
| MPP              | mitochondriale Prozessierungspeptidase                  |
| mRNA             | Boten-RNA   |
| mt               | mitochondrial   |
| MSSs             | mitochondriale Sortierungssignale                       |

|                      |   |
|----------------------|---|
| NAD                  | Nicotinsäureamid-adenindinukleotid  |
| <i>N. crassa</i>     | <i>Neurospora crassa</i>  |
| Ni-NTA               | Nickel-Nitrilotriessigsäure   |
| OD <sub>XYZ</sub>    | Optische Dichte bei XYZ nm  |
| PAGE                 | Polyacrylamid-Gelelektrophorese   |
| PCR                  | Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )                |
| PEG                  | Polyethylenglykol   |
| PK                   | Proteinase K  |
| PMSF                 | Phenylmethylsulfonylfluorid   |
| RNA                  | Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )                                  |
| RNasin               | Ribonukleaseinhibitor   |
| rpm                  | Umdrehungen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )                           |
| RT                   | Raumtemperatur  |
| <sup>35</sup> S      | Schwefelisotop  |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i>   |
| SD                   | Minimalmedium für <i>S. cerevisiae</i>  |
| SDS                  | Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )                        |
| SDS-PAGE             | diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese                        |
| SRP                  | Signalerkennungspartikel ( <i>signal recognition particle</i> )               |
| Su9                  | Untereinheit 9 der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase von <i>N. crassa</i> |
| t                    | Zeit  |
| TBS                  | mit Tris gepufferte Saline  |
| TCA                  | Trichloressigsäure  |
| TEMED                | N,N,N',N'-Tetramethyldiamin   |
| Tris                 | Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan   |
| ts                   | temperatursensitiv  |
| U                    | Einheiten   |
| wt                   | Wildtyp   |
| Δψ                   | Membranpotential  |

## 1. Einleitung

Membranen sind Voraussetzungen für das Leben, wie wir es kennen. Um einen ungerichteten Stoffaustausch zwischen unterschiedlichen Reaktionsräumen zu verhindern, bedienen sich alle Lebensformen der biologischen Membranen, welche aus einer Phospholipiddoppelschicht und spezifischen Membranproteinen aufgebaut sind. In eukaryotischen Zellen bilden zusätzlich interne Membranen Kompartimente aus, die so genannten Organellen. Beispiele sind der Zellkern, das Endoplasmatische Retikulum, der Golgi-Apparat, die Peroxisomen, die Lysosomen, die Mitochondrien und die Chloroplasten. Unterschiedliche chemische Milieus in den verschiedenen Kompartimenten sind die Voraussetzung dafür, dass unterschiedliche biochemische Reaktionen zeitgleich in einer Zelle ablaufen können. Dies wird durch eine organellenspezifische Ausstattung an Proteinen erreicht. Der Großteil dieser Proteine ist in der nukleären DNA kodiert und wird im Zytosol translatiert. Anschließend müssen die Proteine zu ihren Wirkorten meist durch die Membranen der Organellen transportiert werden.

Die Mitochondrien der Eukaryoten sind sowohl für Energiegewinnung aus der oxidativen Phosphorylierung als auch für den Aminosäuremetabolismus, für den zellulären Eisenstoffwechsel (Lill und Kispal, 2000) und für Teile des Lipidstoffwechsels verantwortlich. Des Weiteren übernehmen Mitochondrien eine zentrale Rolle im Kalziumhaushalt der Zelle (Pozzan und Rizzuto, 2000) sowie beim kontrollierten Zelltod, der Apoptose (Danial und Korsmeyer, 2004; Orrenius et al., 2003).

Mitochondrien besitzen zwei Membranen: Die stark gefaltete Innenmembran umschließt die Matrix, die Außenmembran trennt den Intermembranraum vom Zytosol ab. In der Zelle bilden Mitochondrien ein verzweigtes Netzwerk aus, welches kontinuierlichen Fusions- und Teilungsvorgängen unterliegt (Shaw und Nunnari, 2002). Die Teilung der Mitochondrien ist zwingend notwendig für die Vererbung der Mitochondrien an die Tochterzellen, da Zellen Mitochondrien nicht *de novo* schaffen können.

Phylogenetisch entwickelten sich die Mitochondrien aus frei lebenden  $\alpha$ -Proteobakterien. Im Laufe der Evolution haben die wahrscheinlich zunächst endosymbiontisch lebenden Bakterien ihr

Genom fast vollständig in den Nukleus transferiert, wobei der Gentransfer primär wohl durch die besseren Regulations- und Reperaturmöglichkeiten in den Kern getrieben wurde. Nur wenige, zumeist sehr hydrophobe, Proteine sind auf dem Genom von Mitochondrien heutiger Organismen kodiert. Beim Menschen sind dies dreizehn Proteine, bei der Bäckerhefe gar nur acht (Borst und Grivell, 1978). Mitochondrien sind daher aus einem Mosaik aus kernkodierten und mitochondrial kodierten Proteinen aufgebaut.

### **1.1 Biogenese von Membranproteinen**

Die Biogenese von integralen Membranproteinen ist ein komplizierter Prozess. Einige Schlüsselmerkmale dieser Proteine erzwingen einen meist ähnlichen Weg der Insertion hydrophober Segmente und der Translokation hydrophiler Domänen über die jeweilige Membran. Integrale Membranproteine besitzen zum einen meist sehr hydrophobe Transmembransegmente und diese tendieren in wässrigem Milieu dazu, unspezifisch zu aggregieren. Zum anderen ist der Transport geladener, hydrophiler Domänen über Membranen ein Energie-aufwändiger Prozess, der nicht spontan stattfindet.

Um Membranproteine korrekt in die Lipiddoppelschicht zu integrieren, bedienen sich alle Lebensformen der Translokationsmaschinen (Gier, 2005; Neupert, 1997; Rapoport, 1992; Soll und Schleiff, 2004). Diese stellen hochmolekulare Proteinkomplexe dar, die den Transport von Proteinen über oder in die Lipiddoppelschicht der Biomembranen erlauben. Die benötigte Energie wird entweder aus der Hydrolyse von Nukleosidtriphosphaten oder durch ein elektrochemisches Membranpotential bezogen. Während des Translokationsprozesses liegen die meisten Proteine entfaltet vor. Dies wird erreicht, indem die Translokation entweder ko-translational abläuft oder indem zytosolische Hilfsproteine, Chaperone, die Polypeptidketten binden und so deren Faltung oder Aggregation verhindern. Viele der integralen Membranproteine müssen, nachdem sie ihre native Topologie und Faltung in der Membran eingenommen haben, mit anderen Untereinheiten zu großen oligomeren Proteinkomplexen assemblieren, um die jeweiligen biochemischen Reaktionen katalysieren zu können.

## 1.2 Biogenese von Membranproteinen in Bakterien

Bakterien synthetisieren alle Proteine im Zytosol. Um zwischen hydrophoben und hydrophilen Proteinen zu unterscheiden, bedient sich die Zelle eines raffinierten Systems. Vier unterschiedliche Wege der Biogenese von Innenmembranproteinen sind beschrieben (Gier, 2005).

Den einfachsten Fall stellen manche N-terminal verankerte Proteine dar. Diese besitzen typischerweise N-terminale Signalsequenzen und werden während der Synthese von SecB, einem molekularen Chaperon, gebunden. Der Chaperon-Präproteinkomplex wird dann von SecA erkannt und zur membranständigen Translokationsmaschinerie, der SecYEG-Translokase, transportiert (Hartl et al., 1990). Der SecYEG-Komplex bildet die Translokationspore, welche von den beiden essentiellen Proteinen SecY und SecE, sowie den Untereinheiten SecD, SecG, SecF und yajC gebildet wird. Auf Höhe der SecYEG-Translokationspore werden die monotopen Membranproteine über einen *Stoptransfer*-Mechanismus in die Membran eingebaut. Dabei dient SecA als molekularer Motor, welcher unter ATP-Verbrauch das Präprotein durch den SecYEG-Komplex transportiert (Economou und Wickner, 1994). Die translozierte Signalsequenz wird von der im Periplasma lokalisierten *Leader*-Peptidase proteolytisch entfernt.

Polytope Membranproteine und monotope Membranproteine mit hoher Hydrophobizität verwenden den SRP-Weg (*Signal recognition particle*). Das Signalerkennungspartikel in *E. coli* besteht aus einer Proteinkomponente, Ffh, und einer 4,5S RNA-Komponente. Sobald ein Segment einer Transmembranhelix den *ribosomal exit tunnel* (ribosomaler Ausgangstunnel) erreicht hat, kann es von SRP gebunden werden (Houben et al., 2005). Bei ausreichend hoher Hydrophobizität bindet das SRP fest an das Segment. Der Komplex aus Ribosom, naszierender Kette und SRP wird dann in einem GTP-abhängigen (Bacher et al., 1996) Schritt an den membranständigen SRP Rezeptor FtsY überführt, der hilft, das Ribosom samt naszierender Kette an die SecYEG Translokase anzudocken und das SRP abzulösen. Die wieder einsetzende Translation schiebt die naszierende Kette in den Translokationskanal. Hydrophobe Segmente interagieren sowohl mit dem SecYEG-Komplex als auch mit YidC (Houben et al., 2005). Die Rolle von YidC in der Insertion von Membranproteinen ist noch nicht restlos geklärt. In den letzten Jahren wurden mehrere Funktionsweisen vorgeschlagen. Eine davon ist, dass YidC hilft, hydrophobe Segmente aus dem Translokationskanal zu übernehmen und in die Lipiddoppelschicht der Membran zu überführen (Beck et al., 2001). Eine zweite Möglichkeit ist, dass YidC als membranständiges Chaperon arbeitet. YidC kann mehrere hydrophobe Segmente

gleichzeitig binden und ist für die korrekte Faltung des polytopen Membranproteins LacY, der Lactosepermease von *E. coli*, entscheidend (Nagamori et al., 2004).

Als dritter Biogeneseweg von Membranproteinen ist der Sec-unabhängige Insertionsweg beschrieben. Genutzt wird dieser erstens von kleinen, mono- und bitopen hydrophoben Proteinen, die häufig Untereinheiten großer homooligomerer Komplexe sind, und zweitens von manchen polytopen Membranproteinen. Ein besonders gut untersuchtes Substrat ist die Untereinheit C der  $F_1F_0$ -ATPase ( $F_{0c}$ ) von *E. coli* (van der Laan et al., 2004). Das SRP hilft, die naszierende Kette an die Membran zu dirigieren (van Bloois et al., 2004). YidC ist notwendig für die Insertion von  $F_{0c}$ , denn wenn YidC *in vivo* depletiert wird, häuft sich  $F_{0c}$  in einer proteasegeschützten Lokalisierung an. Es wird also nicht effizient transloziert. Ein direkterer Hinweis, dass YidC eine aktive Rolle in der Insertion von  $F_{0c}$  einnimmt, kommt aus *in vitro*-Studien. Hier zeigt sich, dass YidC die Insertion von  $F_{0c}$  in rekonstituierte Proteoliposomen katalysieren kann (van der Laan et al., 2004). Darüber hinaus ermöglicht YidC die Oligomerisation von  $F_{0c}$  zu grossen Komplexen. Im Falle von  $F_{0c}$  kann YidC demnach sowohl die Insertion als auch die Assemblierung vermitteln. Andere Substrate dieses YidC-spezifischen Insertionsweges sind die Phagenhüllproteine M13 procoat und Pf3 coat (Samuelson et al., 2001; Serek et al., 2004).

Letztlich ist in *E. coli* noch der TAT-Translokationsweg bekannt (Robinson und Bolhuis, 2004). Proteine, die über den TAT-Translokationsweg transportiert werden, tragen in ihrer Signalsequenz ein charakteristisches *twin-arginine-motive* aus zwei aufeinander folgenden Argininresten. Diese Proteine binden üblicherweise Redox-Cofaktoren und müssen im gefalteten Zustand über die Membran transportiert werden. Der molekulare Mechanismus, mit dem TAT-Substrate transportiert werden, ist kaum verstanden.

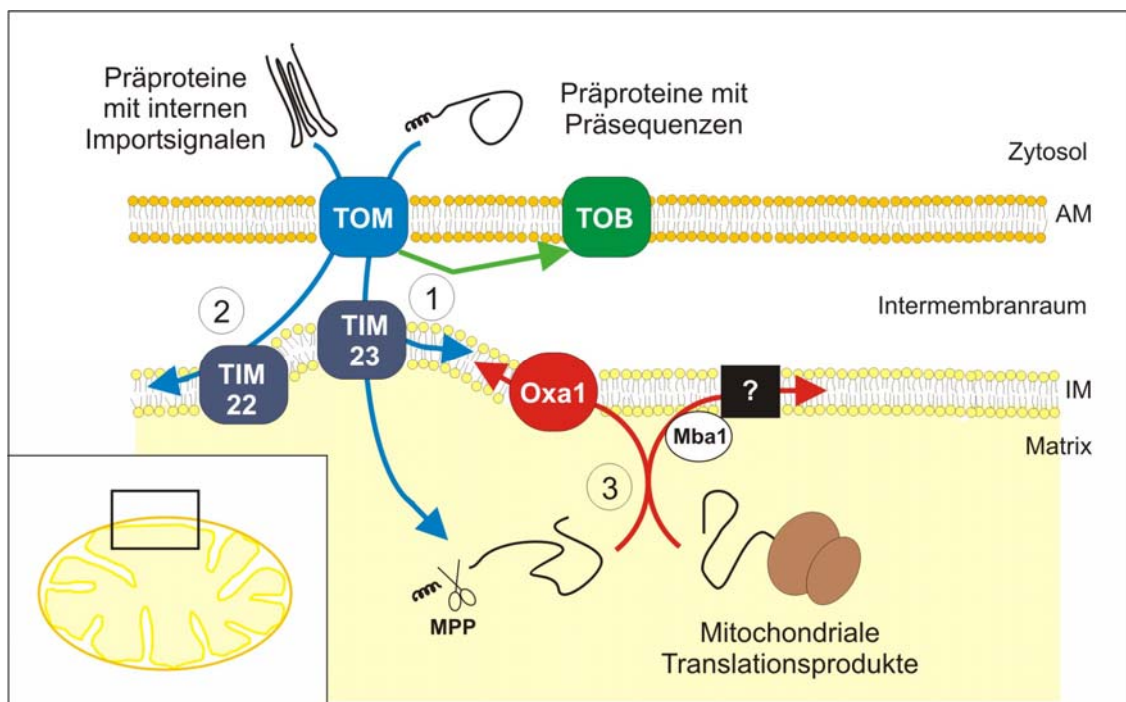
### **1.3 Biogenese von Membranproteinen des Endoplasmatischen Retikulums**

Das raue Endoplasmatische Retikulum (ER) ist in Eukaryoten das Organellsystem, welches für die Biogenese eines Großteils der zellulären Membranproteine verantwortlich ist. So entstehen im Endoplasmatischen Retikulum die Membranproteine der Plasmamembran, des Zellkerns, des Golgi-Apperates und der Lysosomen. Der Biogeneseweg integraler Membranproteine ähnelt in vielen Facetten dem bakterieller Proteine. Membranproteine werden während ihrer Synthese an zytosolischen Ribosomen von einem Signalerkennungspartikel erkannt. Dieses bindet hydrophobe Segmente naszierender Ketten, dockt an das aktive Ribosom an und stoppt die Translation (Luirink und Dobberstein, 1994). Der Komplex aus naszierender Kette, Ribosom und

Signalerkennungspartikel wird an das ER geleitet, wo das Signalerkennungspartikel abfällt und das Ribosom mit dem Translokon interagiert. Das Translokon des ER setzt sich aus Sec61, Sbh1 und Sss1 zusammen, wobei Sec61 homolog zum bakteriellen SecY ist. Die Kopplung des Ribosoms an das Translokon erlaubt die ko-translationale Insertion von Membranproteinen oder die Sekretion löslicher Proteine in das Lumen des ER (Johnson und van Waes, 1999).

#### 1.4 Proteinbiogenese von Mitochondrien

Die Biogenese von Mitochondrien erfordert die kontrollierte Synthese, den Transport und die Assemblierung von Proteinen, von Lipiden und Nukleinsäuren. Der Großteil mitochondrialer Proteine ist im Kern kodiert, wird im Zytosol translatiert und in die unterschiedlichen mitochondrialen Subkompartimente transportiert. Bis zum heutigen Tag sind fünf Proteinkomplexe bekannt, die an der Translokation von Polypeptidketten über oder der Integration in die Mitochondrienmembranen beteiligt sind (Mokranjac und Neupert, 2005; Wiedemann et al., 2004).



**Abbildung 1.1 Mitochondrialer Proteintransport** Zur Erläuterung siehe Text

In der Außenmembran befindet sich der Proteinkomplex, der für den Transport über und in



die Außenmembran zuständig ist, die *translocase of the outer membrane* (TOM). Ebenfalls in der Außenmembran befindet sich der TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*), welcher die Sortierung und Insertion von  $\beta$ -Faltblatt-Proteinen der Außenmembran vermittelt. In der Innenmembran befinden sich drei Komplexe, die TIM23- und TIM22-Komplexe (*translocase of the inner membrane*), sowie der OXA1-Komplex (*oxidase assembly*). Der TIM23-Komplex übernimmt die Translokation aller präsequenzhaltigen Proteine über die Innenmembran. TIM23 inseriert auch monotope Membranproteine in die innere Membran. Der TIM22-Komplex inseriert eine Klasse von polytopen Membranproteinen in die innere mitochondriale Membran, die interne Zielsequenzen enthalten. OXA1 ist beteiligt an der Insertion von Membranproteinen in die Innenmembran von der Matrixseite aus.

Der TOM-Komplex in der Außenmembran von Mitochondrien ist ein multimerer Komplex von etwa 450 kDa. Er setzt sich aus sieben unterschiedlichen Membranproteinen zusammen, der porenbildenden Komponente Tom40, den Rezeptoren Tom 20, Tom 22 und Tom 70, und den kleinen assoziierten Untereinheiten, Tom5, Tom6 und Tom7. Der TOM-Komplex vermittelt die Translokation aller kernkodierte mitochondrialen Proteine über die äußere Membran (Pfanner et al., 2004). Außenmembranproteine mit einer nichtabspaltbaren N-terminalen Zielsequenz, welcher direkt eine Transmembrandomäne (*signal-anchor*) folgt, werden ebenso über den TOM-Komplex inseriert wie die Klasse der C-terminal (*tail-anchor*) verankerten Proteine. Wahrscheinlich inseriert die Transmembrandomäne in beiden Fällen lateral in die Außenmembran. Membranproteine, die eine  $\beta$ -barrel-Struktur ausbilden, werden durch den TOM-Komplex in den Intermembranraum transportiert, wo sie wahrscheinlich von dem Tim8/13-Komplex übernommen und durch den TOB-Komplex in die Außenmembran inseriert werden (Paschen et al., 2003; Wiedemann et al., 2003).

Mitochondriale Matrixproteine besitzen typischerweise eine N-terminale Signalsequenz, die in den meisten Fällen in der Matrix von der *mitochondrial processing peptidase* (MPP) prozessiert wird. Diese Zielsequenzen sind meist zwischen 20 bis 60 Aminosäurereste lang und enthalten mehrere positive Ladungen sowie hydroxylierte Aminosäurereste. Signalsequenzen sind in der Lage, amphipathische  $\alpha$ -Helices mit einer positiv geladenen und einer hydrophoben Seite auszubilden (von Heijne, 1986). Mitochondriale Proteine mit einer solchen Zielsequenz werden von den Rezeptorproteinen Tom20 und Tom22 erkannt und als entfaltete Polypeptidketten durch den Translokationskanal des TOM-Komplexes transportiert. Sobald die Signalsequenz den Intermembranraum erreicht hat, kontaktiert die zu transportierende Polypeptidkette die N-

terminale Intermembranraumdomäne von Tim23 (Bauer et al., 1996) und die C-terminale Domäne von Tim50 (Geissler et al., 2002; Mokranjac et al., 2003; Yamamoto et al., 2002). Die Polypeptidkette wird in einem membranpotentialabhängigen Prozess durch die vom TIM23-Komplex gebildete Pore transportiert. Die Translokationspore des TIM23-Komplexes besteht aus Tim17, Tim23 und Tim50. Auf der Innenseite der Innenmembran ist der mitochondriale Importmotor über Tim44 mit dem TIM23-Komplex assoziiert. Der Importmotor besteht aus Tim44, Ssc1 (mitochondriales Hsp70), Tim14 und Tim16 sowie Mge1, dem Nukleotidaustauschfaktor für Ssc1. Tim44 rekrutiert Ssc1 an die Translokase, welches die aus der Translokase kommende Polypeptidkette bindet und so ein Zurückgleiten der Polypeptidkette verhindert. Die Brownsche Molekularbewegung der Polypeptidkette und die erneute Bindung von Ssc1-Molekülen erscheint ausreichend, um das Protein in die Matrix zu transportieren (*Brownian ratchet-* oder *Trapping-*Modell) (Okamoto et al., 2002). Ein aktiver Transport des Präproteins durch eine Konformationsänderung in Ssc1 (*Power stroke-*Modell) scheint dagegen wenig wahrscheinlich.

### **1.5 Sortierung von Proteinen in die mitochondriale Innenmembran**

Mitochondriale Proteine, die im Zytosol synthetisiert werden und deren Bestimmungsort die Innenmembran ist, werden auf drei unterschiedlichen Wegen dorthin sortiert.

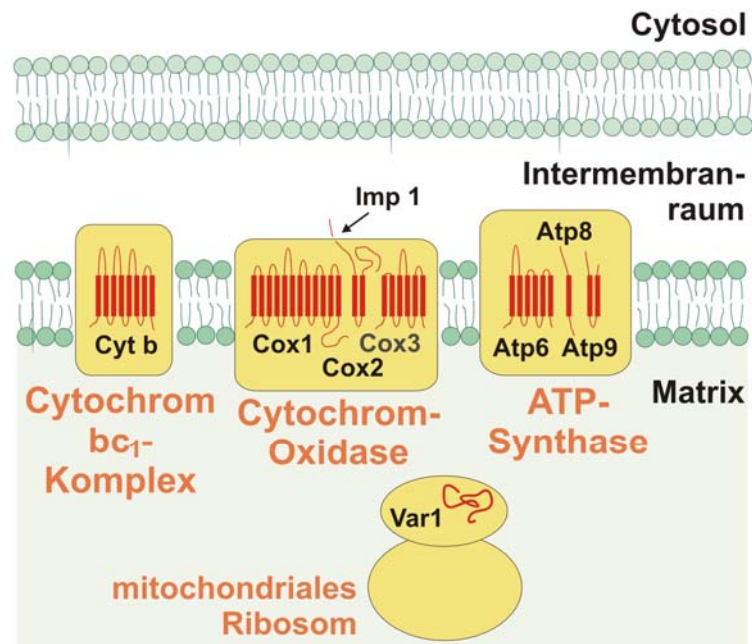
Proteine mit einer einzigen Transmembrandomäne, die eine N<sub>innen</sub>-C<sub>außen</sub>-Topologie in der Innenmembran einnehmen und eine N-terminale Zielsequenz enthalten, werden über den TIM23-Komplex inseriert (Abb.1.1 #1). Hierbei scheinen die Proteine während des Transports in der Translokationspore arretiert zu werden und dann lateral in die Doppellipidschicht der Innenmembran zu inserieren (Glick et al., 1992). Kennzeichnend für Transmembranhelices, die diesen Weg wählen, ist die Abwesenheit von Prolinresten (Meier et al., 2005). Beispiele für lateral sortierte Proteine sind die Untereinheit 5a der Cytochrom-Oxidase (Cox5a), die D-Laktat-Dehydrogenase (DLD) und das Sco1-Protein.

Die mitochondrialen Transporterproteine der *Carrier*-Proteinfamilie werden durch den TOM-Komplex mit Hilfe des TIM9/10/12-Komplexes zum TIM22-Komplex transportiert (Abb.1.1 #2). Der TIM22-Komplex besteht aus Tim22, Tim18 und Tim54 und vermittelt die Insertion dieser Gruppe polytopter Membranproteine in die Innenmembran (Sirrenberg et al., 1996). Die Insertion in die Membran erfolgt in einem membranpotentialabhängigen Schritt.

Die dritte Gruppe von Innenmembranproteinen wird zuerst vollständig in die Matrix importiert. Dort wird die Zielsequenz proteolytisch entfernt und die Polypeptidkette anschließend von der Matrix in die innere Membran exportiert (Hartl et al., 1986). Dieser Exportprozess (Abb.1.1 #3) hat große Ähnlichkeit mit der Proteininsertion in die Innenmembran von Prokaryoten. Die Insertion ist membranpotential-abhängig und die Proteintopologie folgt wie in Bakterien der *Positiv-Inside-Rule* (von Heijne, 1989). Daher wurde dieser Weg ‚konservative Sortierung‘ genannt. Ein Beispiel für diesen Mechanismus ist die Untereinheit 9 der  $F_1F_0$ -ATPase (Su9) aus *Neurospora crassa*. Su9 besitzt zwei Transmembrandomänen und nimmt in der Innenmembran eine Naußen-Caußen-Topologie ein. Während in *Saccharomyces cerevisiae* das Protein im mitochondrialen Genom kodiert ist, ist es in *N. crassa* im Zellkern kodiert und mit einer N-terminalen mitochondrialen Zielsequenz ausgestattet. Nach Synthese im Zytosol wird das Su9-Vorläuferprotein komplett in die Matrix importiert und von MPP prozessiert. Anschließend wird der N-Terminus des reifen Su9-Protein in den Intermembranraum exportiert und die erste Transmembrandomäne inseriert in die Innenmembran (Rojo et al., 1995). Dieser Exportprozess ist abhängig vom Membranpotential, insbesondere vom pH-Gradienten über die Innenmembran. Der N-Terminus muss, um exportiert zu werden, eine negative Nettoladung tragen, was eine elektrophoretische Transportweise nahe legt.

### **1.6 Biogenese mitochondrial kodierter Proteine**

Zusätzlich zu den konservativ sortierten Proteinen müssen auch die in der mitochondrialen DNA kodierten Proteine von der Matrix aus in die mitochondriale Innenmembran eingebaut werden. Mitochondrien besitzen ein komplettes genetisches System. Die kleine (73-82kB) zirkuläre DNA in *S. cerevisiae* kodiert für 8 Haupttranslationsprodukte, für die 21S und 15S RNA, für eine Reihe an tRNA, für den RNA Teil der RNaseP und einige nicht oder wenig translatierte Leserahmen (Borst und Grivell, 1978). Sieben der acht Haupttranslationsprodukte sind Untereinheiten der Atmungskette (Abb. 1.2).



**Abbildung 1.2 Mitochondrial kodierte Proteine in *S. cerevisiae*** Zur Erläuterung siehe Text

Es handelt sich um die Untereinheiten 1, 2 und 3 des Cytochrome *c*-Oxidasekomplexes (Cox1, Cox2, Cox3), um das Apocytochrom *b* (Cyt *b*) des Cytochrome *c*-Reduktase Komplexes und um die Untereinheiten 6, 8 und 9 der  $F_1F_0$ -ATPase (Atp6, Atp8, Atp9). Var1, das achte Protein, ist Bestandteil der kleinen Untereinheit mitochondrialer Ribosomen. Alle mitochondrial kodierte Proteine sind somit Bestandteil oligomerer Komplexe. Das bedingt, dass die Biosynthesewege inner- und außerhalb der Mitochondrien koordiniert sein müssen, um ähnliche Mengen der Untereinheiten eines Komplexes zu produzieren.

Im Kern regulieren zwei Transkriptionsfaktoren, Nrf1 und Nrf2, die Expression der kernkodierten Untereinheiten und der Faktoren, welche den mitochondrialen DNA-Haushalt kontrollieren (Goffart und Wiesner, 2003). In den Mitochondrien wird die Expression über die Translation reguliert. Eine Reihe von Translationsaktivatorproteinen binden spezifische mRNA und regulieren direkt die Initiation der Translation (Fox, 1996). Viele dieser Proteine sind auf der Innenmembran lokalisiert und es wurde vorgeschlagen, dass die räumliche Nähe zueinander passender RNA Moleküle wichtig ist, um die zugehörigen Proteine in direkter Nachbarschaft zu translatieren, zu inserieren und schlussendlich zu assemblieren (Naithani et al., 2003). Eine Möglichkeit, wie solche Translationsaktivatoren die Synthese mitochondrialer Proteine

regulieren, wurde kürzlich für die Biogenese von Cox1 gezeigt (Barrientos et al., 2004; Perez-Martinez et al., 2003).

Mss51, der Translationsaktivator für Cox1, bindet die Cox1 mRNA und aktiviert die Translation. Das neu synthetisierte Cox1 bindet hierauf den Translationsaktivator und den Assemblierungsfaktor Cox14. Das führt dazu, dass in diesem Komplex gebundenes Mss51 nicht mehr die Translation von Cox1 aktivieren kann. Neues Cox1 wird erst dann wieder synthetisiert, wenn Cox1, eventuell mit Hilfe von Cox14, in den Cytochrom *c*-Oxidase Komplex assembliert und somit Mss51 freisetzt. Dieser Mechanismus erlaubt, dass immer nur soviel Cox1 synthetisiert wird, wie dann auch produktiv assembliert werden kann.

Die Insertion mitochondrial kodierter Proteine in die Innenmembran geschieht kotranslational. Hinweise darauf kommen von verschiedenen unabhängigen Beobachtungen. Mittels Elektronenmikroskopie wurden mitochondriale Ribosomen in engem Kontakt mit der Innenmembran gezeigt (Watson, 1972). Auch biochemische Experimente zeigen, dass Polypeptide direkt in die Membran inseriert werden (Poyton et al., 1992).

Der Translokationsprozess, bei dem häufig geladene Domänen über die Innenmembran transportiert werden müssen, benötigt als Energiequelle ein Membranpotential. Dies zeigt sich besonders deutlich bei der Biogenese von Cox2 (Herrmann et al., 1995). Dieses Protein wird in der *S. cerevisiae* mit einer 15 Aminosäuren langen N-terminalen Präsequenz synthetisiert, besitzt zwei Transmembranhelices und eine Topologie, bei der beide Termini im Intermembranraum lokalisiert sind. Sobald die N-terminale Domäne in den Intermembranraum transloziert wurde, wird die Präsequenz durch die Imp-Protease abgeschnitten. Wenn das Membranpotential durch Ionophor- oder Entkopplerzugabe zerstört wird, werden die Termini nicht mehr transloziert und Cox2 akkumuliert in der Vorläuferform.

### **1.7 Insertionsmaschinerie für mitochondrial kodierte Proteine**

In Mitochondrien gibt es weder Homologe zu der bakteriellen Sec-Maschinerie noch zu dem bakteriellen Signalerkennungspartikel (SRP) (Glick und von Heijne, 1996). Von den Komponenten eines Insertionsapparates sind bis jetzt 2 Proteine identifiziert worden: Oxa1 und Mba1 (Bonney et al., 1994; Hell et al., 1997; Rep und Grivell, 1996). Es ist aber auch klar, dass viele Proteine noch nicht entdeckt sind, welche die Insertion von Proteinen auf dem konservativen Sortierungsweg bewerkstelligen.

Oxa1 wurde ursprünglich in genetischen Screens gefunden, die der Identifizierung von Proteinen dienten, die zur Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase benötigt werden (*Oxidase assembly mutant 1*). Nachfolgende Untersuchungen in Oxa1-Mutanten zeigten, dass zusätzlich zur Cytochrom *c*-Oxidase auch zwei andere Komplexe der Atmungskette betroffen sind, der *bc1*-Komplex und die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase. Oxa1 spielt demnach eine wichtige Rolle bei der Assemblierung der Atmungskettenkomplexe (Herrmann und Neupert, 2003).

Oxa1 gehört zur Familie der Oxa1/Alb3/YidC-Proteine, deren Vertreter in Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien an der Insertion und Assemblierung von Membranproteinen beteiligt sind (Kuhn et al., 2003). Alle Mitglieder dieser Familie besitzen einen konservierten Kernbereich mit fünf Transmembranhelices. In Mitochondrien gibt es neben Oxa1 noch ein anderes Mitglied dieser Proteinfamilie, Cox18/Oxa2. Cox18/Oxa2 ist entweder für den Export des C-Terminus von Cox2 (Saracco und Fox, 2002) oder für einen späteren Schritt während der Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase verantwortlich (Funes et al., 2004b).

Die Biogenese von Oxa1 stellt ein gut verstandenes Beispiel für ein konservativ sortiertes Protein dar (Herrmann et al., 1997): Nach der Synthese an zytosolischen Ribosomen führt die N-terminal Präsequenz das Protein zum TOM-Komplex, der es an den TIM23-Komplex weitergibt. Dieser transportiert das Protein in die Matrix, wo die Präsequenz proteolytisch entfernt und das Protein in Form eines Chaperonkomplexes gebunden wird. Darauf folgend wird der N-Terminus mit der ersten Transmembranhelix in den Intermembranraum exportiert und die vier folgenden Transmembranhelices inserieren in Paaren in die Innenmembran, sodass das Protein ein N<sub>außen</sub>-C<sub>innen</sub>-Topologie erreicht. Oxa1 liegt als circa 250 kDa Komplex (Monomer MW 36 kDa) in der Innenmembran vor und bildet höchstwahrscheinlich ein Homotetramer.

Die molekulare Funktion von Oxa1 ist noch nicht restlos verstanden. Die Deletion von Oxa1 verhindert das Wachstum der Hefezellen auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Frühe Arbeiten haben gezeigt, dass Oxa1 eine wichtige Rolle in der Biogenese von Cox2 spielt. Die Abwesenheit von Oxa1 führt zu stark reduzierten Mengen an Atmungskettenkomplexen, wobei die Cytochrom *c*-Oxidase am stärksten betroffen ist. In Abwesenheit von Oxa1 wird Cox2 in äußerst geringem Umfang prozessiert, was zeigt, dass der geladene N-Terminus von Cox2 nicht in den Intermembranraum transloziert werden konnte (Hell et al., 1997). Das stark erniedrigte Membranpotential in ΔOxa1-Mitochondrien könnte allein schon ausreichend sein, um diesen Effekt zu erklären. Ein direkter Hinweis, dass der Translokationsdefekt auch durch die Abwesenheit von funktionellem Oxa1 bewirkt werden kann, kommt von einer Studie mit einem

temperatursensitiven Allel von Oxa1. Wird in isolierten Mitochondrien dieses Stammes Oxa1 durch Inkubation bei der restriktiven Temperatur inaktiviert, häuft sich erneut Cox2-Vorläufer an, ohne dass das Membranpotential erniedrigt ist (Hell et al., 2001). Darüber hinaus interagiert Oxa1 direkt mit neusynthetisierten mitochondrialen Proteinen. Ähnlich wie das bakterielle Homolog YidC kontaktiert Oxa1 naszierende Ketten früh während deren Synthese. Diese Interaktion ist unabhängig vom Membranpotential, der treibenden Kraft für Translokationsprozesse über die mitochondriale Innenmembran. Der durch Abwesenheit eines funktionellen Oxa1-Proteins hervorgerufene Translokationsdefekt und die direkte Interaktion mit mitochondrial kodierten Proteinen während ihrer Biogenese legen den Schluss nahe, dass Oxa1 eine Schlüsselkomponente eines Translokationsmechanismus ist.

Das Mba1-Protein wurde ebenfalls in einem genetischen Screen entdeckt. Hier wurde nach Hefemutanten gesucht, die Mutationen in den mitochondrialen m-AAA-Proteasen (Afg3/Yta10 und Rca1/Yta12) unterdrücken (Rep et al., 1996). Neben der Protease Pim1 und Mba1 (Multi-copy Bypass of AFG3 mutant 1) wurde auch Oxa1 gefunden. Dies deutet auf eine ähnliche, möglicherweise überlappende, Funktion von Oxa1 und Mba1 hin.

Mba1 ist ein in der Matrix lokalisiertes peripheres Innenmembranprotein. Es wird im Zytosol mit einer Präsequenz synthetisiert und in die mitochondriale Matrix transportiert, wo die Präsequenz proteolytisch entfernt wird. Mba1 ist Teil eines 150 kDa großen Komplexes (Monomer 26kDa), dessen Zusammensetzung noch nicht bekannt ist (Preuss et al., 2001). Es könnte sich bei den anderen Untereinheiten dieses Komplexes um Proteine handeln, welche eine wichtige Rolle in der Insertion spielen.

Die genaue Funktion von Mba1 ist noch nicht verstanden. Da es in einem genetischen Screen zusammen mit Oxa1 gefunden wurde, ist es wahrscheinlich, dass beide eine ähnliche Funktion haben. Ähnlich wie Oxa1 interagiert auch Mba1 mit mitochondrial- und kernkodierten Proteinen während deren Insertion. Die Deletion von Mba1 führt nur zu einem schwachen Wachstumsdefekt auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle. Interessanterweise führen Doppeldeletionen von *OXA1* und *MBA1* zu einem schweren Wachstumsphänotyp, bei dem die Hefezellen selbst auf der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose kaum wachsen (Preuss et al., 2001). Das könnte bedeuten, dass beide Proteine eine überlappende Funktion haben, die für die Lebensfähigkeit der Zelle von großer Bedeutung ist.

### **1.8 Fragestellung und Zielsetzung**

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, wie die Translation mitochondrial kodierter Proteine an die Insertion und Translokation der Translationsprodukte gekoppelt ist. Da Mitochondrien Signalerkennungspartikel fehlen, muss die Insertion mitochondrial kodierter Proteine auf anderem Wege reguliert und organisiert werden. Um dies zu untersuchen, wurden die bisher bekannten Komponenten der mitochondrialen Insertionsmaschinerie untersucht.

Oxa1 besteht aus mehreren distinkten Domänen, deren Funktionen bis heute kaum verstanden sind. Von den in der Matrix lokalisierten und damit für einen möglichen Regulationsmechanismus in Frage kommenden Domänen ist besonders eine große, positiv geladene, C-terminale Domäne interessant. Sie ist nur in den mitochondrialen Oxa1-Mitgliedern der Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie zu finden und scheint deswegen eine Anpassung an die speziellen Bedürfnisse in diesem Organell zu sein.

Des Weiteren sollte die Funktion von Mba1 weiter charakterisiert werden. Mba1 ist ein peripheres Membranprotein in der Matrix ist und kein integrales Membranprotein. Daher ist eine Rolle als Proteintranslokase unwahrscheinlich. Der Kontakt von Mba1 sowohl mit der Membran als auch mit kern- und mitochondrial-kodierten Vorläuferproteinen könnte auf eine regulatorische oder strukturell-organisierende Funktion von Mba1 hinweisen. Darüber hinaus scheint Mba1 mit Oxa1 funktionell zu überlappen. Auf welche Weise Mba1 die Funktion des Oxa1-Komplexes unterstützt ist unklar und sollte im Rahmen dieser Doktorarbeit näher untersucht werden.





## 2. Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Verwendete Plasmide

Für die *in vitro*-Transkription und -Translation von Proteinen wurde das entsprechende DNA-Fragment in den Vektor pGEM3, pGEM4 oder pGEM-T (Promega) kloniert. Sofern nicht anders erwähnt wurden Gene aus *S. cerevisiae* verwendet. Die Klonierungsstrategien für die in dieser Arbeit hergestellten Plasmide sind unter 2.1.13 beschrieben. In Tabelle 2.1 sind alle in der Arbeit verwendeten Plasmide und ihre Kurzbeschreibung aufgeführt.

**Tabelle 2.1 Verwendete Plasmide**

| Plasmid        | Kodiertes Protein  | Vektor   | Referenz                |
|----------------|--|----------|-------------------------|
| pOxa1          | Oxa1   | pGem3    | (Herrmann et al., 1997) |
| pSu9(1-69)DHFR | <i>N.c.</i> Su9(1-69) fusioniert an <i>M.m.</i> Dihydrofolatreductase                    | pGem4    | (Rojo et al., 1995)     |
| pSu(1-112)DHFR | <i>N.c.</i> Su9(1-112) fusioniert an <i>M.m.</i> Dihydrofolatreductase                   | pGem4    | (Rojo et al., 1995)     |
| pMrpl4         | Mrpl4  | pGem4    | Diese Arbeit            |
| pPpe1          | Ppe1   | pGem4    | Diese Arbeit            |
| pmtYidC-RBD    | Oxa1 <sup>1-119</sup> - <i>E.c.</i> YidC <sup>346-540</sup> -<br>Oxa1 <sup>311-401</sup> | pGemT    | Diese Arbeit            |
| pMBP-Mrp20     | Mrp20  | pMalcRI  | Diese Arbeit            |
| pMBP-Mba1      | Mba1   | pMalcRI  | Diese Arbeit            |
| pGST-Oxa1C     | Oxa1 <sup>311-401</sup>  | pETGexCt | Gregor Szyrach          |
| pYXOY          | Oxa1 <sup>1-119</sup> - <i>E.c.</i> YidC <sup>346-540</sup>                              | pYX142   | Diese Arbeit            |
| pYXOYO         | Oxa1 <sup>1-119</sup> - <i>E.c.</i> YidC <sup>346-540</sup> -<br>Oxa1 <sup>311-401</sup> | pYX142   | Diese Arbeit            |

### 2.1.2 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Kleine Mengen DNA wurden durch enzymatische und alkalische Lyse von *E. coli*-Zellen gewonnen. Dazu wurden Einzelkolonien in 2 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium angeimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Zellen aus 1 ml Kultur wurden für 1 min bei 7500 g (RT) sedimentiert und in 50 µl ddH<sub>2</sub>O durch Schütteln resuspendiert. Nach Zugabe von 300 µl Lösung 1 (0,1 N NaOH, 0,5% SDS, 1 mM EDTA) wurde für 5 min bei RT lysiert. Die Probe wurde anschließend mit 150 µl Lösung 2 (3 M Natriumacetat pH 4,5) neutralisiert und für 1 min geschüttelt. Die präzipitierten Proteine und die chromosomale DNA wurden bei 35000 g, 10min (4°C) sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen, mit 0,9 ml Ethanol versetzt, die Plasmid-DNA für 15 min bei -80°C gefällt und anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) zentrifugiert. Nach Waschen mit 70% Ethanol und anschließendem Trocknen wurde die Plasmid-DNA in 50 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde das Kit Jetstar (Midi-Säulen) verwendet. 50 ml einer Übernachtskultur in LB<sub>Amp</sub> wurde nach Anleitung des Herstellers aufgearbeitet und die Plasmid-DNA isoliert.

### 2.1.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Gene oder Genabschnitte von *S. cerevisiae* und *E. coli* wurden als DNA-Fragmente mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert. Die als Primer in der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzten Oligodesoxynukleotide enthielten an ihrem 3'-Ende eine mindestens 18 Basen lange, zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz. Für eine Standard-Reaktion wurden in einem Gesamtvolumen von 50 µl 1-100 ng Matrizen-DNA sowie 20 pmol von jedem Primer eingesetzt. Der Ansatz enthielt weiterhin 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM aller 4 Desoxynucleosidtriphosphate, 2,5 U Taq-DNA-Polymerase, 0,25 U Pfu-DNA-Polymerase und den vom Hersteller mitgelieferten Puffer. In einigen Fällen wurden die Enzyme erst hinzugefügt nachdem die Reaktion 1 min bei 95°C inkubiert wurde. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde mit 25 Temperaturzyklen durchgeführt. Die Zyklen bestanden aus dem Schmelzen der DNA bei 95°C für 30 s, Anlagerung der Oligodesoxynukleotide typischerweise bei 48-64°C für 90 s und Synthese der DNA bei 72°C für bis zu 3min. Nach den Reaktionszyklen wurde mit einer 5-minütigen Nachinkubation bei 72°C die DNA-Synthese vervollständigt. Die Amplifikation der DNA Fragmente wurde durch Gelelektrophorese kontrolliert.

#### **2.1.4 Restriktionsverdau von DNA**

Für die Präparation von DNA-Fragmenten und für die Identifizierung positiver Transformanden bei der Neukonstruktion von Plasmiden, wurde die Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen gespalten. Dabei wurde das Puffersystem von New England Biolabs verwendet.

Der Restriktionsansatz im präparativen Maßstab wurde in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Je 20 U der entsprechenden Restriktionsenzyme wurde zu dem vom Hersteller empfohlenen 10×Puffer mit 5 bis 15 µg DNA und sterilem Wasser gegeben. Die Inkubationszeit betrug zwischen 2 und 15 h bei der empfohlenen Temperatur. Die Spaltung im analytischen Maßstab erfolgte mit je 10 U der entsprechenden Restriktionsenzyme und 1 µl DNA-Lösung in 20 µl Gesamtvolumen. Die Inkubationszeit betrug 1 h bei der empfohlenen Temperatur. Im Anschluss an die Restriktion wurden die Ansätze der präparativen bzw. analytischen Gelelektrophorese unterzogen.

#### **2.1.5 Ligation**

Für die Neukonstruktion von Plasmiden wurden die durch Spaltung mit Restriktionsenzymen erhaltenen DNA-Fragmente mit Hilfe der T4-DNA-Ligase kovalent miteinander verknüpft. Die Reaktion wurde in dem vom Hersteller gelieferten Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl durchgeführt. Dazu wurden 50-200 ng DNA des linearisierten Vektors mit etwa dem fünffachen Überschuss an DNA-Fragment gemischt und bei einer Temperatur von 16°C über Nacht inkubiert.

#### **2.1.6 Zwischenklonierung**

Um die vollständige Restriktion eines DNA-Fragmentes zu gewährleisten, wurde das durch PCR amplifizierte Fragment in den Vektor pGEM-T zwischenkloniert. Die Ligation des Fragmentes in den Vektor erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Das Ligationsprodukt wurde in *E. coli* DH5α-Zellen transformiert. Aus den positiven Klonen wurde Plasmid-DNA präpariert wurde das DNA-Fragment mittels Restriktionsverdau herausgeschnitten.

#### **2.1.7 Präparation elektrokompetenter Zellen**

Um elektrokompetente *E. coli*-Zellen zu gewinnen, wurden 400 ml LB-Medium mit 4 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 0,5 wurde die Kultur für 30 min auf Eis gestellt und dann für 15 min bei 4500 g (4°C)

zentrifugiert. Danach wurden die Zellen hintereinander mit 400 ml, 200 ml und 4 ml kaltem 10%igem Glycerin (mit Milipore-Wasser angesetzt) gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde die Probe in 400  $\mu$ l 10%iger Glycerinlösung resuspendiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren (45  $\mu$ l Aliquots) und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.1.8 Präparation hitzeschockkompetenter Zellen

Um hitzeschockkompetente *E. coli*-Zellen zu gewinnen, wurden 100 ml LB Medium mit 5 ml einer Übernachtskultur angeimpft und bei  $37^{\circ}\text{C}$  unter Schütteln inkubiert. Bei Erreichen einer  $\text{OD}_{578}$  von 0,6 wurde die Kultur bei 600 g ( $4^{\circ}\text{C}$ ) für 10 min sedimentiert. Die Zellen wurden in 40 ml eisgekühltem Tfb 1 (30 mM Kaliumacetat, 50 mM  $\text{MnCl}_2$ , 100 mM  $\text{RbCl}_2$ , 10 mM  $\text{CaCl}_2$ , 12% (w/v) Glycerin) vorsichtig resuspendiert und für 2 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut zentrifugiert (600 g,  $4^{\circ}\text{C}$ , 10 min), das Sediment in 4 ml Tfb 2 (10 mM MOPS, 75 mM  $\text{CaCl}_2$ , 10 mM  $\text{RbCl}_2$ , 12% (w/v) Glycerin) resuspendiert und eine weitere Stunde auf Eis inkubiert. 200  $\mu$ l Aliquots der kompetenten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.1.9 Transformation mittels Elektroporation

Zur Transformation von *E. coli*-Zellen durch Elektroporation wurde 1  $\mu$ l Plasmidlösung (Ligationsansatz oder Plasmidpräparation) mit 45  $\mu$ l kompetenter Zellen gemischt. Von diesem Ansatz wurden 40  $\mu$ l in eine auf Eis gekühlte Elektroporationsküvette überführt, die dann einem Stromstoß (2,5 kV,  $400\Omega$ , 25  $\mu\text{F}$ ) ausgesetzt wurde. Die Zellsuspension wurde sofort mit 1 ml SOC-Medium gemischt und in ein steriles 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden für 30 min unter Schütteln bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert, bevor sie dann auf einer LB-Platte ausgestrichen wurden.

### 2.1.10 Transformation mittels Hitzeschock

Nach Auftauen eines 200  $\mu$ l Aliquots wurden 90  $\mu$ l kompetente *E. coli*-Zellen mit 9-15  $\mu$ l Ligationsansatz oder 1-2  $\mu$ l Plasmid-DNA versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Transformationsansatz wurde für 2 min auf  $42^{\circ}\text{C}$  erhitzt, auf Eis abgekühlt und mit 1 ml LB-Medium versetzt. Die Zellsuspension wurde in ein Kulturröhrchen überführt, für 1 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  und 160 rpm inkubiert und auf eine  $\text{LB}_{\text{Amp}}$ -Kulturplatte ausgestrichen. Die Kulturplatten wurden bei  $37^{\circ}\text{C}$  über Nacht inkubiert.

### 2.1.11 Analytische und präparative Gelelektrophorese

Zur Auftrennung doppelsträngiger DNA-Fragmente in Abhängigkeit ihrer Größe wurde die Agarose-Gelelektrophorese eingesetzt. Dieses Verfahren wurde sowohl im analytischen Maßstab zur Restriktionsanalyse von Plasmiden, als auch im präparativen Maßstab zur Isolierung von DNA-Fragmenten durchgeführt.

Das Bettvolumen der verwendeten Gele betrug 30-100 ml und das Taschenvolumen 20-120 µl. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurde eine 0,8-3%ige Agaroselösung in TAE-Puffer (20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, 40 mM Tris/Acetate pH 7,5) zum Gießen der Gele verwendet. Die Agarose wurde vor dem Gießen auf eine Ethidiumbromidkonzentration von ca. 0,5 µg/ml eingestellt. Die Proben wurden mit 5×Auftragspuffer (30% Glycerin, 0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol) versetzt und aufgetragen. Falls die Proben störende Mengen an RNA enthielten, wurde ein 5×Auftragspuffer mit ca. 2 mU/ml Rnase A verwendet. Die Elektrophorese wurde in TAE-Puffer bei etwa 10 V/cm durchgeführt. Die Analyse erfolgte unter UV-Licht.

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten und die DNA mit dem Kit QIAquick nach Anleitung des Herstellers extrahiert.

### 2.1.12 Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA-Proben wurde durch Messung der Extinktion gegen Wasser bei 260 und 280 nm ( $E_{260}$  und  $E_{280}$ ) bestimmt. Eine Extinktionsänderung von 1 bei 260 nm entspricht einer Konzentration von 50 µg/µl doppelsträngiger bzw. 33 µg/µl einzelsträngiger DNA. Der Quotient aus  $E_{260}$  und  $E_{280}$  ist ein Maß für die Reinheit der Probe und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 2.1.13 Klonierungsstrategien

**Klonierung von pMrpl4** Der gesamte *open reading frame* (ORF) von *MRPL4* wurde mittels PCR aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden MO44 und MO45 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*H1 und *Hind*III in den Vektor pGem4 kloniert.

**MO 44 mrpl3 up** 5'-G GGG GGA TCC ATG GGC ATA GTT TTG AAA AGA GC-3'

**MO 45 mrpl3 rev** 5'-G GGG AAG CTT CTA AAC AAC AAC AGT GCC AGG ATC-3'

**Klonierung von pPpe1** Der gesamte ORF von *PPE1* wurde mittels PCR aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden MO46 und MO47 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*H1 und *Hind*III in den Vektor pGem4 kloniert.

**MO 46 ppe1 up** 5'-GGG GGA TCC ATG TCT GAC GAT TTG AGA AGA AAA-3'

**MO 45 ppe1 rev** 5'-G GGG AAG CTT TTA TGT ATT TTG CAC GGT TTT GTG-3'

**Klonierung von pMBP-Mrp20** Der gesamte ORF von *MRP20* wurde mittels PCR aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden MO38 und MO39 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*H1 und *Hind*III in den Vektor pMalcRI kloniert.

**MO 38 mrp20 up** 5'-G GGG GGA TCC ATG CCA CGA TTG ACG GTT GGA ACG-3'

**MO 39 mrp20 rev** 5'-G GGG AAG CTT CTA ATG TAG ATC TTC TAT GTA CC-3'

**Klonierung von pMBP-Mba1** Der gesamte ORF von *MBA1* wurde mittels PCR aus genomischer DNA mit den Oligonukleotiden MO51 und MO52 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Bam*H1 und *Hind*III in den Vektor pMalcRI kloniert.

**MO51 MBA1 up** 5'-GGG GGATCC ATGAGTGTATTAAGATCTACATGC-3'

**MO52 MBA1 rev** 5'-GGG AAGCTT CGCATTTATATACATATTGCCTTA-3'

**Klonierung von pYXOY** Die Sequenz von OXA1<sup>1-119</sup>-*E.c.*YIDC<sup>346-540</sup> wurde mittels PCR von dem Plasmid pmtYidC-RBD mit den Oligonukleotiden MO34 und MO35 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die in das Oligonukleotidpaar eingeführten Restriktionsschnittstellen *Eco*RI und *Sal*I in den Vektor pYX142 kloniert.

**MO34 Primer up** 5'-CCC GAA TTC ATG TTC AAA CTC ACC TCT-3'

**MO35 Primer rev** 5'-CCC GTC GAC TCA TCT AGA GGA TTT TTT CTT CTC GCG GC-3'

**Klonierung von pYXOYO und pmtYidC-RBD** Die Sequenz von OXA1<sup>1-119</sup>-*E.c.*YIDC<sup>346-540</sup>-OXA1<sup>311-401</sup> wurde mittels PCR von dem Plasmid pMP9 mit den Oligonukleotiden MO34 und MP40 amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde in pGemT zwischenkloniert und ergab so pmtYidC-RBD. Das Plasmid pYXOY wurde durch die in das Oligonukleotid MO35 eingeführte und die im Vektor vorhandene Restriktionsschnittstellen *Xba*1 und *Sac*1 aufgeschnitten, wobei das Stopcodon an 3'wegfiel. An diese Stelle wurde aus dem Plasmid pmtYidC-RBD die für OXA1<sup>311-401</sup> kodierende Sequenz über die Restriktionsschnittstellen *Xba*1 und *Sac*1ausgeschnitten und das Fragment in den geschnittenen pYXOY legiert.

**MP40 Primer rev** 5'-CCC GAG CTC TCA TTT TTT GTT ATT AAT GAA-3'

## 2.2 Genetische Methoden

### 2.2.1 Verwendete Stämme von *E. coli*

Für alle Klonierungen wurde der *E. coli*-Stamm DH5 $\alpha$  verwendet. Dieser Stamm enthält einen  $\Phi$ dlac2 $\Delta$ M15-Marker, der für Vektoren auf Basis von pUC eine Blau/Weiß-Selektion ermöglicht. Für die rekombinante Proteinexpression in *E. coli* wurde der *E. coli*-Stamm BL21(DE3) verwendet. Dieser Stamm besitzt eine chromosomale Kopie des IPTG-induzierbaren T7-RNA-Polymerase-Gens unter Kontrolle des lacUV5 -Promotors und ist deshalb zur Expression von Genen unter Kontrolle des T7-Promotors geeignet. Diesen Zellen fehlen außerdem die Proteasen Lon und OmpT, um die überexprimierten Proteine zu stabilisieren.

### 2.2.2 Verwendete Stämme von *S. cerevisiae*

In Tabelle 2.2 sind alle in der Arbeit verwendeten Stämme von *S. cerevisiae* mit Referenz und Genotypen aufgelistet. Unter 2.2.7 finden sich die genetischen Strategien für die Herstellung der Stämme.



Tabelle 2.2

| Stamm                       | Genotyp   | Referenz                    |
|-----------------------------|---|-----------------------------|
| W303                        | <i>a ade2-1/ade2-1 his3-1,15/his3-1,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1</i>            | (Rothstein RJ, 1983)        |
| YPH499                      | <i>a ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1 - Δ63his3-Δ200 leu2-Δ1</i>                                | (Sikorski und Hieter, 1989) |
| ΔOxa1                       | <i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 OXA1::HIS3</i>   | (Hell et al., 1998)         |
| ΔMba1                       | <i>a ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 MBA1::HIS3</i>   | (Preuss et al., 2001)       |
| Oxa1 <sup>1-331</sup>       | <i>α ade2-1/ade2-1 his3-1,15/his3-1,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1</i>            | Natalie Bonnefoy            |
| Oxa1 <sup>1-317</sup>       | <i>a ade2-1/ade2-1 his3-1,15/his3-1,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1</i>            | Gregor Szyrach              |
| Oxa1 <sup>1-331</sup> ΔMba1 | <i>α ade2-1/ade2-1 his3-1,15/his3-1,15 leu2-3,112/leu2-3,112 trp1-1/trp1-1 ura3-1/ura3-1 MBA1::URA3</i> | Diese Arbeit                |
| Mba1his <sub>7</sub>        | <i>a ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1-Δ63his3-Δ200 leu2-Δ1</i>                                  | Diese Arbeit                |
| Mrp20his <sub>7</sub>       | <i>a ura3-52 lys2-801amber ade2-101ochre trp1-Δ63his3-Δ200 leu2-Δ11</i>                                 | Diese Arbeit                |

### 2.2.3 Anzucht von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von Hefen erfolgte unter Schütteln bei 30°C in YP-Medium (supplementiert mit 2% einer Kohlenstoffquelle [Glukose, Galaktose, Glycerin]), auf Selektiv-Medium oder auf Laktat-Medium. Hefen aus einer Glycerin-Stammkultur wurden auf einer YPD-Platte bzw. einer Selektiv-Platte ausgestrichen und bei 30°C inkubiert.

Nach 2-3 Tagen wurden von dieser Platte 20 ml Medium angeimpft und über Nacht inkubiert. Die Kultur wurde durch Passagieren mindestens für 2 Tage in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten, bevor die Hauptkultur angeimpft wurde. Die Zellen wurden nach Erreichen einer OD<sub>578</sub> von 1,2 bis 1,8 geerntet.

Um Glycerin-Stammkulturen herzustellen, wurden mit einer Impföse Hefezellen von einer Agarplatte in 1 ml 15%-iges Glycerin überführt und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae*

Der entsprechende Hefestamm wurde über Nacht in YPD kultiviert und die Kultur am nächsten Morgen auf eine OD<sub>578</sub> von ungefähr 0,1 verdünnt (20 ml Kulturvolumen). Die Zellen wurden bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 inkubiert und in einem sterilen 50 ml-Falkonröhrchen bei 1000 g

sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit sterilem Wasser gewaschen und anschließend in 1 ml 100 mM Lithiumacetat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 13000 rpm in einer Eppendorf-Tischzentrifuge für 30 s sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen. Danach wurden die Zellen in 400 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert und die Zellsuspension zu je 50 µl aliquotiert. DNA (2 mg/ml) aus Lachsspermien wurde 5 min auf 95 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis gelagert. Ein 50 µl-Aliquot kompetenter Zellen wurde für einen Transformationsansatz verwendet. Folgende Lösungen wurden in dieser Reihenfolge auf das Zellaliquot gegeben: 240 µl PEG 3350 (50%), 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl einzelsträngige Lachsspermien-DNA (2 mg/ml), 50 ml steriles Wasser, in dem 0,1-10 µg der zu transformierenden DNA gelöst war. Der Ansatz wurde 1 min kräftig gemischt und unter leichtem Schütteln 45 min bei 42°C inkubiert. Dann wurden die Hefezellen 15 s bei 6000 bis 8000 rpm abzentrifugiert und in ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Selektion erfolgreich transformierter Zellen erfolgte über Auxotrophiemarker auf den entsprechenden SD-Platten.

### **2.2.5 Überprüfen eines Rekombinationsereignisses in *S. cerevisiae***

Die auf einer Selektivplatte wachsende Einzelkolonie wurde mit einer Pipttenspitze berührt und die anhaftenden Zellen in 2 µl Späroplastierlösung (5 mg/ml Zymolyase, 0,6 M Sorbitol, 100 mM Kaliumphosphat pH 7,4) resuspendiert. Nach einer Inkubation für 30 min bei 30°C wurden 50 µl einer vorbereiteten PCR Mischung auf die Suspension gegeben und die PCR mit einem fünfminütigen Denaturierungsschritt bei 95°C begonnen.

### **2.2.6 Test des Wachstumsphänotyps von *S. cerevisiae***

Die zu testenden Hefestämme wurden in 20 ml des entsprechenden Mediums über Nacht angezogen und am Morgen auf eine OD<sub>578</sub> von 0,1 verdünnt. Die Kulturen wurden weiter bei 30°C inkubiert. Nachdem die Zellen ausreichend dicht gewachsen waren, wurde jeder Stamm auf eine OD<sub>578</sub> von 0,5 bzw. 0,1 eingestellt und ausgehend von dieser Stammkultur eine serielle Verdünnungsreihe (5 mal 1:10) in ddH<sub>2</sub>O hergestellt. Pro Verdünnung wurden jeweils 3 µl auf eine YPD- und YPG-Platte aufgetragen und die Platten bei der zu untersuchenden Temperatur inkubiert.

### 2.2.7 Konstruktion der Hefestämme

**Oxa1<sup>1-331</sup>ΔMba1** Der gesamte ORF von *MBA1* wurde mittels homologer Rekombination durch das Ura3-Gen ersetzt. Dazu wurde das *URA3* Gen aus dem Vektor pRS426 mit den Oligonukleotiden MO69 und MO70 amplifiziert. Beide Oligonukleotide hatten einen 45-Basen-Überhang, der sequenzidentisch war mit der Region 3'-(MO70) bzw. 5'-(MO69) unter- bzw. oberhalb des ORF. Die gereinigten PCR-Produkte wurden in Oxa1<sup>1-317</sup> und Oxa1<sup>1-331</sup> transformiert und die Hefen auf Wachstum auf SD-Ura selektioniert. Die Verifizierung der MBA1-Disruption wurde mit Western Blot durchgeführt.

**MO69MBA1 deletion Ura3 up** GGCAAATTC CATCAGAAAG CAAGCCTATC  
CATTGAGCTA AGCTTATGAG GATTC GGT AAT CTC CGA AC

**MO70MBA1 deletion Ura3 rev** GGC TAT TTA CAG ATG TTC CAA AAC TTT TCG CAT  
TTA TAT ACA TAT TGC CTAG TTT TGC TGG CCG CAT C

**Mba1his<sub>7</sub>** Das Stop-Kodon von *MBA1* wurde mittels homologer Rekombination durch sieben Histidin-Kodons gefolgt von einem Stop-Kodon ersetzt. Als Selektionsmarker diente das *HIS3*-Gen von *Schizosaccharomyces pombe*. Dazu wurde das *HIS3* Gen aus dem Vektor pYM10 (Knop et al., 1999) mit den Oligonukleotiden MO49 und MO50 amplifiziert. Beide Oligonukleotide hatten einen 45-Basen-Überhang, der sequenzidentisch war mit der Region 3'-(MO50) bzw. 5'-(MO49) unter- bzw. oberhalb des ORF. Die Verifizierung der homologen Rekombination wurde mit Western Blot und Test-PCR durchgeführt.

**MO49 MBA1 his tag up for pym10** CACAGAATGAAAGTTAACGGTGATATATATCG  
TTTACCTCCAAGCCACCATCACCATCACCATCACTAG

**MO50 MBA1 his tag rev for pym10** GAATGGGAGAGTTAATGCACTATTGAAAGGGA  
GATGCTTCAATAACATCGATGAATTCGAGCTCG

**Mrp20his<sub>7</sub>** Das Stop-Kodon von *MRP20* wurde mittels homologer Rekombination durch sieben Histidin-Kodons gefolgt von einem Stop-Kodon ersetzt. Als Selektionsmarker diente das *HIS3*-Gen von *Schizosaccharomyces pombe*. Dazu wurde das *HIS3* Gen aus dem Vektor pYM10 (Knop et al., 1999) mit den Oligonukleotiden MO41 und MO42 amplifiziert. Beide Oligonukleotide

hatten einen 45-Basen-Überhang, der sequenzidentisch war mit der Region 3'-(MO42) bzw. 5'-(MO41) unter-bzw. oberhalb des ORF. Die Verifizierung der homologen Rekombination wurde mit Western Blot und Test-PCR durchgeführt.

**MO41 Pym10 his up primer mrp20** GCGCGCAGATAAACTAATTGCCCTGAACAG  
GTACATAGAAGATCTACATCACCATCACCATCACCATCACTAG

**MO 42 Pym rev primer mrp20** CTGTTTAGAGATTATGTAGTTTGCTCCGTATATAC  
AAGTGTGAGGGGATCGATGAATTCGAGCTCG

## 2.3 Proteinbiochemische Methoden

### 2.3.1 SDS-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE (Laemmli, 1970) aufgetrennt. Hierfür wurden Glasplatten von 160×180 mm und Abstandhalter von 1 mm Dicke verwendet. Zum Gießen wurde das Gel mit einem separaten Bodengel abgedichtet. Die Konzentration von Acrylamid im Trenngel variierte zwischen 12 und 18% und die Konzentration an Bisacrylamid zwischen 0,08% - 0,13%. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA für 2-3 h. Anschließend wurden die Proteine entweder im Gel angefärbt oder auf Nitrozellulose transferiert.

Trennlösung: 12-18% Acrylamid; 0,08-0,13% Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,1% APS; 0,03% TEMED)

Sammellösung: 5% Acrylamid; 0,03% Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,05% APS; 0,1 % TEMED)

Laufpuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,3; 0,38 M Glycin; 0,1 % SDS

SDS-Auftragspuffer (Laemmli-Puffer): 60 mM Tris/HCl, 2% SDS, 5% β-Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, pH 6.8

### 2.3.2 Färben und Trocknen von Polyacrylamid-Gelen

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden mit Coomassie-Blau angefärbt. Dazu wurde das Trenngel mindestens 60 min in Färbelösung (30% Methanol, 10% Eisessig, 0,1% Coomassie-

Blau-R) geschwenkt, anschließend mit Wasser gespült und in 30% Methanol, 10% Eisessig entfärbt. Das Gel wurde zwischen zwei befeuchtete Zellophanfolien gespannt und bei RT getrocknet.

### 2.3.3 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Westernblot)

Elektrophoretisch aufgetrennte Proteine wurden nach der Nass-Methode auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Dazu wurde das Gel auf eine Nitrozellulose-Membran gelegt, die zwischen je einem Whatman-Papieren in eine Blotkammer geklemmt wurden. Gel, Nitrozellulosemembran und Whatman-Papiere wurden dabei mit Blotpuffer durchtränkt. Der Transfer der Proteine erfolgte für 1,5 h zwischen bei 400 mA. Die Proteine wurden durch Schwenken der Nitrozellulose-Membran in Ponceau-Lösung und anschließendem Entfärben mit Wasser sichtbar gemacht.

Blotpuffer: 20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% Methanol

Ponceau-Lösung: 0,2% Ponceau in 3% Trichloressigsäure (TCA)

### 2.3.4 Autoradiographie und Densitometrie

Nitrozellulose-Membranen, auf die radioaktiv markierte Proteine transferiert worden waren, wurden nach Trocknen unter einer Rotlicht-Wärmelampe auf einem Röntgenfilm exponiert. Die auf dem Röntgenfilm sichtbaren Banden wurden mit Hilfe eines Durchlichtscanners (Amersham Biosciences) eingelesen und ihre Intensität gemessen. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm Lab-Scan von Amersham Biosciences.

### 2.3.5 Synthese von <sup>35</sup>S-markierten Proteinen *in vitro*

Um <sup>35</sup>S-markierte Proteine zu synthetisieren, wurden in pGEM3, pGEM4 oder pGEM-T klonierte Gene mit Hilfe der SP6- oder T7-RNA-Polymerase transkribiert und anschließend in Kaninchen-Retikulozytenlysate in Gegenwart von <sup>35</sup>S-Methionin translatiert (Pelham und Jackson, 1976). Zur Transkription wurden 30 µl Premix, 2,5 µl 2,5 mM m<sup>7</sup>G(5')ppp(5')G und 15 µl Plasmid-DNA gemischt, auf 200 µl mit sterilem Wasser aufgefüllt, 1 µl RNasin (40 U/µl) und 1 µl RNA-Polymerase (T7 oder SP6, je 25 U/µl) zugegeben. Der Reaktionsansatz wurde eine Stunde bei 37°C inkubiert. Die RNA wurde anschließend durch Zusatz von 5 µl 10 M Lithiumchlorid und 150 µl Ethanol für 15 min bei -20°C gefällt und anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) abzentrifugiert. Das Sediment wurde mit 70%igem Ethanol gewaschen und nach Abnehmen des

Überstandes bei RT getrocknet. Die mRNA wurde dann in 30 µl Wasser mit 0,75 U/µl RNasin aufgenommen.

Um *in vitro* Vorstufenproteine zu translatieren, wurden 140 µl Kaninchen- Retikulozytenlysat, 4 µl RNasin, 8 µl Aminosäure-Mix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 16 µl <sup>35</sup>S -Methionin und 30 µl RNA gemischt. Das Reaktionsgemisch wurde für 60 min bei 30°C inkubiert. Nach der Translation wurde das Lysat für 30 min bei 100000 g (2°C) zentrifugiert. Der Überstand wurde aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

10×Translationssalze: 400 mM Hepes/KOH; pH 7,4; 60 mM Mg-Acetat; 20 mM Spermidin

Premix: 1 ml 10×Translationssalze; 20 µl 50 mg/ml BSA; 200 µl 0,5 M DTT; 50 µl 100 mM ATP; 50 µl 100 mM CTP; 50 µl 100 mM GTP; 50 µl 100 mM UTP; H<sub>2</sub>O ad 10 ml

### **2.3.6 Bestimmung von Proteinkonzentrationen**

Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte nach der Methode von Bradford mit dem Bio-Rad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers. Für die Bestimmung wurde eine Eichgerade mit IgG erstellt. Dafür wurden die Extinktionen bei 595nm bei IgG-Konzentrationen von 1,25; 2,5; 5; 10; 20 und 40 µg/ml gemessen.

### **2.3.7 Fällung von Proteinen durch Trichloressigsäure**

Um Protein denaturierend zu fällen, wurde die Proteinlösung auf 12% Trichloressigsäure (TCA) eingestellt und 30 min auf Eis inkubiert. Die Probe wurde anschließend für 30 min bei 35000 g (4°C) zentrifugiert, der Überstand verworfen, auf das Proteinpräzipitat 1 ml Aceton (auf -20°C gekühlt) gegeben und 1 min kräftig geschüttelt.

Nach erneuter Zentrifugation für 30 min wurde das Aceton verworfen und das Sediment für 5 min bei 37°C getrocknet. Die Proteine wurden durch die Zugabe von SDS-Auftragspuffer und kurzes Aufkochen gelöst.

### **2.3.8 Bestimmung des Molekulargewichtes von Proteinkomplexen durch Gelfiltration**

Die Bestimmung der nativen Molekulargewichte von Proteinkomplexen erfolgte durch Gelfiltration. 1 mg der entsprechenden Mitochondrien wurde zu einer Proteinkonzentration von 5 mg/ml in dem jeweiligen Lysepuffer resuspendiert und für 30 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden unlösliche Aggregate durch Zentrifugation abgetrennt (100000 g, 2°C, 30

min). Der Überstand wurde auf eine äquilibrierte (5 Säulenvolumen des entsprechenden Laufpuffers) Superose6-Gelfiltrationssäule aufgetragen. Alle Läufe wurden mit einem ÄKTA<sup>®</sup>-System bei 4°C und einer Flussrate von 0,3-0,5 ml/min durchgeführt. Die Lauflänge betrug jeweils 1,5 Säulenvolumen. Es wurden Fraktionen zu 500 µl oder 1 ml gesammelt und die Proteine mit TCA gefällt. Die Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Westernblot analysiert. Das Molekulargewicht der Proteinkomplexe wurde anhand einer Eichkurve bestimmt, die mit folgenden Proteinen ermittelt worden war: Thyroglobulin G (669kDa), Apoferritin (443 kDa), Alkoholdehydrogenase (150 kDa), BSA (66 kDa), Cytochrom *c* (14 kDa).

Für Gelfiltrationen wurden DDM in folgenden Puffern verwendet:

Lysepuffer: 1% DDM; 150 mM KCl; 20 mM Hepes/KOH pH 7,3; 1 mM PMSF

Laufpuffer: 0,1% DDM; 150 mM KCl; 20 mM Hepes/KOH pH 7,3 ; 1 mM PMSF

### **2.3.9 Anreicherung einer ribosomalen Fraktion aus isolierten Mitochondrien**

Für eine Anreicherung mitochondrialer Ribosomen wurden 200 µg isolierte Mitochondrien sedimentiert. Das Sediment wurde in 2 ml Lysepuffer (1% Triton X-100, 25 mM KCl, 5 mM EDTA, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) für 30 min bei 4°C solubilisiert. Danach wurde der Ansatz geteilt, eine Hälfte wurde TCA präzipitiert, die andere Hälfte wurde auf ein Saccharosekissen aufgetragen (200 µl, 1,6 M Saccharose, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) und für 6 h bei 45000 rpm und 4°C in einem SW 60 Ti Rotor zentrifugiert. Der Überstand wurde mit TCA gefällt und das Sediment in Laemmli-puffer aufgenommen.

### **2.3.10 Fraktionierung ribosomaler Untereinheiten auf einem Saccharosegradienten**

Um die Untereinheiten des mitochondrialen Ribosoms aufzutrennen, wurde 1 mg isolierte Mitochondrien in 500 µl Lysepuffer (1% Triton X-100, 25 mM KCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4) für 30 min bei 4°C unter Schütteln solubilisiert. Das entstandene Lysat wurde auf einen linearen Saccharosegradienten aufgetragen. Dieser bestand aus je 2 ml 0,3 bzw. 1 M Saccharose in 0,1% Triton X-100, 25 mM KCl, 5 mM EDTA, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4. Nach Zentrifugation bei 485000 g (60000 rpm) bei 4°C für 1 h 15 min in einem SW 60 Ti-Rotor wurde der Gradient fraktioniert. Dazu wurde mit einer dünnen Nadel der Gradient von unten mit Hilfe einer Peristaltikpumpe abgesaugt und durch einen Fraktionssammler in Proben zu je 350 µl aufgeteilt. Proteine der Fraktionen wurden mit 12% TCA gefällt.

### **2.3.11 Fraktionieren von Membranproteinen**

Um Membranproteine oder Proteine, welche mit Membranen interagieren, von löslichen Proteinen zu trennen, wurden Membranpartikel aufgrund ihrer geringeren Dichte durch Flotieren von löslichen Proteinen getrennt. Isolierte Mitochondrien wurden entweder durch Beschallen (in einem Wasserbad) in Puffern unterschiedlicher Ionenstärke aufgebrochen, oder durch chemische Verfahren desintegriert. Um zwischen peripher assoziierten und integralen Membranproteinen zu unterscheiden, wurden isolierte Mitochondrien in 0,1 M Natriumcarbonat gelöst und für 30 min bei 4°C geschüttelt. Zum Teil wurden zusätzlich variable Mengen an Harnstoff verwendet. Die Proben wurden auf 1,6 M Saccharose eingestellt, mit 1,3 M und 0,3 M Saccharose überschichtet und für 2 h bei 485000 g (600000 rpm) in einem SW 60 Ti-Rotor zentrifugiert. Danach wurde der Stufengradient fraktioniert und Proteine der Fraktionen mit 12% TCA gefällt.

## **2.4 Zellbiologische Methoden**

### **2.4.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefe**

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen erfolgte nach der von Daum beschriebenen Methode (Gasser et al., 1982). Durch Zentrifugation für 5 min bei 2800 g bei Raumtemperatur wurden die Zellen bei einer OD<sub>595</sub> zwischen 1 und 2 geerntet. Anschließend wurden sie in ddH<sub>2</sub>O gewaschen, in 2 ml pro g Feuchtwicht 100 mM Tris, 10 mM DTT resuspendiert und für 10 min bei 30°C in einem Schüttler inkubiert. Danach wurde die Suspension erneut zentrifugiert (5 min, 2000 g, 4°C), die Zellen in 1,2 M Sorbitol gewaschen und pro g Feuchtwicht in 6,7 ml 1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase und 20 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,4 resuspendiert. Zum Verdau der Zellwand wurde die Suspension 40-60 min bei 30°C geschüttelt. Die Sphäroplasten wurden für 5 min bei 2000 g (4°C) geerntet und pro g Feuchtwicht in 6,7 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 0,2% BSA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris/HCl pH 7,4) resuspendiert. Die Suspension wurde in einen Glashomogenisator gegeben und die Zellen wurden durch 10 Stöße aufgebrochen. Danach wurden die Zellen für 5 min bei 2000 g bei 4°C abzentrifugiert und der Überstand gesammelt.

Das Zellpellet wurde mit weiteren 6,7 ml Homogenisierungspuffer pro g Feuchtwicht versetzt und noch einmal mit dem Glashomogenisator aufgeschlossen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurden die Überstände vereinigt und noch einmal für 5 min bei 2000 g (4°C) zentrifugiert, um



noch verbliebene intakte Zellen, Zellkerne und Membranen abzutrennen. Anschließend wurde die Suspension für 12 min bei 12000 g (4°C) zentrifugiert, um die Mitochondrien abzutrennen. Das Pellet wurde in 10 ml SEH-Puffer resuspendiert und für 5 min bei 2000 g zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden durch erneute Zentrifugation des Überstands für 12 min bei 17000 g (+4°C) pelletiert und in 0,5-1,5 ml SEH aufgenommen. Von dieser Suspension wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt. Schließlich wurde die Organellenfraktion mit SEH-Puffer auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt. Die Mitochondrien wurden aliquotiert, in flüssigem N<sub>2</sub> eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### **2.4.2 Erzeugung von Mitoplasten**

Mitochondrien, deren äußere Membran selektiv geöffnet wurde, werden als Mitoplasten bezeichnet. Um Mitoplasten zu erzeugen, wurde die Außenmembran von Mitochondrien durch hypotones Schwellen aufgebrochen, wobei die Innenmembran intakt blieb. Dazu wurden Mitochondrien in SEH-Puffer in der Regel 1:10 bis 1:20 in 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 in Anwesenheit von 2 mM ATP verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Mitoplasten durch Zentrifugation reisoliert (15000 g, 10 min, 4°C) und analog wie Mitochondrien eingesetzt. Anhand von entsprechenden Markerproteinen kann die Effizienz der Mitoplastierung nach Behandlung mit Proteinase K mittels Western Blot kontrolliert werden.

#### **2.4.3 Import von Proteinen in Mitochondrien**

Importexperimente von Proteinen in Mitochondrien wurden in folgendem Puffer durchgeführt: 3% BSA, 0,5 M Sorbitol, 80 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM Kaliumphosphat, 2,5 mM EDTA, 2,5 mM Manganchlorid, 50 mM Hepes/KOH pH 7,4. Alle Importreaktionen wurden in Anwesenheit von 2 mM ATP und 2 mM NADH durchgeführt. Für eine typische Importreaktion wurden 25-75 µg Mitochondrien mit 0,5-1,5 µl Retikulozytenlysat bei 25°C für 10-30 min inkubiert.

Die Reaktion wurde durch 1:10-Verdünnung in kalten SH-Puffer mit 1 µM Valinomycin gestoppt. Zum Öffnen der äußeren Mitochondrienmembran durch hypotones Schwellen wurde der Reaktionsansatz in 20 mM Hepes/KOH pH 7,4 1:10 verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Um zugängliche Proteine zu verdauen, wurden die Proteasen Proteinase K (PK) oder Trypsin in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt (meist 50-100 µg/ml). Der Verdau wurde 20-30 min auf Eis durchgeführt und durch Zugabe von 2 mM PMSF bzw. dem 10-fachen

Überschuss an STI gestoppt. Die Mitochondrien wurden dann durch Zentrifugation für 10 min bei 25000 g (4°C) pelletiert. Der Überstand wurde verworfen, die Mitochondrien in SHKCl resuspendiert und erneut pelletiert. Die Mitochondrien wurden dann in Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Für manche Importreaktionen wurde ein ATP-regenerierendes System verwendet. Dazu wurde der Importansatz auf 2,5 mM Malat, 2,5 mM Succinat, 5 mM Phosphokreatin und 35 U/ml Kreatinkinase eingestellt und vor der Importreaktion 5 min bei 25°C inkubiert.

#### **2.4.4 Radioaktive Markierung mitochondrialer Translationsprodukte *in organello***

Die Translation der mitochondrial kodierten Proteine wurde in isolierten Mitochondrien oder Mitoplasten durchgeführt (Westermann et al., 2001). Ein typischer Reaktionsansatz enthielt 40 µl 1,5×Translationspuffer (0,9 M Sorbitol; 225 mM KCl; 22,5 mM Kaliumphosphat pH 7,4; 30 mM Tris/HCl pH 7,4; 19 mM MgSO<sub>4</sub>; 6 mM ATP; 1,7 mM GTP; 7,5 mM α-Ketoglutarat; 7,5 mM Phosphoenolpyruvat; 150 µM aller proteinogenen Aminosäuren außer Methionin; 4,5 mg/ml fettsäurefreies BSA), 0,6 µl Pyruvatkinase (2 mg/ml), 50 µg Mitochondrien und Wasser in einem Endvolumen von 60 µl. Nach Vorinkubation für 5 min bei 25°C wurden 2 µl <sup>35</sup>S-Methionin zugegeben und für weitere 20 min inkubiert. Durch Zugabe von 15 µl 200 mM Methionin wurde die Markierung gestoppt. Die Mitochondrien wurden mit 200 µl SEM gewaschen und in 20 µl Laemmli-Puffer oder in einem anderen Puffer für weitere Experimente resuspendiert. Für die SDS-Gelelektrophorese wurden die Proben 10 min bei 56°C geschüttelt, jedoch nicht gekocht, um die Aggregation der teilweise sehr hydrophoben Proteine zu verhindern.

Wenn die *in organello*-Translation mit Quervernetzungsexperimenten kombiniert wurde, dann wurde der 1,5×Translationspuffer mit Hepes/KOH (pH 7,4) anstelle von Tris und ohne BSA angesetzt.

#### **2.4.5 Quervernetzung mitochondrialer Translationsprodukte mit mitochondrialen Proteinen**

Chemische Quervernetzungsreagenzien können benachbarte Proteine kovalent verknüpfen, so dass sie zur Charakterisierung von Protein-Protein-Wechselwirkungen eingesetzt werden. Verwendet wurden die membranpermeablen Quervernetzungsreagenzien 1,5-Difluoro-1,4-dinitrobenzol (DFDNB), Disuccinimidylglutarat (DSG) und Dithiobis(succinimidylpropionate) (DSP). Die Quervernetzung zwischen mitochondrialen Translationsprodukten und

mitochondrialen Proteinen wurde während der *in organello*-Translation durchgeführt. Es wurde nach 15 min das Quervernetzungsreagenz (DFDNB oder DSG) zugefügt und für weitere 15-30 min inkubiert. Markierung und Quervernetzungsreaktion wurden durch Zusatz von 100 mM Glycin und 200 mM Methionin gestoppt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und für eine Immunfällung eingesetzt (Herrmann et al., 2001).

#### **2.4.6 Bestimmung von Enzymaktivitäten**

Zur Bestimmung mitochondrialer Enzymaktivitäten wurden Ansätze gewählt, in denen der Substratumsatz photometrisch bestimmt werden konnte. Es wurden in den Messungen solche Proteinmengen eingesetzt, die zu Extinktionsänderungen von 0,015-0,060 pro min führten. Anhand dieser Extinktionsänderungen wurden nach dem Lambert-Beerschen Gesetz die Enzymaktivitäten berechnet.

##### **2.4.6.1 Bestimmung der Malatdehydrogenase-Aktivität**

Malatdehydrogenase (MDH) katalysiert die Reaktion von Malat zu Oxalacetat. Bei der Umsetzung fungiert  $\text{NAD}^+$  als Elektronenakzeptor, wodurch NADH entsteht. Das NADH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden. Die Messung wurde bei 30°C in einem Volumen von 1000  $\mu\text{l}$  und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 85 mM Malat, 2,44 mM  $\text{NAD}^+$ , Glycin/NaOH pH 10,0. Der Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm beträgt  $6220 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ .

##### **2.4.6.2 Bestimmung der NADH-Cytochrom *c*-Reduktase-Aktivität**

Cytochrom *c*-Reduktase katalysiert die Reduktion von Cytochrom *c* mit NADH als Elektronendonator. Die Reduktion von Cytochrom *c* kann photometrisch bei 550 nm gemessen werden. Die Messung wurde bei 25°C in einem Volumen von 1000  $\mu\text{l}$  und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 0,08% Cytochrom *c*, 0,1 mM NADH, 0,1 mM KCN, 10 mM Kaliumphosphat pH 7,5. Zum Starten wurde die Reaktion mit 20-50  $\mu\text{g}$  Mitochondrien versetzt. Aufgrund des osmotischen Schocks platzen die Mitochondrien auf, wodurch die Enzymkomplexe in der inneren Membran zugänglich werden. Die Anfangssteigung der Reaktion wurde ermittelt und daraus die spezifische Aktivität berechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom *c* bei 550 nm beträgt  $18,5 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.6.3 Bestimmung der Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität

Cytochrom *c*-Oxidase katalysiert die Oxidation von Cytochrom *c* mit Sauerstoff als Elektronenakzeptor. Bei der Messung der Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität wurde die Oxidation von Cytochrom *c* bei 550 nm verfolgt. Eine 1%ige Cytochrom *c*-Lösung (in 20 mM Kaliumphosphat pH 7,5) wurde mit Natriumdithionit vollständig reduziert (Farbumschlag von orange-rot nach pink). 920 µl Phosphatpuffer (20 mM Kaliumphosphat pH 7,5) und 80 µl der reduzierten Cytochrom *c*-Lösung wurde in einer 1 ml Küvette gemischt und mit 1 µl Mitochondriensuspension versetzt. Die Anfangssteigung der Reaktion wurde ermittelt und die spezifische Aktivität berechnet. Der Extinktionskoeffizient von Cytochrom *c* bei 550 nm beträgt  $18,5 \text{ mM}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ .

### 2.4.6.4 Bestimmung der Oligomycin-sensitiven ATPase-Aktivität

Die Oligomycin-sensitive ATPase-Aktivität wurde mit einem gekoppelten Enzymassay gemessen. Durch die ATPase hydrolysiertes ATP wird durch Pyruvatkinase (PK) unter Verbrauch von Phosphoenolpyruvat rephosphoryliert. Das entstehende Pyruvat wird unter NADH-Verbrauch durch Lactatdehydrogenase (LDH) reduziert. Das NADH kann photometrisch bei 340 nm bestimmt werden. Durch Zugabe von 50 µg Mitochondrien wurde die die Reaktion gestartet. Die Messung wurde bei 25°C in einem Volumen von 1000 µl und folgenden Endkonzentrationen durchgeführt: 4 mM ATP, 1 mM NADH, 1 mM Phosphoenolpyruvat, 5 U/ml von LDH/PK, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 20 mM Hepes/KOH pH 7,3. Um die spezifische F<sub>1</sub>-F<sub>0</sub>-ATPase Aktivität zu messen, wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,1 µM Oligomycin gehemmt. Der Extinktionskoeffizient von NADH bei 340 nm beträgt  $6220 \text{ M}^{-1} * \text{cm}^{-1}$ .

## 2.5 Immunologische Methoden

### 2.5.1 Herstellung spezifischer Antiseren in Kaninchen

Zur Herstellung von polyklonalen Antiseren wurden Kaninchen mit rekombinant gewonnenen Proteinen immunisiert. Aus dem Kaninchenblut wurde das Serum gewonnen.

Für die Erstinjektion wurden 200 µg Protein in einem Volumen von 250 µl 1:1 mit TiterMax (Sigma) versetzt und 1 min auf dem Vortex-Gerät gemischt. Die Emulsion wurde in 3 Portionen

subkutan in den Nackenbereich des Kaninchens injiziert. Weitere Injektionen folgten im Abstand von 4 Wochen, wobei an Stelle von TiterMax unvollständiges Freundsches Adjuvans verwendet wurde. 10-12 Tage nach jeder Injektion, außer der Erstinjektion, wurde dem Kaninchen 10-30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Nach der Gerinnung des Blutes bei RT (-60 min) wurde das Serum durch zweimalige Zentrifugation gewonnen (5 min bei 3000 g, dann 15 min bei 20000 g). Anschließend wurde der Überstand zur Inaktivierung des Komplementsystems für 20 min auf 56°C erhitzt und bei -20°C gelagert.

### 2.5.2 Verwendete Antikörper

Alle gegen Proteine von *S. cerevisiae* verwendeten Antikörper wurden durch Immunisierung von Kaninchen gewonnen. Der monoklonale His<sub>6</sub>-Antikörper wurde kommerziell bezogen (Qiagen, Hilden bzw. Amersham Biosciences Europe, Freiburg). In Tabelle 2.3 sind die wichtigsten der in der Arbeit verwendeten Antikörper mit Beschreibung aufgeführt. Die polyklonalen Seren wurden für Westernblot-Analysen und Immunfällungen eingesetzt.

**Tabelle 2.3 Verwendete Antikörper**

| <b>Antikörper</b>  | <b>Beschreibung</b>   |
|--------------------|---|
| α-His <sub>6</sub> | Gegen Hexahistidinrest  |
| α-Oxa1C            | Gegen Oxa1C-Terminus, GST-Oxa1 <sup>311-401</sup> als Antigen |
| α-Oxa1N            | Gegen Oxa1N-Terminus, Sequenz: SIDELTSSAPSLASTSD              |
| α-Cox2             | Gegen gereinigtes Cox2 aus Hefe                               |
| α.Mba1             | Gegen Mba1 <sup>259-271</sup>                                 |
| α-Tom70            | Gegen His <sub>6</sub> -Tom70 <sup>40-617</sup>               |
| α-Mrp136           | Gegen Mrp136, GST-Mrp136 als Antigen                          |
| α-Mrp20            | Gegen Mrp20, MBP-Mrp20 als Antigen                            |
| α-F1β              | Gegen F1β der ATP-Synthase                                    |

### 2.5.3 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Um eine hohe Spezifität in immunologischen Experimenten zu erhalten, wurden Antikörper mittels Affinitätschromatographie aus Serum aufgereinigt. Dazu wurde zunächst das Antigen an CNBr-aktivierte Sepharose gebunden. Zur Aktivierung des Säulenmaterials wurden 0,24 g Sepharose in 10 ml 1 mM HCl suspendiert, für 10 min bei RT über Kopf geschüttelt und 3x in je 10 ml 1 mM HCl gewaschen. 1,5 mg des gereinigten Proteins in einem Volumen von 3 ml wurden bei folgenden Endkonzentrationen mit dem aktivierten Säulenmaterial versetzt: 0,25% SDS, 500 mM Natriumchlorid, 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3. Die Suspension wurde für 1,5 h bei RT über Kopf geschüttelt und das Säulenmaterial wurde 3x mit je 3 ml 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumhydrogencarbonat pH 8,3 gewaschen. Anschließend wurde die Sepharose in 5 ml 100 mM Tris/HCl pH 8,0 resuspendiert, für 2 h bei RT belassen und auf eine Säule mit Fritte gegeben. Die Säule wurde mit je 5 ml 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Natriumacetat pH 4,0 und 500 mM Natriumchlorid, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen (mit einer Laufgeschwindigkeit von 3 ml/min). Dieser Vorgang wurde insgesamt 3x durchgeführt, bevor die Säule dann mit 5 ml 10 mM Natriumazid, 100 mM Tris/HCl pH 8,0 gewaschen und gelagert wurde (bei 4°C).

Um die Antikörper an die Affinitätsäule zu binden, wurde die Säule zuerst mit je 10 ml der folgenden Puffer gewaschen: 10 mM Tris/HCl pH 7,5; 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 mM Tris/HCl pH 8,8; 100 mM Natriumphosphat pH 11,5; 10 mM Tris/HCl pH 7,5. Zu 4 ml Serum wurden 16 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 gegeben und die Lösung wurde auf folgende Konzentrationen eingestellt: 1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 0,5 mM o-Phe, 1 µg/ml Leupeptin. Das Serum wurde 3x mit einer Laufgeschwindigkeit von 1 ml/min über die Säule gegeben und zunächst mit 20 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5, dann mit 20 ml 500 mM Natriumchlorid und schließlich mit 20 ml 10 mM Tris pH 7,5 gewaschen.

Die Elution wurde in 1 ml-Schritten mit folgenden Puffern durchgeführt: 10 ml Citrat pH 4,0; 10 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2,5; 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 8,8 (wurde verworfen); 10 ml Natriumphosphat pH 11,5 (wurde verworfen); 10 ml 10 mM Tris/HCl pH 7,5 (wurde verworfen). Die Fraktionen wurden mit 1 M Tris bzw. 1 M Glycin pH 2,2 neutralisiert, bei -20°C weggefroren und gelagert. Die Anwesenheit von Antikörpern und die Spezifität der einzelnen Fraktionen wurde durch Westernblot kontrolliert.

#### **2.5.4 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen (Western Blot)**

Um nach dem elektrophoretischen Transfer von Proteinen auf eine Nitrozellulosemembran unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, wurde die Membran für mindestens 30 min in einer Proteinlösung (3% Milchpulver oder BSA in TBS) geschwenkt. Anschließend folgte die Immundekoration mit Antiserum oder gereinigtem Antikörper (in 3% Milchpulver oder BSA in TBS) für mindestens 1,5 h bei RT oder über Nacht bei 4°C. Antiseren wurden in Verdünnungen von 1:500 bis 1:5000 und affinitätsgereinigte Antikörper in Verdünnungen von 1:150 bis 1:500 eingesetzt. Nach der Immundekoration wurde die Nitrozellulose gewaschen (3x 5 min in TBS) und für 45-90 min mit einem Antikörperkonjugat von IgG gegen Kaninchen (bzw. Maus bei monoklonalen Antikörpern) und Meerrettich-Peroxidase inkubiert (1:10000 in 3% Milchpulver oder BSA in TBS).

Die Membran wurde erneut gewaschen (3x 5 min in TBS) und für 1 min mit Luminol-Reagenz (1,1 mM Luminol, 0,2 mM Cumarinsäure, 0,25 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 100 mM Tris/HCl pH 8,5) durchtränkt. Anschließend wurde die Nitrozellulose zwischen zwei transparente Folien gelegt und 1 s bis 10 min auf Röntgenfilmen exponiert.

#### **2.5.5 Immunpräzipitation unter stringenten Bedingungen**

Um Interaktionen mitochondrialer Proteine mit quervernetzten Partnerproteinen nachzuweisen, wurden typischerweise 50-200 µg Mitochondrien in 20 µl SDS-Puffer (1% SDS) resuspendiert und für 1 min bei 95°C geschüttelt. Das solubilisierte Material wurde 20-fach mit Lysepuffer (0,1% Triton X-100, 150 mM Kaliumchlorid, 1 mM PMSF, 20 mM Tris/HCl pH 7,4) verdünnt und kurz geschüttelt. Dieses Lysat wurde für 30 min bei 47000 g (4°C) zentrifugiert und der Überstand wurde für die Immunpräzipitations-Experimente eingesetzt.

Für die Immunfällung wurden 20 µl 50%ige Protein A-Sepharose (in 10 mM Tris/ HCl pH 7,4 gewaschen) zu 250 µl Lysat gegeben und mit 5-10 µl Serum oder 20-40 µl gereinigtem Antikörper versetzt und 1-2 h bei 4°C über Kopf geschüttelt. Die an Protein A-Sepharose gebundenen Antikörper-Antigenkomplexe wurde 2x in Lysepuffer und ein weiteres Mal in Lysepuffer ohne Detergens gewaschen, bevor die Proteine durch Zugabe von 30 µl Laemmli-Puffer abgelöst wurden.

## 2.6 Puffer und Medien

Laktat-Medium: 3 g/l Hefeextrakt, 1 g/l Galaktose, 1 g/l Kaliumphosphat, 1 g/l Ammoniumchlorid, 0,5 g/l Kalziumchlorid, 0,5 g/l Natriumchlorid, 0,6 g/l Magnesiumsulfat, 0,3 ml/l Eisen(III)chlorid (1%), 2% Laktat, pH 5,5 mit KOH

Laemmli-Puffer: 2% SDS, 5%  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, 60 mM Tris/HCl pH 6,8

LB-Medium: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid

LB<sub>Amp</sub>-Medium: LB-Medium mit 100  $\mu$ g/ml Ampizillin

LB-Platten: 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l Natriumchlorid, 1,5% Agar

LB<sub>Amp</sub>-Platten: LB-Platten mit 100  $\mu$ g/ml Amp

PBS: 16 mM Natriumhydrogenphosphat, 4 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 115 mM Natriumchlorid

SEH: 0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4

SH: 0,6 M Sorbitol, 20mM Hepes/KOH pH 7,4

SHKCl: 0,6 M Sorbitol, 80mM KCl, 20 mM Hepes/KOH pH 7,4

Selektiv-Medium: 0,17% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0,5%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 2% Glukose oder 2% Galaktose, supplementiert mit entspr. Auxotrophiemarkern

Selektiv-Platten: Selektiv-Medium mit 2% Agar (SC-Platten)

SOB-Medium: 20 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 0,58 g/l Natriumchlorid, 0,19 g/l Kaliumchlorid

SOC-Medium: SOB-Medium supplementiert mit 20 mM Glukose, 10 mM Magnesiumchlorid

TBS-Puffer: 150 mM Natriumchlorid, 10 mM Tris/HCl pH 7,5

TE-Puffer: 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8,0

YP-Medium: 1% Hefeextrakt, 2% Bacto-Pepton, pH 5,5 mit HCl

YP-Platten: 2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Agar, pH 5,5 mit HCl

YPD-Medium: YP-Medium mit 2% Glukose

YPD-Platten: 2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Glukose  
2% Agar, pH 5,5 mit HCl

YPG-Medium: YP-Medium mit 3% Glyzerin

YPG-Platten: 2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 3% Glyzerin, 2% Agar, pH 5,5 mit HCl

YPGal-Medium: YP-Medium mit 2% Galaktose

YPGal-Platten: 2% Hefeextrakt, 4% Bacto-Pepton, 2% Galaktose, 2% Agar, pH 5,5 mit HCl



## 2.7 Geräte

Amersham Biosciences, Freiburg: Spannungsversorgung, Flachbettscanner ImageScanner, Quantifizierungsprogramm ImageMaster, Chromatographiesysteme und Säulen

Beckman Coulter, Krefeld: Kühlzentrifugen (Avanti), Ultrazentrifugen (Optima)

Bio-Rad, Hercules, USA: Elektroporationsgerät Gene Pulser

Appligene, Heidelberg: Agarosegel Imaging-System

Elma, Singen: Ultraschallbad Transsonic 310

Eppendorf, Hamburg: Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen

Gradienten-PCR-Maschine Mastercycler Gradient

Institutswerkstatt, München: Semidry-Blot-Apparaturen, Tank-Blot-Apparaturen, Elektrophoresekammern, Überkopf-Schüttler,

Kontron Instruments, Watford, Großbritannien: Spektrophotometer Uvikon 930

Memmert, Hannover: Inkubatoren, Wärmeschränke

MWG Biotech, Ebersberg: PCR-Maschine Primus

Sigma Laborzentrifugen, Osterode: Tisch-Kühlzentrifugen

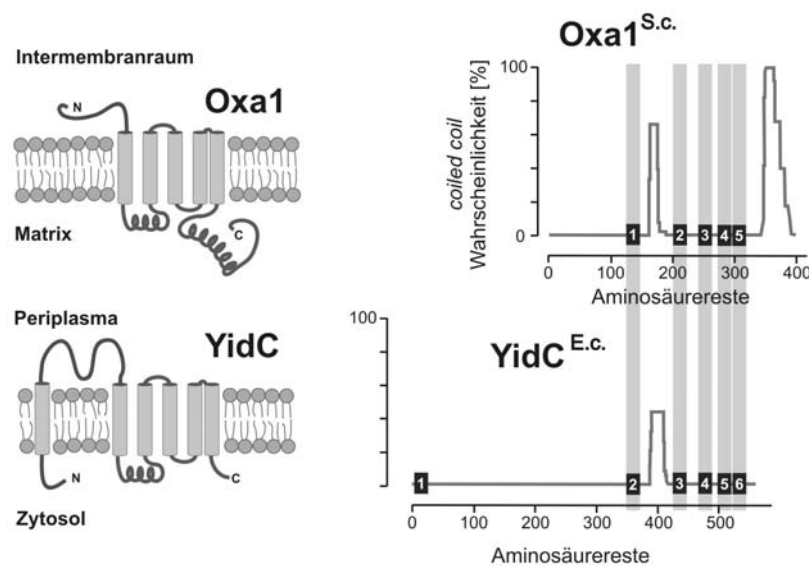
Spex Industries, Edison, USA: Spektrofluorometer Spex FluoroMax

Vacuumbrand, Wertheim: Vakuumpumpe PC 2001 Vario

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Charakterisierung der C-terminalen Domäne von Oxa1

Eine zentrale Komponente im Insertionsprozess mitochondrial kodierter Proteine ist Oxa1. Oxa1 ist das zuerst entdeckte Mitglied der konservierten Oxa1/Alb3/YidC-Proteinfamilie. Angehörige dieser Familie vermitteln in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten die Integration von Proteinen in Membranen (Herrmann und Neupert, 2003; Kuhn et al., 2003). Obwohl die Funktion der verschiedenen Mitglieder der Oxa1-Familie weitgehend konserviert zu sein scheint, zeigen diese Proteine auf Primärsequenzebene keine hohe Übereinstimmung. Dagegen zeigen alle einen ähnlichen modularen Aufbau mit einem hydrophoben Kernbereich, welcher aus fünf Transmembranhelizes besteht, welche in Länge und im Abstand hoch konserviert sind (Abb. 3.1 links). Darüber hinaus verfügen alle Oxa1-Proteine aus Mitochondrien über eine lösliche C-terminale Domäne, welche den Homologen aus Bakterien und Chloroplasten fehlt.



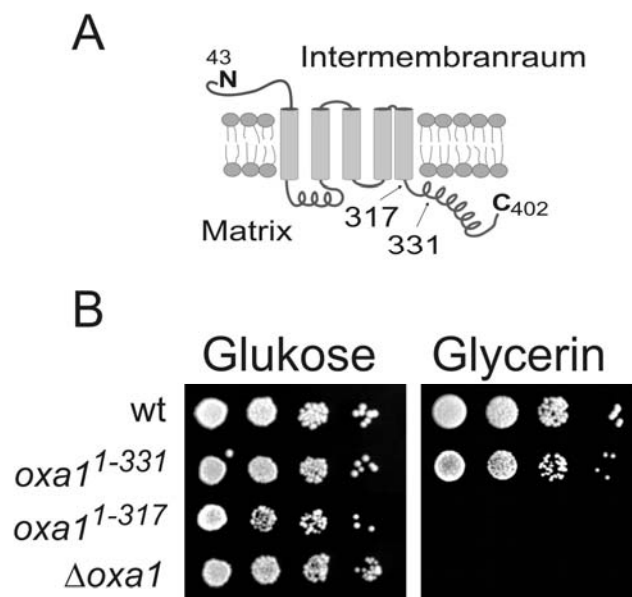
**Abbildung 3.1 Modularer Aufbau von Oxa1.** Topologievergleich von Oxa1 und YidC. Oxa1 wie YidC besitzen einen konservierten hydrophoben Kernbereich, der aus 5 Transmembranhelizes besteht (linke Schemata). Oxa1 besitzt zusätzlich eine lösliche C-terminale Domäne, die eine große Wahrscheinlichkeit aufweist, *coiled-coil* Strukturen auszubilden (rechte Abbildung).

Diese Domäne ist in der Sequenz zwischen Oxa1-Proteinen nicht konserviert, besitzt aber in allen Fällen eine stark positive Nettoladung und meist eine hohe Wahrscheinlichkeit, *coiled-coil*

Domänen auszubilden (Abb. 3.1 rechts). Diese vermitteln oft Interaktionen mit anderen Molekülen.

### 3.1.1 Der C-Terminus von Oxa1 ist notwendig für das Wachstum auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle

Um die Wichtigkeit der C-terminalen Domäne für die Funktion von Oxa1 zu untersuchen, wurde von Gregor Szyrach und Nathalie Bonnefoy zuerst mittels homologer Rekombination der C-Terminus des *S. cerevisiae*-Proteins verkürzt. Dazu wurden Stopkodons in die kodierende Sequenz von Oxa1 eingeführt. Die erste Deletion ( $Oxa1^{1-331}$ ) entfernte 71, die zweite ( $Oxa1^{1-317}$ ) entfernte 85 Aminosäuren des C-Terminus, wodurch die gesamte Matrixdomäne entfernt wurde (Abb. 3.1.1 A).



**Abbildung 3.1.1 Der C-Terminus von Oxa1 ist notwendig für das Wachstum auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle.**

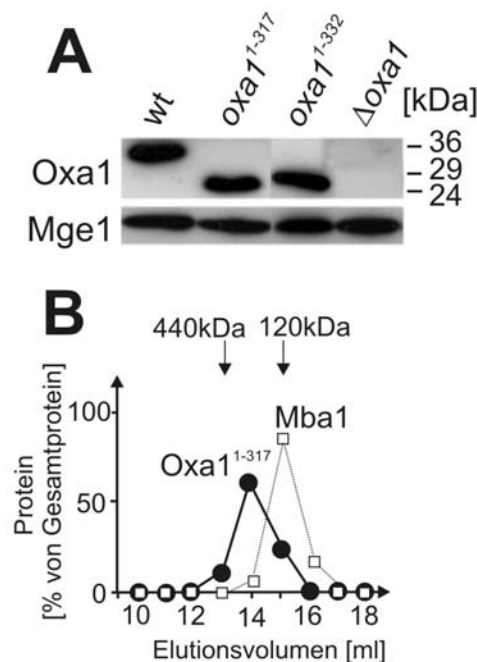
**A** Die Topologie von Oxa1 und die Positionen der eingeführten Stopkodons sind dargestellt. **B** Es wurden Wildtyp-Zellen (wt) oder Zellen der angegebenen Mutanten in YPD Medium kultiviert. In serieller 10-facher Verdünnung wurden die Zellen dann auf YP-Platten mit 2% Glukose oder 3% Glycerin aufgetragen und bei 30°C für zwei (Glukose) bzw. drei (Glycerin) Tage inkubiert.

Die erhaltenen haploiden Hefestämme wurden auf ihren Wachstumsphänotyp untersucht. Alle untersuchten Stämme zeigten ähnliches Wachstumsverhalten auf der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose, da das Oxa1-Protein nicht essentiell für die generelle Lebensfähigkeit

der Hefe ist (Abb. 3.1.1 B links). Auf der nichtfermentierbaren Kohlenstoffquelle jedoch konnten nur mehr der Wildtypstamm und die  $Oxa1^{1-331}$ -Mutante wachsen. Im Gegensatz dazu war die  $Oxa1^{1-317}$ -Mutante, wie die  $Oxa1$ -Deletionsmutante, nicht mehr in der Lage zu wachsen (Abb. 3.1.1 B rechts). Dies deutet auf eine wichtige Rolle des C-Terminus von  $Oxa1$  für die Funktion der Mitochondrien hin.

### 3.1.2 Stabilität und Topologie von C-terminal deletierten $Oxa1$ -Proteinen

Was ist die Ursache des Wachstumsphänotyps der  $Oxa1^{1-317}$ -Mutante? Um dies zu beantworten, wurden zuerst die Stabilität und der Assemblierungszustand des Proteins in isolierten Mitochondrien untersucht.



**Abbildung 3.1.2 Stabilität und molekulare Organisation von C-terminal deletierten  $Oxa1$ -Proteinen.**

**A**  $Oxa1$ -Mengen sind durch C-terminale Deletionen nicht vermindert. 100  $\mu$ g isolierte Mitochondrien wurden elektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer auf eine Nitrozellulosemembran wurden die Proteine in einem Western Blot nachgewiesen. Mge1 diente als Ladekontrolle.

**B**  $Oxa1^{1-317}$  ist Teil eines hochmolekularen Komplexes.  $Oxa1^{1-317}$ -Mitochondrien wurden in 1% DDM lysiert und die Proteinkomplexe mit Hilfe einer Superose6-Säule gelchromatographisch aufgetrennt. Die Verteilung von  $Oxa1^{1-317}$  und Mba1 wurde mittels Western Blot nachgewiesen; die quantifizierten Signale sind dargestellt.

Zur Verifizierung der Stabilität wurden zuerst Proteine der verschiedenen Mitochondrienpräparationen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde durch

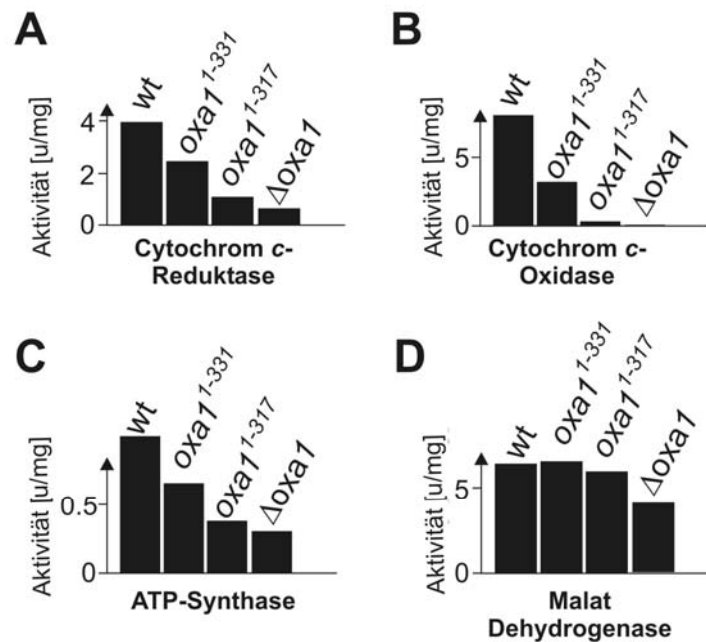
Western Blot-Analyse überprüft, ob die C-terminal verkürzten Oxa1-Proteine in ähnlicher Konzentration vorliegen. Mit einem für den N-Terminus von Oxa1 spezifischen Antikörper wurden sowohl in der Oxa1<sup>1-317</sup>-Mutante als auch in der Oxa1<sup>1-331</sup>-Mutante Signale für Proteine mit den erwarteten Molekulargewichten gefunden (Abb. 3.1.2 A). Diese lagen in ähnlichen Konzentrationen wie das Wildtyp-Protein vor.

Um den Assemblierungszustand zu verfolgen, wurden isolierte Mitochondrien schonend lysiert und einer Gel-Permeationschromatografie unterzogen. Das Oxa1<sup>1-317</sup>-Protein wurde in einem hochmolekularen Komplex gefunden (Abb. 3.1.2 B), der eine ähnliche Größe aufwies wie der Komplex des Wildtyp-Proteins. Somit wurde gezeigt, dass die C-terminalen Deletionen weder die Stabilität noch die hochmolekulare Organisation des Oxa1-Proteins beeinträchtigen. Der beobachtete Wachstumsdefekt der Oxa1<sup>1-317</sup>-Mutante ist ein Indiz dafür, dass die deletierte Domäne für die molekulare Funktion von Oxa1 von großer Bedeutung ist.

### **3.1.3 Deletionen im C-Terminus von Oxa1 führen zu einer Einschränkung der Aktivität von Komplexen der Atmungskette**

Der starke Wachstumsphänotyp der Oxa1<sup>1-317</sup>-Mutante auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle weist auf ein spezifisches Problem der Mitochondrien des Stammes hin.

Um zu untersuchen, welchen spezifischen Effekt diese Deletionen auf Mitochondrien haben, wurden die Enzymaktivitäten der Cytochrom *c*-Reduktase, der Cytochrom *c*-Oxidase und der ATP-Synthase gemessen. Als Kontrolle wurde die Malatdehydrogenase-Aktivität bestimmt. Wie in Abbildung 3.1.3 gezeigt, waren vor allem in der Oxa1<sup>1-317</sup>-Mutante die Aktivitäten der drei Atmungsketten-Komplexe deutlich reduziert. Am stärksten betroffen war hier die Cytochrom *c*-Oxidase, deren Aktivität, wie in der Oxa1-Deletionsmutante, nicht mehr messbar war. Dies ist ein Hinweis auf einen Defekt in der Biogenese der Atmungskettenkomplexe in der Oxa1<sup>1-317</sup>-Mutante, welcher zu einem Wachstumsdefekt auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle führt.



**Abbildung 3.1.3 Deletionen des C-Terminus von Oxa1 führen zu einer Einschränkung der Aktivität von Komplexen der Atmungskette** Die spezifischen Enzymaktivitäten von Cytochrom c-Reduktase (A), Cytochrome c-Oxidase (B), ATP-Synthase (C) und Malatdehydrogenase (D) wurden in isolierten Mitochondrien bestimmt.

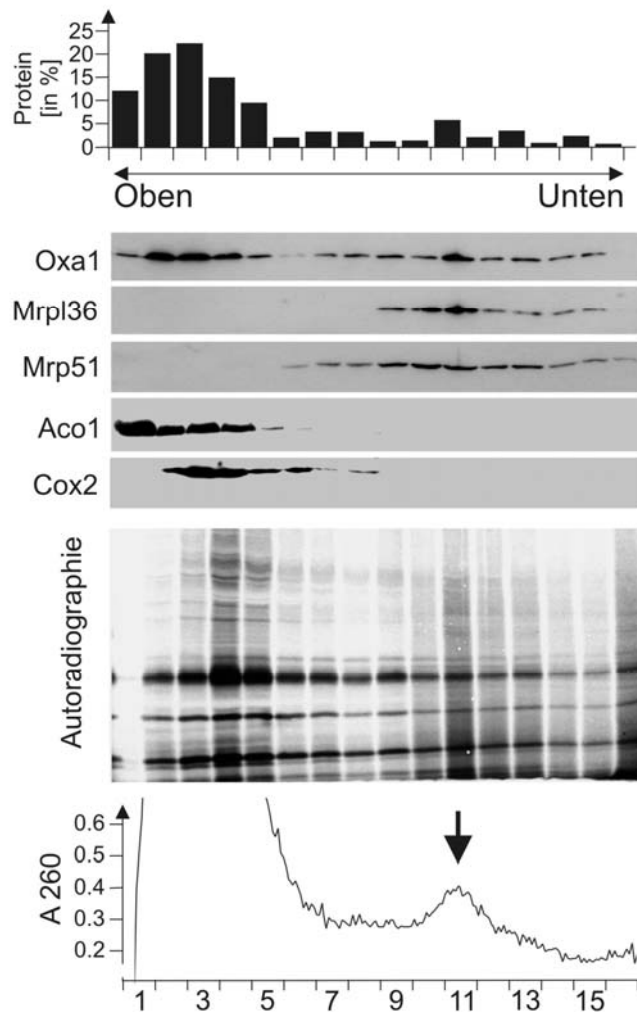
Durch die Arbeit von Gregor Szyrach konnte gezeigt werden, dass der C-Terminus notwendig ist für die Biogenese von Cox2. Dieses häufte sich in den Oxa1<sup>1-317</sup>-Mitochondrien in einer proteaseresistenten Lokalisierung als Vorläuferprotein an. Des Weiteren konnten konservativ sortierte Proteine in diesen Mitochondrien ähnlich effizient wie in Wildtyp-Mitochondrien importiert und transloziert werden, wobei letzterer Schritt in ΔOxa1-Mitochondrien stark eingeschränkt ablief. Dem für Cox2 beobachteten Translokationsdefekt liegt demnach nicht ein genereller Exportdefekt zugrunde.

### 3.1.4 Oxa1 ko-fraktioniert mit mitochondrialen Ribosomen

Der beobachtete Translokationsdefekt mitochondrial kodierter Proteine der Oxa1<sup>1-317</sup>-Mitochondrien könnte auch durch eine gestörte Koordination der ko-translationen Insertionsreaktionen erklärt werden. So wurde kürzlich gezeigt, dass Oxa1, ähnlich wie das bakterielle Homolog YidC, früh während deren Synthese mit naszierenden Proteinen interagiert

(Hell et al., 1998; Preuss et al., 2001). Das legt nahe, dass sich Oxa1 in räumlicher Nähe zu translatierenden Ribosomen befindet. Auf welchen molekularen Prinzipien eine solche räumliche Organisation von Translations- und Translokationsreaktionen beruht, ist nicht bekannt. Um eine mögliche Interaktion von Oxa1 mit mitochondrialen Ribosomen zu untersuchen, wurden Wildtyp-Mitochondrien schonend lysiert, auf einen linearen Saccharosegradienten aufgetragen und einer Zentrifugation unterzogen. Um mögliche Ko-Migration mitochondrialer Translationsprodukte zu verfolgen, wurden diese vor der Lyse mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Der Hauptteil mitochondrialer Proteine befand sich nach der Zentrifugation in den oberen Fraktionen des Gradienten (Abb. 3.1.4 Oben). Die Verteilung von Oxa1, Mrpl36 (große ribosomale Untereinheit), Mrp51 (kleine ribosomale Untereinheit), Aco1 (Aconitase, lösliches Matrixprotein) und Cox2 wurde mittels Western-Blot verfolgt (Abb. 3.1.4 Mitte). Oxa1 wurde in zwei unterschiedlichen Positionen im Gradienten gefunden: Ein Großteil des Signals wurde in den oberen Fraktionen, zusammen mit den Markern Cox2 und Aco1, gefunden. Ungefähr 15-20% von Oxa1 wanderten zu einer höheren Saccharosekonzentration. Dieser Teil ko-migrierte mit den ribosomalen Markerproteinen Mrpl36 und Mrp51, ein Hinweis auf eine Interaktion von Oxa1 mit mitochondrialen Ribosomen. Komplettsynthetisierte Translationsprodukte blieben vornehmlich in den oberen Fraktionen (Abb. 3.1.4 Unten). Im Gegensatz dazu wanderten die markierten naszierenden Ketten zusammen mit den mitochondrialen Ribosomen. Zusammenfassend kann man schließen, dass ein Teil von Oxa1 an mitochondriale Ribosomen bindet und eventuell auf diese Weise die Translationsmaschinerie an die Translokation gekoppelt sein könnte.

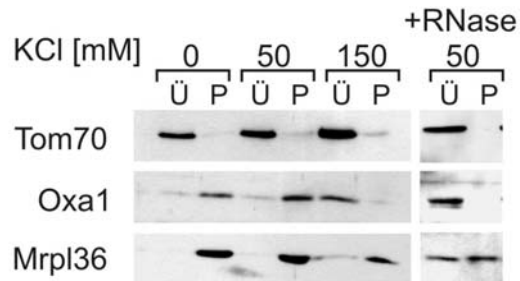
Weiterhin konnte durch Gregor Szyrach gezeigt werden, dass der C-Terminus von Oxa1 notwendig ist, damit Oxa1 mit mitochondrialen Ribosomen interagieren kann.



**Abbildung 3.1.4 Oxa1 kofraktioniert mit mitochondrialen Ribosomen.** Translationsprodukte wurden in isolierten Wildtyp-Mitochondrien mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Die Mitochondrien wurden reisoliert und in 2% Digitonin lysiert. Nach Zentrifugation wurde das Lysat auf einen linearen Saccharosegradienten aufgetragen und für 16 h bei 83000 g zentrifugiert. Der Gradient (Proteinprofil in der obersten Reihe bzw. Absorbtion bei 260 nm in der untersten) wurde fraktioniert. Proteine der Fraktionen wurden mit TCA gefällt und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Verteilung von Oxa1, den ribosomalen Proteinen Mrpl36 und Mrp51, von Aco1 und Cox2 wurden mittels Western Blot ermittelt. Die Autoradiographie zeigt, dass fertig gestellte Translationsprodukte hauptsächlich in den oberen Fraktionen des Gradienten zu finden sind. Naszierende Ketten, ersichtlich durch diffuse Bandenmuster, fraktionierten vor allem mit den Ribosomen. Der Pfeil markiert die Position der Ribosomen im Absorbtionsprofil bei 260nm.



### 3.1.5 Die Interaktion von Oxa1 mit Ribosomen ist sensitiv gegenüber Salz und RNase-Verdau

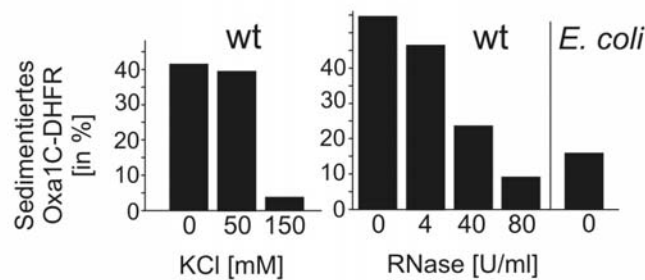


**Abbildung 3.1.5 Die Interaktion von Oxa1 mit Ribosomen ist Salz- und RNase-sensitiv.** Wildtyp-Mitochondrien wurden mit Digitonin in Puffern unterschiedlicher KCl-Konzentrationen lysiert und eine ribosomale Fraktion durch Zentrifugation gewonnen. Die ribosomale Fraktion (P) und der resultierende Überstand (Ü) wurden mittels Western Blot auf die Verteilung von Tom70, Oxa1 und Mrpl36 hin untersucht. Für das rechte Experiment wurde das mitochondriale Lysat vor der Fraktionierung für eine Stunde bei 4°C mit 40 U/ml RNase behandelt.

Um die Interaktion von Oxa1 mit Ribosomen näher zu charakterisieren, wurden Wildtyp-Mitochondrien in Puffern unterschiedlicher KCl-Konzentrationen lysiert und eine ribosomale Fraktion gewonnen. Die Interaktion von Oxa1 mit dem Ribosom war dabei deutlich salzsensitiv und Konzentrationen von 150 mM KCl bewirkten die Freisetzung von Oxa1 von den Ribosomen (Abb. 3.1.5 links). Ebenso sedimentierte Oxa1 nicht mit den Ribosomen, wenn diese zuvor durch RNase Behandlung partiell verdaut wurden (Abb. 3.1.5 rechts). Dies legt nahe, dass eine ionische Wechselwirkung für die Bindung von Oxa1 an die Ribosomen entscheidend ist und dass der RNA-Anteil der Ribosomen direkt oder indirekt zur Bindung beiträgt.

### 3.1.6 Der C-Terminus von Oxa1 bindet mitochondriale Ribosomen *in vitro*

Die C-terminale Domäne von Oxa1 wird ist notwendig für die Bindung von Oxa1 an mitochondriale Ribosomen. Um *in vitro* zu testen, ob diese Domäne allein ausreicht, um an mitochondriale Ribosomen zu binden, wurde der C-Terminus von Oxa1 an DHFR fusioniert und *in vitro* mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert.



#### Abbildung 3.1.6 Der C-Terminus von Oxa1 bindet an mitochondriale Ribosomen *in vitro*

Wildtyp-Mitochondrien wurden lysiert und der entstandene Extrakt mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiertem Oxa1<sup>314-402</sup> in Puffern unterschiedlicher KCl- bzw., RNase-Konzentrationen inkubiert. Danach wurde eine ribosomale Fraktion durch Zentrifugation gewonnen und der darin enthaltene Anteil an eingesetztem Oxa1<sup>314-402</sup>-DHFR quantifiziert. Für das rechte Experiment wurde ein bakterielles Lysat verwendet.

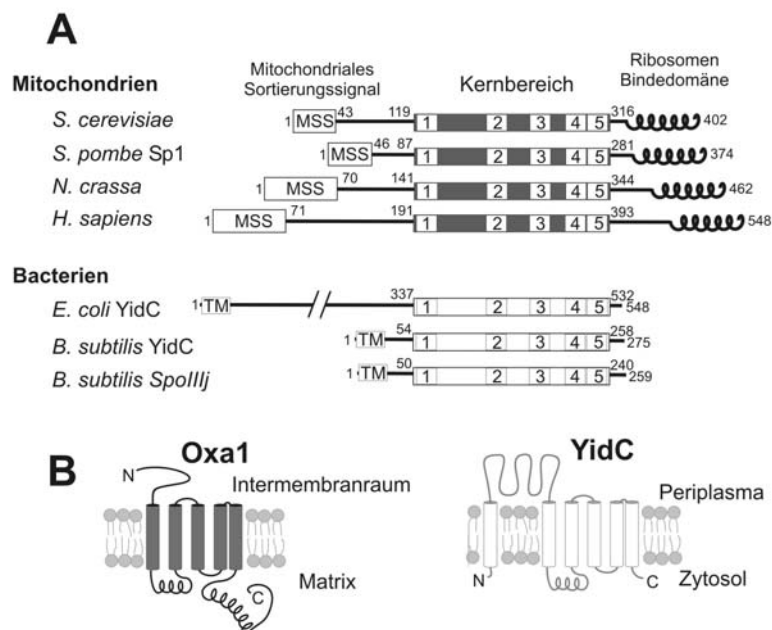
Dann wurde das Fusionsprotein mit mitochondrialen oder bakteriellen Lysaten inkubiert und danach eine ribosomale Fraktion gewonnen. Die Verteilung des Proteins in den ribosomalen und nicht-ribosomalen Fraktionen wurde mittels Autoradiographie bestimmt (Abb. 3.1.6 links). Die Interaktion des C-Terminus von Oxa1 mit mitochondrialen Ribosomen war salzsensitiv, da in Puffern mit 150 mM KCl das markierte Protein nicht mit den Ribosomen fraktionierte. Der partielle Verdau mitochondrialer Ribosomen mit aufsteigenden Konzentrationen von RNase führte zu einer Reduzierung des Signals in den ribosomalen Fraktionen (Abb. 3.1.6 Mitte), wobei sich die im Sediment gefundene Menge des ribosomalen Proteine Mrp136 nur unwesentlich verringerte (nicht gezeigt). Daraus kann man schließen, dass der C-Terminus von Oxa1 alleine in der Lage ist, an mitochondriale Ribosomen zu binden. Um die Spezifität der Interaktion zu überprüfen, wurde ein *E. coli*-Zelllysat verwendet. Falls die Interaktion spezifisch mit mitochondrialen Ribosomen abläuft, sollte der radioaktiv markierte C-Terminus von Oxa1 nicht mit bakteriellen Ribosomen interagieren. Dies war der Fall, da nur kleine Mengen des Fusionsproteins in der ribosomalen Fraktion wieder gefunden werden konnten (Abb. 3.1.6 rechts).

### **3.1.7 Die mitochondriale Translationsmaschinerie bindet die Translokationskomponente Oxa1**

Oxa1 ist die erste identifizierte Komponente eines Insertionsmechanismus, durch den mitochondrial kodierte Membranproteine ko-translational in die Innenmembran eingebaut werden. Um die Translation an die Insertion zu koppeln, interagiert Oxa1 über die C-terminale Domäne mit den mitochondrialen Ribosomen. Fehlt diese Domäne, so ist die Biogenese der mitochondrialen Atmungskette stark eingeschränkt. Zusätzlich ist der C-Terminus hinreichend und notwendig, damit Oxa1 mit mitochondrialen Ribosomen und neusynthetisierten Substratproteinen interagieren kann. Dieser Mechanismus erlaubt die ko-translationale Insertion mitochondrialer Translationsprodukte auch in der Abwesenheit eines SRP.

### 3.2 Bakterielle und mitochondriale Mitglieder der Oxa1/YidC-Familie sind funktionell austauschbar

Mitglieder der Oxa1/YidC-Familie besitzen charakteristischerweise einen hydrophoben Bereich, der fünf Transmembrandomänen umfasst. Dieser Kernbereich wird von nichthomologen Bereichen begrenzt. So besitzen zum Beispiel bakterielle YidC-Proteine typischerweise eine zusätzliche Transmembrandomäne im N-Terminus, welche für deren Sortierung in die Innenmembran wichtig ist. Mitochondriale Oxa1-Proteine hingegen besitzen am N-Terminus eine Domäne, welche ein mitochondriales Sortierungssignal darstellt. Darüber hinaus besitzen Oxa1-Proteine eine C-terminale Domäne, welche als Ribosomen-Bindedomäne fungiert, und nicht in den bakteriellen Homologen vorhanden ist.



**Abbildung 3.2 Topologievergleich von Oxa1- und YidC-Proteinen**

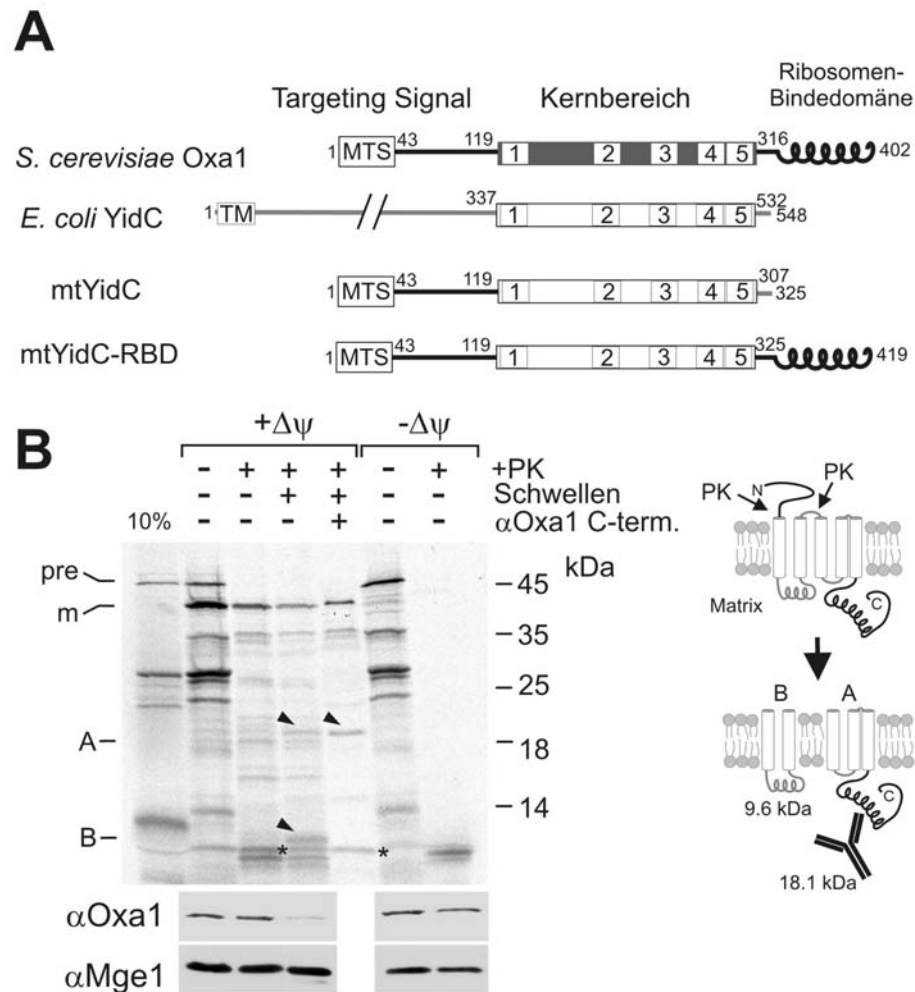
**A** Schematische Darstellung von mitochondrialen Oxa1 und bakteriellen YidC. Die Positionen der fünf konservierten Transmembranhelizes und die mitochondrialen Sortierungssignale (MSS; Oxa1-Proteine) bzw. die N-terminale Transmembransegmente (TM; YidC-Proteine) sind dargestellt. Die C-terminalen *coiled-coil*-Domänen der Oxa1-Proteine sind als Helizes dargestellt. **B** Ein Modell der Topologie von Oxa1 und YidC. Der konservierte Kernbereich ist in der Membran auf gleiche Weise orientiert.

Trotz der offensichtlichen Ähnlichkeiten in Sekundärstruktur und Topologie zeigen selbst die Primärsequenzen des konservierten Kernbereichs nur wenige konservierte Aminosäuren und die Sequenzähnlichkeiten zwischen bakteriellen und mitochondrialen Mitgliedern der Oxa1/YidC-Familie bewegen sich zwischen 15 und 20 Prozent.

### 3.2.1 Der konservierte Kernbereich von YidC kann *in vitro* in Mitochondrien importiert werden

Um zu testen, ob YidC und Oxa1 trotz ihrer geringen Sequenzidentität funktionell konserviert sind, wurde ein genetischer Komplementationversuch unternommen. Dazu wurden zwei unterschiedliche Fusionsproteine konstruiert (Abb. 3.2.1 A). Erstens wurde der N-Terminus von Oxa1 an den konservierten Kernbereich von YidC fusioniert. Dieses Protein ist im Folgenden als mitochondriales YidC (mtYidC) bezeichnet. Im zweiten Fall wurde zusätzlich zum N-Terminus auch die C-terminale Ribosomenbindungsdomäne von Oxa1 an den Kernbereich von YidC fusioniert (mtYidC-RBD). Da der konservierte Kernbereich von YidC erheblich hydrophober ist als der von Oxa1, wurde zuerst überprüft, ob das Fusionsprotein mtYidC-RBD in isolierte Mitochondrien importiert werden kann (Abb. 3.2.1 A).

Dazu wurde das Protein *in vitro* in der Anwesenheit von  $^{35}\text{S}$ -Methionin translatiert. Dann wurde das radioaktiv markierte Protein mit isolierten und energetisierten Mitochondrien inkubiert. Während der Inkubation wurde die Vorläuferform zur proteolytisch gereiften Form umgewandelt. Dieses konnte nicht durch eine von außen zugegebene Protease abgedaut werden, befand sich also in der Matrix. In Mitoplasten jedoch konnte ein Teil des Proteins proteolytisch zu zwei Fragmenten abgebaut werden. Die Massen dieser Fragmente passten zu den erwarteten Fragmenten von korrekt inseriertem mtYidC-RBD. Das größere Fragment konnte durch einen gegen den C-Terminus von Oxa1 gerichteten Antikörper gefällt werden, was die richtige Lokalisierung der Domäne zeigt. Dies zeigt, dass das mtYidC-RBD-Protein in Hefemitochondrien importiert und korrekt in die Innenmembran inseriert wird. Es folgt dabei, wie Oxa1, dem Weg der konservativen Sortierung durch die Matrix.



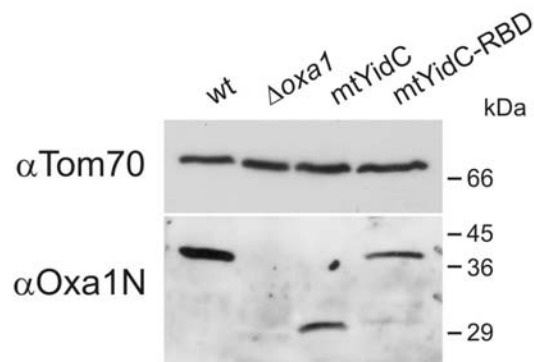
**Abbildung 3.2.1 Der konservierte Kernbereich von YidC kann in Mitochondrien importiert werden.**

**A** Schematische Darstellung von Oxa1, YidC, mtYidC und mtYidC-RBD

**B** mtYidC-RBD kann in isolierte Mitochondrien importiert werden. Der Vorläufer von YidC-RBD wurde mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Der Ansatz wurde geteilt. Ein Viertel blieb unbehandelt, ein Viertel mit Proteinase K behandelt und der Rest durch hypotones Schwellen zu Mitoplasten umgewandelt und ebenso mit Proteinase K behandelt. Letzterer Ansatz wurde noch einmal geteilt und eine Hälfte für eine Immunfällung mit Oxa1-RBD-spezifischen Antikörpern verwendet. Für die rechten Spuren ( $-\Delta\psi$ ) wurde das mitochondriale Membranpotential vor der Inkubation mit mtYidC-RBD-Vorläuferproteinen durch die Zugabe von Valinomycin zerstört. Die Positionen des Molekulargewichtsstandards, der Vorläuferform (pre) und des maturierten Proteins (m) sind dargestellt. Pfeile zeigen proteolytische Fragmente von mtYidC-RBD (A und B, siehe auch Skizze rechts). Um die Effizienz des Schwellens zu prüfen, wurde die Nitrocellulosemembran mit Antikörpern dekoriert, die für das Matrixprotein Mge1 oder für den im Intermembranraum lokalisierten N-Terminus von Oxa1 spezifisch waren.

### 3.2.2 Der konservierte Kernbereich von YidC kann *in vivo* in Mitochondrien importiert werden

Als nächstes wurden beide Fusionsproteine in einem  $\Delta$ Oxa1-Stamm unter Kontrolle des Promotors von Oxa1 exprimiert.



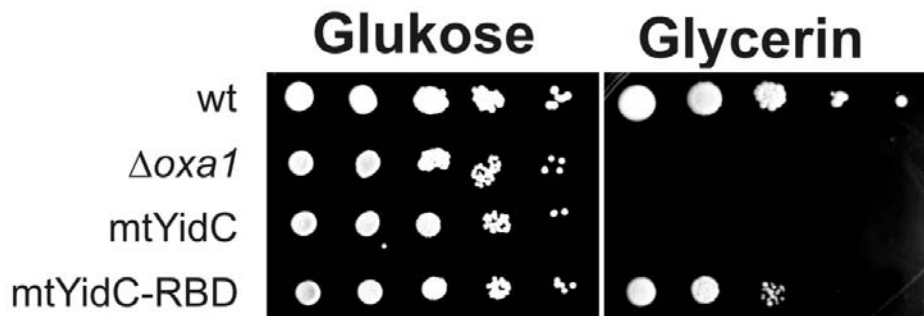
#### Abbildung 3.2.2 Der konservierte Kernbereich von YidC kann *in vivo* in Mitochondrien importiert werden

Expression von mtYidC und mtYidC-RBD führt zur Anhäufung der Proteine in isolierten Mitochondrien. Isolierte Mitochondrien wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Dazu wurde die Membran mit Antikörpern gegen den N-Terminus von Oxa1 dekoriert. Die Signale von Tom70 dienen als Ladekontrolle.

In isolierten Mitochondrien dieser Stämme konnten über Western Blot-Analyse mit einem Antikörper gegen den N-Terminus von Oxa1 beide Fusionsproteine nachgewiesen werden (Abb. 3.2.2). Diese zeigten die erwarteten Molekulargewichte und lagen in nur wenig verminderter Menge als Oxa1 in Wildtyp-Mitochondrien vor. MtYidC und mtYidC-RBD können also trotz ihrer erhöhten Hydrophobizität auch *in vivo* in Mitochondrien importiert werden.

### 3.2.3 Nur die Expression von mtYidC-RBD komplementiert eine Oxa1-Deletion

Um zu untersuchen, ob die Fusionsproteine die Funktion von Oxa1 ersetzen können, wurde zusammen mit Marc Preuss der Wachstumsphänotyp der einzelnen Stämme untersucht.



#### Abbildung 3.2.3 Nur die Expression von mtYidC-RBD komplementiert eine Oxa1-Deletion

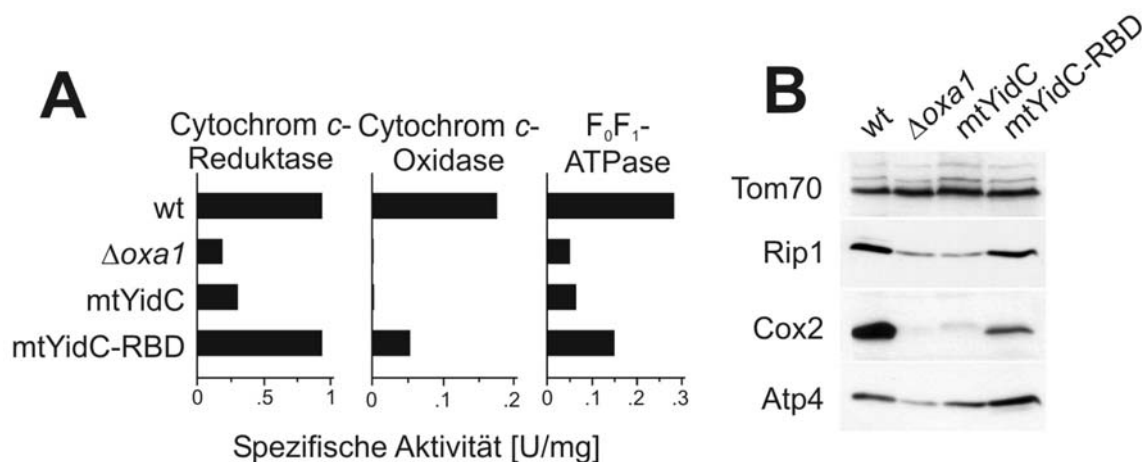
Wildtyp-Hefezellen oder  $\Delta Oxa1$ -Hefezellen, die entweder mit leerem Vektor pRS426 oder mit den Expressionsplasmiden für mtYidC und mtYidC-RBD transformiert wurden, wurden in serieller Verdünnung auf YP-Platten mit 2% Glukose oder mit 2% Glycerin aufgetragen und 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Auf der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose konnten alle Stämme gleichermaßen wachsen, auf der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin hingegen konnten nur der Wildtyp-Stamm und der  $\Delta Oxa1$ -Stamm, welcher mtYidC-RBD exprimiert, wachsen (Abb. 3.2.3). Wenn mtYidC von einem Überexpressionsplasmid exprimiert wurde, dann konnte ebenso keine Komplementation von Oxa1 festgestellt werden (nicht gezeigt). Die geringeren Mengen von mtYidC im Vergleich zu Oxa1 sind deswegen nicht der Grund für das Unvermögen von mtYidC, Oxa1 zu komplementieren. Daraus kann man schließen, dass mtYidC nur dann Oxa1 ersetzen kann, wenn die Ribosomenbindestelle von Oxa1 C-terminal angefügt wird.



### 3.2.4 Die Expression von mtYidC-RBD in einem $\Delta$ Oxa1-Stamm führt zu einer teilweisen Wiederherstellung der Atmungskette

Der Befund, dass mtYidC-RBD Oxa1 ersetzen kann, zeigte sich auch in den Enzymaktivitäten der Atmungskettenkomplexe (Abb. 3.2.4 A). Die Deletion von Oxa1 führt zu stark reduzierten Aktivitäten der Cytochrom *c*-Reduktase und der  $F_1F_0$ -ATPase. Die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase in  $\Delta$ Oxa1-Mitochondrien war nicht mehr detektierbar. Expression von mtYidC konnte diese Defekte nicht bzw. kaum nicht ändern. Im Gegensatz dazu stellte die Expression von mtYidC-RBD die Enzymaktivitäten aller drei Atmungskettenkomplexe weitgehend wieder her. Konsistent damit konnten auch größere *steady-state* Mengen an Untereinheiten der Atmungskette gefunden werden (Abb. 3.2.4 B), welche in  $\Delta$ Oxa1-Mitochondrien instabil sind und abgebaut werden. Selbst das strikt Oxa1-abhängige Protein Cox2 wurde teilweise stabilisiert, auch wenn die Mengen nicht die von Wildtyp-Mitochondrien erreichten.



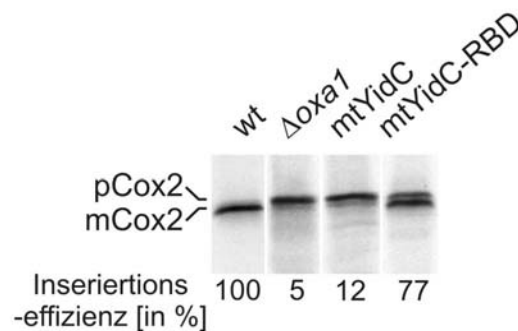
**Abbildung 3.2.4 Die Expression von mtYidC-RBD in einem  $\Delta$ Oxa1-Stamm führt zu einer teilweisen Wiederherstellung der Atmungskette**

**A** Die spezifische Aktivität von Cytochrom *c*-Reduktase, Cytochrom *c*-Oxidase und  $F_1F_0$ -ATPase isolierten Mitochondrien wurde gemessen.

**B** Mitochondriales Protein wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Western Blot auf die Menge der aufgeführten Proteine untersucht. Tom70, eine Untereinheit des TOM-Komplexes, diente als Ladekontrolle.

### 3.2.5 Die Komplementation von Oxa1 durch mtYidC-RBD führt zu einer teilweisen Insertion von Cox2

Um die Biogenese von Cox2 detaillierter zu untersuchen, wurden zusammen mit Marc Preuss Translationsprodukte in isolierten Mitochondrien mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und das synthetisierte Cox2-Protein einer Immunfällung unterzogen (Abb. 3.2.5). In Wildtyp-Mitochondrien wurde Cox2 effizient transloziert und von der Intermembranraumprotease Imp1 prozessiert, so dass vornehmlich reifes Cox2 gefunden wurde. In  $\Delta\text{Oxa1}$ -Mitochondrien hingegen häufte sich das Vorläuferprotein an, was den Translokationsdefekt der Mutante zeigt. Expression von mtYidC konnte den Defekt nicht beheben. In Mitochondrien des mtYidC-RBD-Stammes jedoch wurde Cox2 wenigstens teilweise maturiert. Zusammenfassend kann man feststellen, dass YidC nur dann Oxa1 funktionell ersetzen kann, wenn es mit der Ribosomenbindestelle von Oxa1 ausgestattet worden ist.

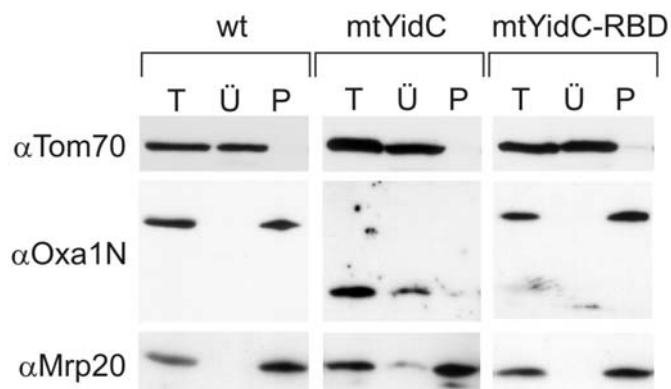


**Abbildung 3.2.5 Die Komplementation von Oxa1 durch mtYidC-RBD führt zu einer teilweisen Insertion von Cox2**

Mitochondriale Translationsprodukte wurden mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und das neusynthetisierte Cox2-Protein wie in 3.1.4 über Immunfällung isoliert. Die Insertionsseffizienz von Cox2 wurde densitometrisch aus dem Verhältnis maturiertes Cox2 (mCox2) zu Cox2-Präprotein (pCox2) bestimmt.

### 3.2.6 Die Ribosomenbindestelle von Oxa1 führt zur Bindung von YidC an mitochondriale Ribosomen

Der beobachtete Translokationsdefekt von Cox2 in mtYidC-Mitochondrien könnte dadurch erklärt werden, dass die mitochondrialen Ribosomen nicht mit mtYidC interagieren können. Um eine direkte Interaktion von Ribosomen und mtYidC zu untersuchen, wurden ribosomale Fraktionen aus isolierten Mitochondrien gewonnen.



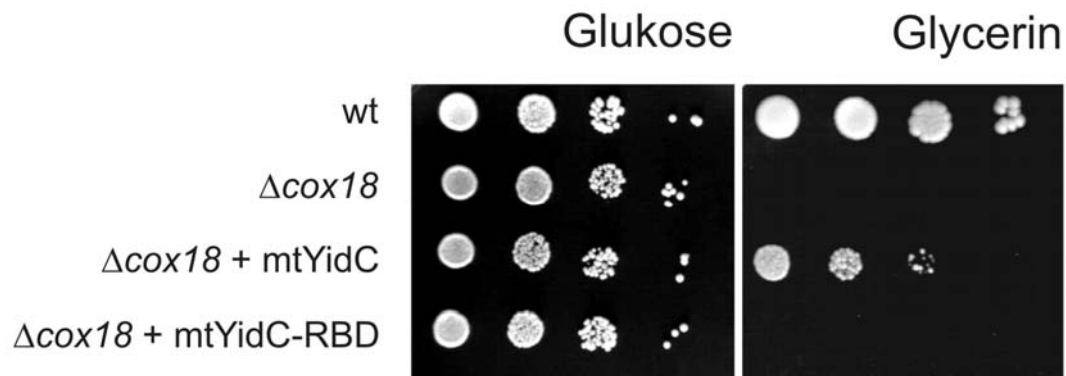
#### Abbildung 3.2.6 Die Ribosomenbindestelle von Oxa1 führt zur Bindung von YidC an mitochondriale Ribosomen

Mitochondrien der unterschiedlichen Stämme wurden mit Triton X-100 lysiert, der Ansatz halbiert und Proteine der einen Hälfte mit 12%TCA gefällt (T). Die andere Hälfte wurde durch Zentrifugation in eine ribosomale Fraktion (P) und eine nicht ribosomale Fraktion (der Überstand = Ü) getrennt. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Fraktionen mittels Western Blot mit Antikörpern gegen den N-Terminus von Oxa1, das ribosomale Protein Mrp20 und das Membranprotein Tom70 analysiert.

Dazu wurden die Mitochondrien lysiert und die Extrakte auf ein hochdichtes Saccharosekissen aufgetragen. Die Ansätze wurden zentrifugiert und die Verteilung von Oxa1, mtYidC und mtYidC-RBD über Western Blot-Analyse verfolgt (Abb. 3.2.6). In Wildtyp-Mitochondrien wurde alles Oxa1 in dem Ribosomensediment gefunden und andere Markerproteine, wie Tom70, im Überstand. In mtYidC-Mitochondrien konnte das mtYidC-Protein ausschließlich im Überstand gefunden werden, was dafür spricht, dass mtYidC keine oder nur sehr geringe Affinität zu mitochondrialen Ribosomen besitzt. Im Gegensatz dazu konnte mtYidC-RBD quantitativ in der ribosomalen Fraktion gefunden werden. Das zeigt, dass mtYidC nicht mit Ribosomen interagieren kann. Um sowohl physikalisch als auch funktionell mit der mitochondrialen Translationsmaschinerie zu interagieren, muss mtYidC mit der Ribosomenbindedomäne von Oxa1 ausgestattet werden.

### 3.2.7 Nur die Expression von mtYidC-RBD komplementiert eine Cox18-Deletion

Die mitochondriale Innenmembran beherbergt neben Oxa1 ein zweites Protein der Oxa1/YidC-Familie, das Cox18/Oxa2-Protein. Cox18/Oxa2-Proteinen fehlen C-terminale Ribosomenbindestellen und sie haben eine spezielle Funktion in der Biogenese der Cytochrom *c*-Oxidase.



**Abbildung 3.2.7 Nur die Expression von mtYidC-RBD komplementiert eine Cox18-Deletion**

Die Fähigkeit, auf einer fermentierbaren (Glukose) oder nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle (Glycerin) zu wachsen wurde für Wildtypzellen oder für  $\Delta\text{Cox18}$  Stämme, welche mtYidC oder mtYidC-RBD exprimierten, für 3 Tage bei 30°C getestet.

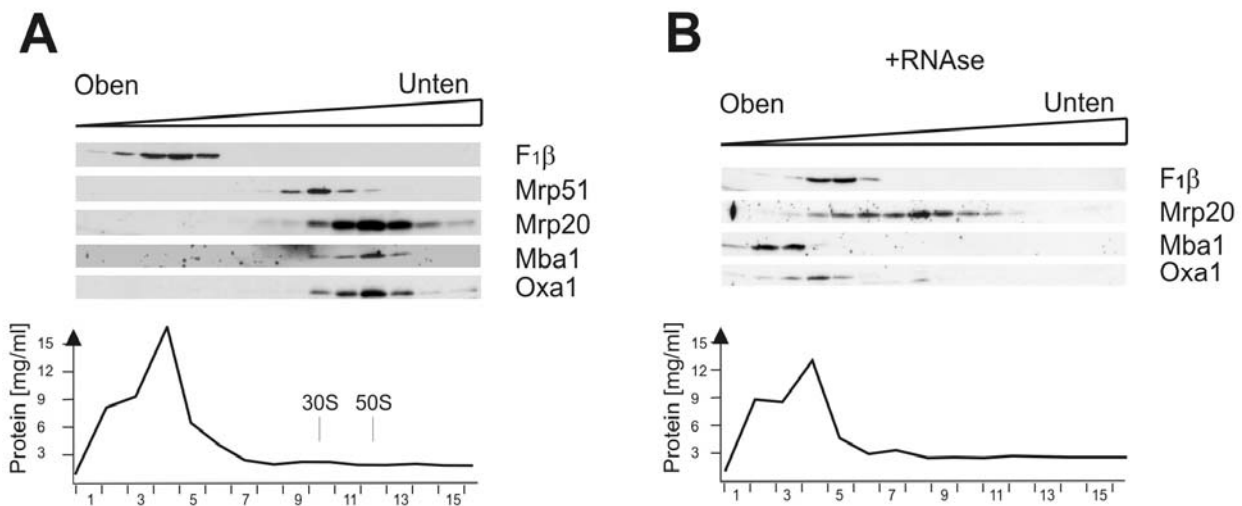
Um zu testen, ob YidC die Funktion von Cox18 übernehmen kann, wurden durch Soledad Funes die mitochondrialen Versionen von YidC in Hefen exprimiert, in denen Cox18 deletiert war. Es zeigte sich, dass nur mtYidC den Wachstumsdefekt von  $\Delta\text{Cox18}$  auf der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin mildern konnte (Abb. 3.2.7). Erstaunlicherweise führte die Fusion der Ribosomenbindestelle von Oxa1 an mtYidC dazu, dass keine Komplementation beobachtet werden konnte. Der Kontakt von YidC zu den mitochondrialen Ribosomen war eine Bedingung für die Komplementation von Oxa1, dieser Kontakt verhinderte gleichzeitig die Komplementation von Cox18.

### 3.3 Charakterisierung von Mba1

Mba1 ist ein peripheres Membranprotein der Matrix und interagiert transient mit mitochondrial kodierten Proteinen während deren Insertion in die Innenmembran. Die funktionelle Relevanz dieser Interaktion ist nicht verstanden. Aufgrund seiner Topologie könnte es ein möglicher Faktor für die Organisation der ko-translationalen Insertion mitochondrial kodierter Proteine sein.

#### 3.3.1 Mba1 ist spezifisch mit der großen Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms assoziiert

Um zu untersuchen, ob Mba1 mit der mitochondrialen Translationsmaschinerie interagiert, wurden isolierte Wildtyp-Mitochondrien schonend lysiert und das entstandene Lysat auf einen linearen Saccharosegradienten aufgetragen. Nach einer Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert und mittels Western Blot auf die Verteilung von F<sub>1</sub>β (Untereinheit der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase), Mba1, Oxa1, Mrp20 (große Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms) und Mrp51 (kleine Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms) untersucht (Abb. 3.3.1 A).



**Abbildung 3.3.1 Mba1 ist spezifisch mit der großen Untereinheit des mitochondrialen Ribosoms assoziiert.**

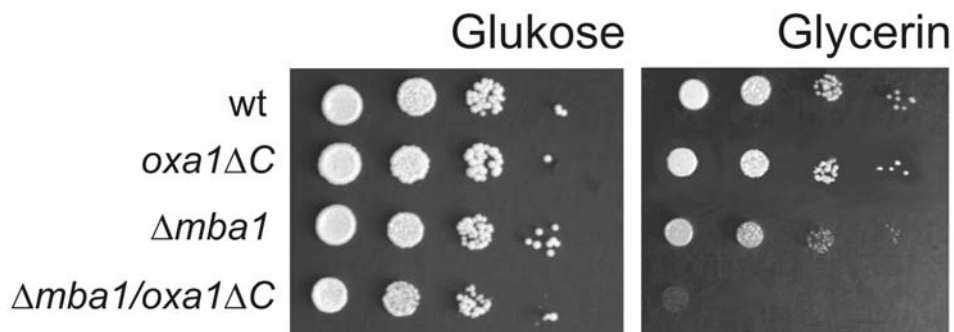
**A** Isolierte Wildtyp-Mitochondrien wurden mit 1% DDM lysiert und auf einen linearen Saccharosegradienten aufgetragen (0,3-1 M Saccharose). Nach Zentrifugation wurde der Gradient fraktioniert, die Fraktionen mit 12% TCA präzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Verteilung der angegebenen Proteine wurde mittels Western Blot analysiert.

**B** Lysierte Mitochondrien wurden vor der Gradientenzentrifugation für 1 h bei 4°C mit 40 U/ml RNase behandelt.

Unter diesen Bedingungen zerfällt das Ribosom in die große und kleine Untereinheit. Mba1 fraktionierte ausschließlich mit der großen ribosomalen Untereinheit und nicht mit der kleinen Untereinheit, die langsamer sedimentierte. Oxa1 ko-migrierte ebenso mit der großen Untereinheit. Der Großteil des mitochondrialen Proteins blieb, wie F1 $\beta$ , in den oberen Fraktionen des Gradienten. Um die Spezifität der Interaktion von Mba1 mit dem Ribosom zu untersuchen, wurde ein mitochondriales Lysat mit RNase behandelt, um das mitochondriale Ribosom partiell zu verdauen. Die Behandlung der Ribosomen mit RNase führte zu einer partiellen Dissoziation des Ribosoms, wodurch sich die Wanderungsgeschwindigkeit im Gradienten verkleinerte (Abb. 3.3.1 B). Mba1 und Oxa1 waren unter diesen Bedingungen nicht mehr an Ribosomen gebunden und blieben mit dem Großteil des mitochondrialen Proteins wie z.B. F1 $\beta$  im oberen Teil des Gradienten. Das zeigt, dass Mba1 spezifisch mit der großen Untereinheit des Ribosoms interagieren kann. Da neusynthetisierte Proteine aus dem *polypeptide exit tunnel* der großen Untereinheit ko-translational in die Innenmembran integriert werden müssen, sollten Proteine, die in diesem Schritt eine Rolle spielen, spezifisch mit der großen Untereinheit interagieren. Dies ist der Fall für Oxa1 und Mba1.

### **3.3.2 $\Delta mba1$ und $oxa1\Delta C$ zeigen einen synthetischen Wachstumsdefekt**

Um zu untersuchen, ob die C-terminale Ribosomebindestelle von Oxa1 und Mba1 eine überlappende Funktion besitzen, wurde ein Hefestamm erzeugt, der zusätzlich zu der partiellen Deletion des C-Terminus von Oxa1 ( $Oxa1\Delta C$ ) auch in Mba1 deletiert war. Die Stämme wurden auf ihren Wachstumsphänotyp untersucht. Auf der fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glukose konnten alle Stämme gleichermaßen gut wachsen (Abb. 3.3.2 links). Auf der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin hingegen konnte der Wildtyp- und  $Oxa1\Delta C$ -Stamm in ähnlichem Umfang wachsen, die  $\Delta mba1$ -Mutante zeigte nur mehr schwaches Wachstum (Abb. 3.3.2 rechts). Die Doppelmutante  $Oxa1\Delta C/\Delta Mba1$  konnte nicht mehr auf der nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen. Die Doppeldeletion zerstörte demnach eine gemeinsame Funktion von Oxa1 und Mba1, welche für das Wachstum auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle unabdingbar ist. Die Bindung des C-Terminus von Oxa1 und Mba1 an Ribosomen legt nahe, dass beide Proteine eine gemeinsame Rolle in der Membranassoziation mitochondrialer Ribosomen spielen.



### Abbildung 3.3.2 $\Delta mba1$ und *oxa1ΔC* zeigen einen synthetischen Wachstumsdefekt

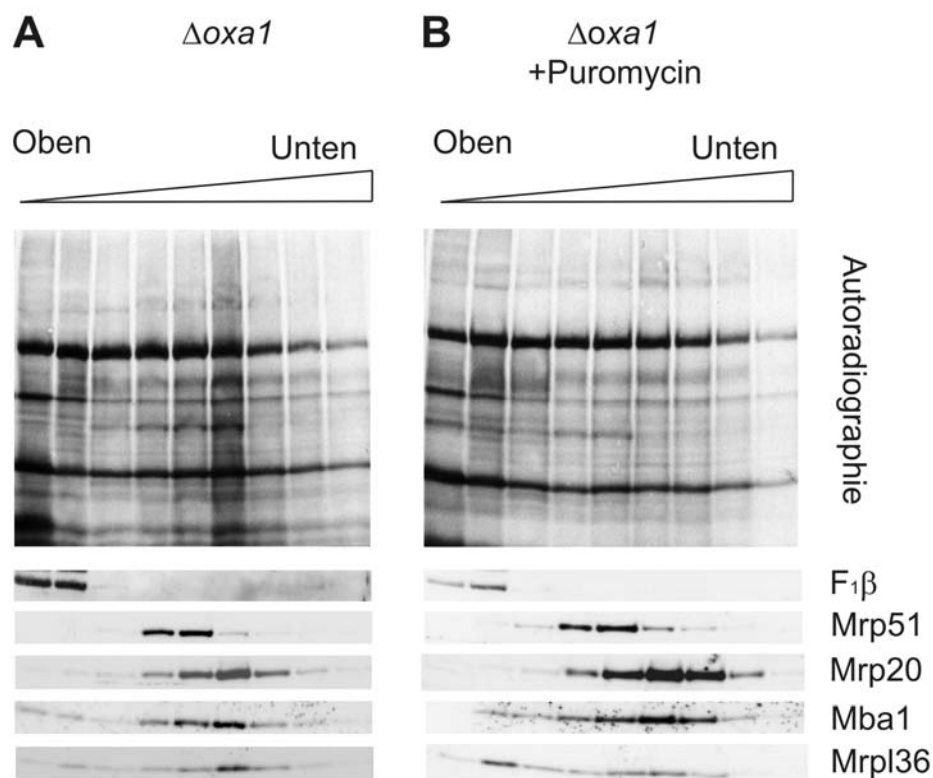
Es wurden wt-Zellen oder Zellen der angegebenen Mutanten in YPD kultiviert. In serieller 10-facher Verdünnung wurden die Zellen dann auf YP-Platten mit 2% Glukose oder 3% Glycerin aufgetragen und bei 30°C für zwei (Glukose) bzw. drei (Glycerin) Tage inkubiert.

### 3.3.3 Die Interaktion von Mba1 mit dem Ribosom benötigt weder Oxa1 noch naszierende Ketten

Die ko-translationale Insertion von Proteinen ist ein aufwändiger Prozess, bei dem Translation an die Membranintegration gekoppelt sein muß. Es könnte sein, dass Mba1 nur dann mit Ribosomen interagiert, wenn naszierende Ketten aus dem *ribosom exit tunnel* ragen, welche dann zur Translokase geführt werden müssen, um dort inseriert zu werden. In solch einem Falle sollte die Interaktion nur mit aktiven Ribosomen stattfinden. Des Weiteren könnte die Anwesenheit von Oxa1 als Translokationskomponente eine Bedingung für die Interaktion zwischen Mba1 und dem Ribosom sein.

Um dies zu untersuchen, wurden Translationsprodukte isolierter  $\Delta Oxa1$ -Mitochondrien mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Der Ansatz wurde geteilt, die eine Hälfte mit Puromycin behandelt, um naszierende Ketten vom Ribosom abzulösen, und beide Lysate auf einen linearen Sacchrosegradienten geladen. Nach Zentrifugation wurden die Fraktionen auf die Verteilung von F1 $\beta$ , Mrp51, Mrp20, Mba1 und Mrpl36 mittels Western Blot untersucht (Abb. 3.3.3 A und B unten). Die Verteilung mitochondrialer Translationsprodukte wurde über Autoradiographie verfolgt (Abb. 3.3.3 A und B oben). Mba1 wanderte, wie zuvor auch, mit der großen Untereinheit des Ribosoms, wohingegen der Großteil des mitochondrialen Proteins, wie F1 $\beta$ , im oberen Teil des Gradienten gefunden wurde. In der Autoradiographie lässt sich ein charakteristisches diffuses Muster naszierender Ketten in der Position finden, in der sich auch die große ribosomale Untereinheit befindet (Abb. 3.3.3 A). Durch Puromycin-Behandlung können diese vom Ribosom

abgelöst werden (Abb. 3.3.3 B). Dies führte zu einer Verschiebung des Signals des Mrpl36-Proteins in die oberen Fraktionen des Gradienten. Welche Signifikanz dieser Befund hat, ist zurzeit noch unbekannt. Mrpl36 ist mit der großen Untereinheit des Ribosoms assoziiert und weist Ähnlichkeiten zu der Proteinkomponente des bakteriellen SRP auf (Williams et al., 2004). Die Puromycin-Behandlung konnte die Bindung von Mba1 an die große Untereinheit des Ribosoms nicht beeinflussen. Mba1 interagiert somit unabhängig von Oxa1 und von naszierenden Ketten mit der mitochondrialen Translationsmaschinerie.



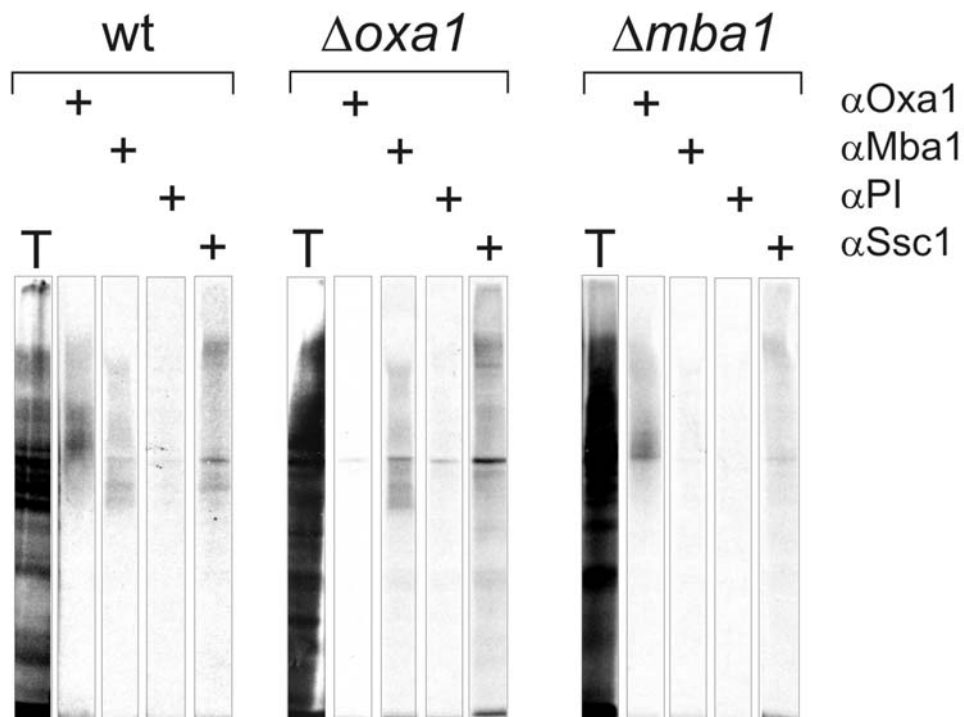
**Abbildung 3.3.3 Die Interaktion von Mba1 mit dem Ribosom benötigt weder Oxa1 noch naszierende Ketten**

Translationsprodukte isolierter  $\Delta Oxa1$ -Mitochondrien wurden radioaktiv markiert. Die Reaktion wurde geteilt, die eine Hälfte belassen (**A**) und die andere Hälfte (**B**) mit Puromycin behandelt, um naszierende Polypeptidketten von den Ribosomen abzulösen. Dann wurden die Mitochondrien beider Ansätze reisoliert und schonend lysiert. Das entstandene Lysat wurde auf einen linearen Saccharose-Gradienten aufgetragen und einer Zentrifugation unterzogen. Die Gradienten wurden fraktioniert, Proteine der Fraktionen mit TCA gefällt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Verteilung von F<sub>1</sub>β, den ribosomalen Proteinen Mrp51, Mrpl36 und Mrp20, von Mba1 und von Oxa1 wurde mittels Western Blot analysiert. Die Autoradiographie zeigt, dass die diffusen Banden, welche charakteristisch für naszierende Ketten sind, mit der großen ribosomalen Untereinheit migrieren. Durch Puromycinbehandlung können diese von den Ribosomen abgelöst werden.



### 3.3.4 Die Interaktion von Oxa1 und Mba1 mit naszierenden Polypeptiden geschieht unabhängig von der jeweils anderen Komponente

Beeinflussen sich Oxa1 und Mba1 gegenseitig bei der Interaktion mit mitochondrial kodierten Proteinen? Um diese Frage zu klären, wurde ein chemischer Quervernetzungsansatz gewählt, bei dem radioaktiv markierte Translationsprodukte mit dem Quervernetzungsreagens DFDNB kovalent an benachbarte Proteine verknüpft werden und mittels Immunfällung mit Antikörpern gegen diese Proteine angereichert werden können.



**Abbildung 3.3.4 Die Interaktion von Oxa1 und Mba1 mit naszierenden Polypeptiden geschieht unabhängig von der jeweils anderen Komponente**

Translationsprodukte isolierter Mitochondrien der unterschiedlichen Stämme wurden mit  $^{35}S$ -Methionin markiert und für 30 min bei 25°C mit dem Quervernetzungsreagens DFDNB inkubiert. Überschüssiges Quervernetzungsreagens wurde durch Zugabe von 0,2M Glyzin abgefangen. Die Mitochondrien wurden reisoliert, in 1% SDS lysiert und für eine Immunfällung mit den angegebenen Antikörpern, oder Preimmunserum (PI) als Negativkontrolle, verwendet. Je 5% des gesamten Lysates wurden zusätzlich aufgetragen (T).

In Wildtyp-Mitochondrien konnten mit Antikörpern gegen Oxa1, Mba1 und Ssc1, dem mitochondrialen Hsp70-Protein, radioaktive Signale gefunden werden (Abb. 3.3.4 links). Diese wiesen eine für naszierende Ketten typische diffuse Größenverteilung auf. Nichtreaktives

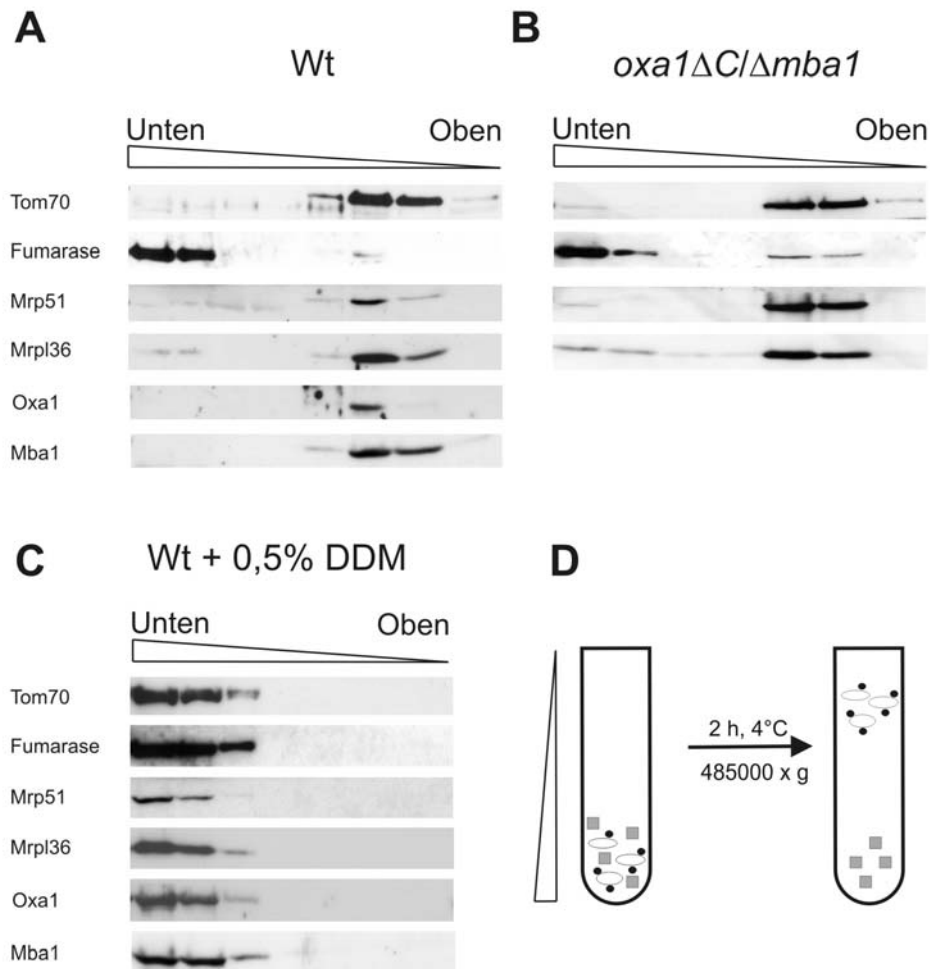
Präimmunserum lieferte keine Signale. Wurde die Immunfällung mit einem Lysat von  $\Delta$ Oxa1-Mitochondrien durchgeführt, konnten naszierende Ketten im Kontakt mit Mba1 und Ssc1, nicht aber mit Oxa1 nachgewiesen werden (Abb. 3.3.4 Mitte). Auch im Falle der  $\Delta$ Mba1-Mitochondrien konnten mit Oxa1 und Ssc1 naszierende Ketten angereichert werden. Dies gelang nicht mit Mba1-spezifischen Antikörpern oder mit Preimmunserum (Abb. 3.3.4 rechts). Dies zeigt, dass Mba1 unabhängig von Oxa1 mit mitochondrialen Translationsprodukten interagieren kann und umgekehrt

### **3.3.5 Auch ohne Mba1 und Oxa1 bleiben mitochondriale Ribosomen Membran-assoziiert**

Sowohl Oxa1 als auch Mba1 interagieren mit mitochondrialen Ribosomen und könnten somit für die Lokalisierung der Ribosomen an die Innenmembran verantwortlich sein.

Um dies genauer zu untersuchen, wurden isolierte Mitochondrien durch Beschallen desintegriert und einer Flotationsanalyse unterzogen. Es zeigte sich, dass bei Salzkonzentrationen, welche die Interaktion von Oxa1 und Mba1 mit dem Ribosom verhindern, beide Untereinheiten des Ribosoms mit den Membranproteinen fraktionierten und sich somit von den löslichen Proteinen abtrennen ließen (Abb. 3.3.5 A). Eine ähnliche Situation ergab sich, wenn Mitochondrien verwendet wurden, in denen der C-Terminus von Oxa1 und Mba1 deletiert war. Auch hier flotierten die Ribosomen mit den Membranen und konnten so von den löslichen Proteinen getrennt werden (Abb. 3.3.5 B). Diese Interaktion war sehr fest und es gelang weder durch Salz-Behandlung (bis 600 mM KCl) noch durch Puromycin-Behandlung, die Ribosomen von der Membran zu lösen. Wurden die mitochondrialen Membranen durch Inkubation mit 0,5% DDM lysiert, verblieben alle Proteine im unteren Teil des Gradienten (Abb. 3.3.5 C).

Mitochondriale Ribosomen interagieren somit unabhängig von Mba1 und vom C-Terminus von Oxa1 mit der mitochondrialen Innenmembran. Welche Proteine diese Interaktion bewerkstelligen, ist bis heute nicht bekannt. Zwei ribosomale Untereinheiten, welche eine gewisse Wahrscheinlichkeit zeigen, Transmembrandomänen zu bilden, wurden im Rahmen dieser Arbeit auf eine mögliche Membranlokalisierung hin untersucht. Sowohl Ppe1 als auch Mrpl4 inserierten nicht in die Innenmembran (nicht gezeigt).



### Abbildung 3.3.5 Auch ohne Mba1 und Oxa1 bleiben mitochondriale Ribosomen Membran-assoziiert

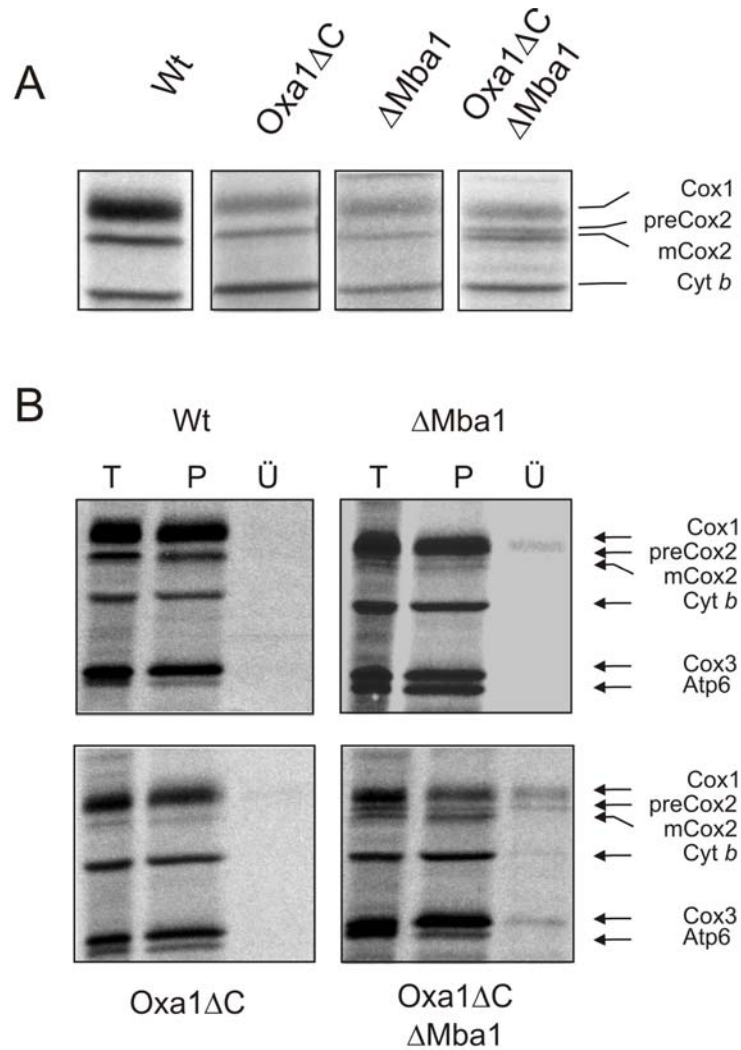
Isolierte Wildtyp- (A) und *Oxa1ΔC/ΔMba1*-Mitochondrien (B) wurden in Puffern mit 150 mM KCl beschallt. Danach wurden die Ansätze mit hochmolarer Saccharose versetzt und unter einen Stufengradienten aus Saccharose gebracht. Die Gradienten wurden nach der Zentrifugation fraktioniert, Proteine der Fraktionen mit TCA gefällt und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Mittels Western Blot wurde die Verteilung von Tom70 und Oxa1 (Membranproteine), von Fumarase (lösliches Matrixprotein) und von Mrpl36 und Mrp51 ermittelt.

C Wildtyp-Mitochondrien wurden vor der Gradientenzentrifugation in 0,5% DDM lysiert.

D Prinzip des Experiments: Durch die unterschiedlichen Dichten flotieren Membranpartikel im Laufe der Zentrifugation nach oben, wo sie sich in der Saccharosekonzentration anreichern, die der eigenen Dichte entspricht. Proteine, welche nicht mit Membranen assoziiert sind, bleiben im Gradienten unten.

### **3.3.6 Mitochondrien ohne Mba1 und den C-Terminus von Oxa1 zeigen einen starken Insertionsdefekt**

Um zu untersuchen, ob die ko-translationale Insertion durch die Deletionen von Mba1 und/oder des C-Terminus von Oxa1 beeinträchtigt ist, wurden Translationsprodukte isolierter Mitochondrien mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert. Es zeigte sich, dass spezifisch in den Mitochondrien des Oxa1 $\Delta$ C/ $\Delta$ Mba1-Stammes Cox2-Vorläuferprotein angehäuft wurde (Abb. 3.3.6 A). Dies war nicht der Fall in den jeweiligen Einzelmutanten. Erst die kombinierte Deletion von Mba1 und des C-Terminus von Oxa1 führen zu einem Insertionsdefekt mitochondrial kodierter Proteine. Um diesen Insertionsdefekt genauer zu charakterisieren, wurden isolierte Mitochondrien nach *in organello* Translation in Gegenwart von  $^{35}\text{S}$ -Methionin durch Natriumcarbonat-Behandlung fraktioniert. Mit Hilfe dieser Methode können lösliche und periphere Membranprotein extrahiert werden und somit auch inserierte Proteine von nicht-inserierten Proteinen getrennt werden. Es zeigte sich, dass nur in Mitochondrien des Oxa1 $\Delta$ C/ $\Delta$ Mba1-Stammes signifikante Mengen der Translationsprodukte in der Fraktion der löslichen Proteine zu finden war (Abb.3.3.6 B). Es handelte sich hierbei um die Proteine Cox1, Cytochrom *b*, Cox3 und das Vorläuferprotein von Cox2. Speziell die Anreicherung des Vorläuferproteins von Cox2 in der löslichen Fraktion unterstützt die Aussage, dass diese Mutante einen Insertionsdefekt hat. Nur geringe Mengen von Cox1 konnten dagegen in den  $\Delta$ Mba1-Mitochondrien in der löslichen Fraktion gefunden werden. Die Doppeldeletion von Mba1 und des C-Terminus führt offensichtlich zu einem Insertionsdefekt mitochondrial kodierter Proteine, der wesentlich stärker ist als in der jeweiligen Einzelmutante. Dem gefundenen Wachstumsdefekt der Doppelmutante liegt demnach wahrscheinlich ein Insertionsdefekt mitochondrialer Translationsprodukte zugrunde, welcher durch eine gestörte Organisation der ko-translationalen Insertion erklärt werden kann. Dies legt den Schluss nahe, dass Mba1 und der C-Terminus von Oxa1 den für die ko-translationale Insertion wichtigen Kontakt zwischen Translations- und Translokationsmaschinerien vermitteln.



**Abb. 3.3.6 Mitochondrien ohne Mba1 und den C-Terminus von Oxa1 zeigen einen starken Insertionsdefekt**

**A** Translationsprodukte isolierter Mitochondrien wurden mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die neusynthetisierten Proteine wurden autoradiographisch detektiert.

**B** Translationsprodukte isolierter Mitochondrien wurden mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin markiert, der Ansatz geteilt und die Mitochondrien reisoliert. Die eine Hälfte wurde belassen (T) und die andere Hälfte durch Natriumcarbonat-Behandlung fraktioniert. Proteine der Membranfraktion (P) und der löslichen Fraktion (Ü) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die markierten Proteine über Autoradiographie detektiert.

## 4. Diskussion

### 4.1 Charakterisierung der C-terminalen Domäne von Oxa1

Die Synthese hydrophober Membranproteine in der hydrophilen Umgebung der Zelle birgt die große Gefahr der irreversiblen Aggregation der gebildeten Polypeptidketten. Um dies zu verhindern, gibt es im Zytosol aller Zellen und im Stroma der Chloroplasten *signal recognition particles* (SRPs), welche spezifisch an naszierende Membranproteine binden und helfen, die Ribosomen samt den neu synthetisierten Polypeptiden an die membranständigen Translokasen zu führen. Dort können die Membranproteine während ihrer Synthese in die Membran eingebaut werden. Dies verhindert, dass die hydrophoben Domänen der Membranproteine dem wässrigen Milieu der Zelle ausgesetzt werden.

Mitochondrien besitzen Membranproteine zweierlei Ursprungs: Der Grossteil der mitochondrialen Innenmembranproteine ist im Kern kodiert und erreicht die Membran, nachdem es über den TOM-Komplex und den TIM23-Komplex in die Matrix importiert wurde. Ein kleiner Teil sehr hydrophober Membranproteine ist jedoch auf der mitochondrialen DNA kodiert. Mitochondrien besitzen kein SRP. Deshalb war es lange Zeit nicht bekannt, wie in Mitochondrien die Kopplung der Translation hydrophober Membranproteine an deren ko-translationale Insertion in die Innenmembran strukturell organisiert ist.

#### 4.1.1 Der C-Terminus von Oxa1 ist notwendig für die Biogenese der Atmungskette

Vor Beginn dieser Arbeit war eine Interaktion von Oxa1 mit naszierenden Ketten mitochondrial kodierter Proteine beschrieben worden (Hell et al., 2001). Oxa1 wurde ursprünglich in einem Screen für Hefemutanten entdeckt, welche eine defekte Atmungskette aufweisen. Es zeigte sich, dass Hefemutanten ohne funktionelles Oxa1-Protein einen starken Defekt in der Biogenese der Cytochrom *c*-Oxidase zeigen (Altamura et al., 1996). Weiterführende Studien bestätigten diesen Befund, wobei dem Oxa1-Protein bald eine Schlüsselrolle im Insertionsprozess mitochondrial kodierter Membranproteine zugesprochen wurde (Hell et al., 2001). Oxa1 besteht aus dem konservierten Kernbereich von fünf Transmembrandomänen, welcher in allen Mitgliedern der Oxa1/YidC-Familie zu finden ist. Darüber hinaus besitzen alle Oxa1-Proteine in Mitochondrien eine große, C-terminale Domäne. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Domäne notwendig für die Biogenese der Atmungskette ist. Wenn diese Domäne deletiert ist,

können Hefen nicht mehr auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen und zeigen einen starken Insertionsdefekt, der für mitochondrial kodierte Proteine spezifisch ist. Diesem lag nicht ein genereller Insertionsdefekt zugrunde, da kernkodierte Proteine, welche die Innenmembran auf dem konservativem Sortierungsweg erreichen, nicht betroffen waren. Was also ist die Funktion dieser Domäne?

#### **4.1.2 Der C-Terminus vermittelt die Bindung von Oxa1 an mitochondriale Ribosomen**

Der C-Terminus von Oxa1 zeigt in allen untersuchten Spezies eine stark positive Nettoladung und hohe Wahrscheinlichkeiten, *coiled-coil* Domänen zu bilden, was durch Gregor Szyrach experimentell bestätigt wurde. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass diese Domäne notwendig und hinreichend ist, um Oxa1 an mitochondriale Ribosomen zu binden. Eine Bindung von Ribosomen an Translokasekomponenten ist also ein konservierter Aspekt der ko-translationalen Proteininsertion und findet sich nicht nur in Bakterien, Chloroplasten und am ER, sondern auch in Mitochondrien.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Oxa1 spezifisch mit der großen Untereinheit des Ribosoms interagiert. Die große Untereinheit des Ribosoms ist der Ort, an dem die ko-translationalen Insertion in pro- und eukaryotischen Systemen reguliert ist. Hierbei spielen vor allem Proteine eine Rolle, welche am *ribosome exit tunnel* lokalisiert sind. Besonders das Protein L23 spielt hier eine Schlüsselrolle. Sowohl *trigger factor*, SRP und SecY binden während unterschiedlicher Stadien des Insertionsprozesses in Bakterien an L23 und sorgen so für einen regulierten Ablauf (Ullers et al., 2003). In einer gleichzeitig mit unserer Studie veröffentlichten Arbeit konnte gezeigt werden, dass Oxa1 in räumlicher Nähe zum mitochondrialen Homolog von L23, dem Mrp20-Protein ist (Jia et al., 2003). Die beobachtete Assoziation war nicht abhängig vom Vorhandensein naszierender Ketten, wie sich dies auch in dieser Arbeit für die Interaktion von Oxa1 mit ganzen Ribosomen zeigte.

Oxa1 interagiert demnach unabhängig von naszierenden Ketten mit mitochondrialen Ribosomen. Der Bindungspartner von Oxa1 auf dem Ribosom ist bis heute nicht identifiziert. Interessanterweise besitzt das Mrp20-Protein eine C-terminale Domäne, welche nicht in den bakteriellen Homologen zu finden ist. Diese zeigt eine hohe Wahrscheinlichkeit, *coiled-coil* Strukturen einzunehmen. Hefen, in denen diese Domäne deletiert wurden, zeigen einen starken Wachstumsdefekt und können nicht mehr auf einer nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle wachsen (nicht gezeigt). Diese Hefemutanten verlieren ihre mitochondriale DNA und damit die

Möglichkeit, ribosomale RNA zu synthetisieren, wodurch die Mutanten keine mitochondrialen Ribosomen mehr besitzen. Deswegen ist es nicht möglich, die Interaktion von Oxa1 mit den Ribosomen, welchen die C-terminale *coiled-coil*-Domäne von Mrp20 fehlt, zu untersuchen. Es gibt aber Hinweise, dass Mrp20 nicht der einzige Bindungspartner von Oxa1 ist. So kann die Interaktion von Oxa1 mit dem Ribosom durch RNase-Behandlung gestört werden. Das führt zu einer Ablösung von Oxa1 von dem Rest des Ribosoms, an welches Mrp20 immer noch gebunden ist. Wenn Mrp20 der einzige Bindungspartner wäre, dann sollte sich Oxa1 unter diesen Bedingungen wie Mrp20 verhalten. Dies legt nahe, dass Oxa1 nicht nur mit Proteinen, sondern auch mit der ribosomalen RNA interagiert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass der C-Terminus von Oxa1 salzsensitiv an Ribosomen bindet. Darüberhinaus ist der C-Terminus, obwohl wenig konserviert in Sequenz, in allen untersuchten Fällen stark positiv geladen (Hefeprotein pI: 11,9). Da eine ionische Wechselwirkung einer stark positiv geladenen Domäne ein negativ geladenes Gegenstück benötigt, könnte die stark negativ geladene ribosomale RNA diese Funktion übernehmen. In der Tat wurde für die Sec-Translokase eine Bindung mit ribosomaler RNA sowohl biochemisch (Prinz et al., 2000) als auch strukturell nachgewiesen (Beckmann et al., 2001).

## **4.2 Bakterielle und mitochondriale Mitglieder der Oxa1/YidC-Familie sind funktionell austauschbar**

Oxa1/YidC-Proteine sind Mitglieder einer großen Familie von Membranproteinen, welche eine wichtige Rolle in der Biogenese von membranständigen Proteinkomplexen der Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien spielt (Dalbey und Kuhn, 2004; Kuhn et al., 2003). Dabei weisen die Mitglieder der Oxa1/YidC-Familie nur einen geringen Grad der Sequenzidentität auf. Trotzdem konnte in Komplementationsstudien eine funktionelle Austauschbarkeit gezeigt werden. So können Oxa1-Proteine unterschiedlicher Arten eine  $\Delta$ Oxa1-Mutante in Hefe komplementieren (Bonney et al., 1994; Nargang et al., 2002), das Albino 3-Protein aus Chloroplasten die Funktion vom bakteriellen Homolog YidC übernehmen (Jiang et al., 2002) oder das Protein der inneren Hüllmembran der Chloroplasten ARTEMIS das Hefeprotein Oxa1 ersetzen (Funes et al., 2004a).

In Mitochondrien existiert noch ein weiteres Protein der Oxa1/YidC-Proteinfamilie, das Cox18/Oxa2-Protein. Dieses besitzt keine C-terminale Ribosomenbindedomäne und ist für die



Biogenese der Cytochrom *c*-Oxidase von entscheidender Bedeutung (Funes et al., 2004b; Saracco und Fox, 2002). Die genaue molekulare Funktion von Cox18/Oxa2 ist bisher noch nicht aufgeklärt.

#### 4.2.1 Funktioneller Austausch von Oxa1 und Cox18 durch YidC

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das YidC-Protein aus *E. coli* prinzipiell die Funktionen von Oxa1 oder Cox18 übernehmen kann. Um Oxa1 funktionell zu ersetzen, musste das in Mitochondrien importierte YidC mit der Ribosomenbindestelle von Oxa1 ausgestattet werden. Diese ermöglichten dessen Kontakt zu mitochondrialen Ribosomen und zu mitochondrialen Translationsprodukten. Erstaunlicherweise war diese Domäne hinderlich für die Komplementation von Cox18 durch YidC. Dies war nur möglich, wenn YidC ohne Ribosomenbindedomäne in Mitochondrien importiert wurde.

YidC spielt eine wichtige Rolle in der Integration und Assemblierung bakterieller Membranproteine (van der Laan et al., 2003). Nur wenige Proteine in *E. coli* benötigen YidC, um effizient in die Membran inseriert zu werden, und die meisten werden SecYEG-abhängig in die Membran eingebaut (Dalbey und Chen, 2004). Oxa1 und Mba1 sind die bis jetzt einzigen bekannten Komponenten der Insertionsmaschinerie in Mitochondrien. Eine Sec-Komplex-ähnliche Komponente wurde, trotz intensiver Suche auch während dieser Arbeit, noch nicht identifiziert. Obwohl die mitochondriale Insertionsmaschinerie konservativ sortierter Proteine noch nicht ausreichend identifiziert ist, kann man einige Vergleiche zwischen Oxa1 und YidC ziehen. So interagiert YidC (Houben et al., 2005) wie Oxa1 früh mit naszierenden Polypeptiden, um die Insertion in die jeweilige Membran zu vermitteln. Diese Interaktion ist transient und geschieht während der Translation. Ob Oxa1 eine generellere Insertase-Aktivität besitzt als YidC kann nicht befriedigend beantwortet werden. Die Proteine, welche YidC für die Insertion benötigen, sind meist recht einfach bezüglich ihrer Topologie und Größe (Dalbey und Chen, 2004) und damit weit von der Komplexität der mitochondrial kodierten Proteine entfernt, welche bis zu 12 Transmembrandomänen (Cox1) umfassen können. Trotzdem kann YidC Oxa1 ersetzen, wenn auch nicht in vollem Umfang. Daraus könnte man schließen, dass Oxa1 eine ähnliche Funktion wie YidC hat. Welche die genaue Funktion ist, ist unklar, da die molekulare Funktion selbst von YidC immer noch Gegenstand kontroverser Diskussion ist. Kann Oxa1 YidC funktionell ersetzen? In einer parallel mit unserer Studie veröffentlichten Arbeit konnte dies gezeigt werden (van Bloois et al., 2005). Biochemische Charakterisierungen führten zu dem

Schluss, dass Oxa1 in Bakterien nicht mit der Sec-Translokase interagiert demnach eine von der Translokase unabhängige Funktion ausübt.

Cox18/Oxa2 hingegen spielt eine wichtige Rolle in der Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase (Funes et al., 2004b). Es wurde gezeigt, dass Oxa2 in einem post-translationalen Schritt neusynthetisiertes Cox2 und Cox3 binden kann und somit eine Chaperon-ähnliche Funktion für die Assemblierung von Cox2 und Cox3 in den Cytochrom *c*-Oxidase-Komplex übernehmen könnte. Interessanterweise wurde eine ähnliche Funktion für YidC vorgeschlagen. Wird YidC *in vivo* depletiert, führt dies zu einem Assemblierungsdefekt der bakteriellen Atmungskettenkomplexe (van der Laan et al., 2003). Im Falle der Biogenese von LacY, einer Lactose-Permease in *E. coli*, konnte gezeigt werden, dass YidC notwendig ist, um neusynthetisiertes und inseriertes LacY zur korrekten Faltung zu verhelfen (Nagamori et al., 2004).

Eventuell liegt der beobachteten Komplementation von Oxa1 und Cox18 durch den gleichen Kernbereich von YidC die gleiche Funktion zugrunde. Beide Proteine könnten durch eine Affinität zu den Transmembrandomänen nichtassemblierter Proteine diese in den unterschiedlichen Stadien während deren Biogenese binden. Eine solche Funktion könnte sowohl während als auch nach der Insertion durch Oxa1 bzw. Cox18/Oxa2 übernommen werden. Oxa1 würde, wie das auch für YidC gezeigt wurde, naszierende Transmembranhelizes von einer noch nicht identifizierten Translokase übernehmen und helfen, diese in die Lipiddoppelschicht der Membran oder an andere Assemblierungsfaktoren zu überführen. Eine Faltungshelfer-ähnliche Funktion ist ebenso vorstellbar. Cox18/Oxa2 könnte durch Bindung an die Transmembrandomänen der Substratproteine Cox2 und Cox3 deren Assemblierung in die funktionelle Cytochrom *c*-Oxidase vermitteln.

#### **4.2.2 Modell einer Evolution der mitochondrialen Oxa1- und Cox18-Proteine aus dem bakteriellen YidC**

Die in dieser Arbeit gefundenen Zusammenhänge zwischen Oxa1, Cox18 und YidC erlauben, über die Evolution der mitochondrialen Oxa1/YidC-Familienmitglieder zu spekulieren. Phylogenetische Analysen der bis jetzt identifizierten Oxa1- und Cox18/Oxa2-Proteine belegen, dass sich beide Linien früh in der Evolution der eukaryotischen Zellen voneinander getrennt hatten (Funes et al., 2004b). Dies legt den Schluss nahe, dass eine frühe Genduplikation am Anfang der Entstehung von Oxa1 und Cox18 gestanden haben könnte. Die Aufspaltung des

YidC-Gens in zwei unabhängige Gene erlaubte dann eine Spezialisierung des YidC-Proteins, welches nun zwei unterschiedliche Funktionen ausübt. Durch die Hinzufügung der C-terminalen Domäne entstand Oxa1, welches die YidC-Funktion während der ko-translationalen Insertion mitochondriale kodierter Proteine ausübt. In Mitochondrien ist Oxa1 direkt mit den Ribosomen assoziiert und so in Kontakt mit naszierenden Polypeptiden. Interessanterweise interagiert YidC funktionell mit dem SecYEG-Komplex, bildet wahrscheinlich aber keinen statischen Komplex mit diesem (Houben et al., 2005; Scotti et al., 2000). Erst dieser Kontakt mit dem SecYEG-Komplex vermittelt YidC den Zugang zum ko-translational inserierten Substrat. Die permanente Interaktion von Oxa1 mit dem Ribosom ist deswegen höchstwahrscheinlich eine Anpassung an die speziellen Bedürfnisse in Mitochondrien, da mitochondrial kodierte Proteine vorwiegend ko-translational in die Innenmembran eingebaut werden müssen.

Cox18 hingegen entwickelte sich zu einem spezialisierten Assemblierungsprotein, welches in einem post-translationalen Schritt den Einbau von Cox2 und Cox3 in den Cytochrom *c*-Oxidase-Komplex vermittelt.

### 4.3 Charakterisierung von Mba1

Mba1 ist das zweite identifizierte Protein, welches eine Rolle im Insertionsprozess mitochondrial kodierter Proteine spielt. Es wurde zusammen mit Oxa1 in einem genetischen Screen entdeckt (Rep et al., 1996) und weiterführende Studien haben gezeigt, dass Mba1 transient mit neusynthetisierten Polypeptiden interagiert (Preuss et al., 2001). Doppeldeletionen von *mba1* und *oxa1* zeigen einen starken Wachstumsdefekt selbst auf nichtfermentierbaren Kohlenstoffquellen, ein Phänotyp, der wesentlich stärker ist als die jeweilige Einzeldisruption. Dies deutet auf eine gemeinsame überlappende Funktion beider Komponenten hin.

Mba1 ist ein peripheres Membranprotein in der mitochondrialen Matrix und nicht Teil des Oxa1-Komplexes (Preuss et al., 2001). In welchem Schritt der ko-translationalen Insertion Mba1 eine Rolle spielt, ist noch nicht verstanden. Komponenten der Translokationsmaschinerien lassen sich typischerweise mehreren Klassen unterschiedlicher Funktion zuordnen. So gibt es zum einen die Rezeptorproteine, welche die zu inserierenden Proteine erkennen und an die Porenkomponenten weitergeben. Diese sind immer integrale, meist polytope Membranproteine. Chaperonproteine sorgen dafür, dass die Proteine im wässrigen und hydrophoben Milieu die korrekte Faltung einnehmen.

### 4.3.1 Mba1 interagiert mit mitochondrialen Ribosomen

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mba1, wie Oxa1, direkt mit der großen Untereinheit mitochondrialer Ribosomen interagiert. Diese Interaktion ist unabhängig von der Translationsaktivität der Ribosomen und nicht abhängig von Oxa1. Genetische Experimente zeigen, dass Oxa1 und Mba1 überlappende Aufgaben haben. Was ist die Funktion von Mba1? Die ko-translationale Insertion von Membranproteinen erfordert eine organisierte Interaktion von Ribosomen und Translokationsmaschinerien, um hydrophobe Membranproteine effizient zu inserieren. Naszierende Ketten neusynthetisierter Membranproteine müssen vom *ribosome exit tunnel* an membranständige Translokasen weitergegeben werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mba1 unabhängig von Oxa1 mit mitochondrialen Translationsprodukten interagiert und auch nicht notwendig ist, damit diese mit Oxa1 interagieren können. Mba1 wird demnach nicht für einen Transfer naszierender Ketten vom Ribosom zu Oxa1 benötigt.

Ein Hinweis auf die Funktion ergibt sich aus der genetischen Interaktion. Deletionen des C-Terminus von Oxa1 und von Mba1 führen zu einem starken Wachstumsphänotyp und zu einer reduzierten Translokationseffizienz mitochondrial kodierter Proteine. Der C-Terminus von Oxa1 bindet das Protein an Ribosomen. Da Mba1 als ein peripheres Membranprotein gleichzeitig mit der Innenmembran, den mitochondrialen Ribosomen und den Translationsprodukten interagieren kann, ist eine strukturell-organisierende Funktion in der ko-translationalen Insertion am wahrscheinlichsten. Dabei könnte Mba1 eine Rezeptorkomponente einer neuen Translokationskomplexes sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde versucht, Interaktionspartner von Mba1 über einen proteomischen Ansatz zu identifizieren, welcher aber keine neuen Komponenten lieferte. Eventuell ist Mba1, wie das periphere Membranprotein Tim44, nur schwach mit einer möglichen membranständigen Translokationskomponente assoziiert, was eine Reinigung des Komplexes verhindert. Es wurde postuliert, dass im Falle von Tim44 die Interaktion der TIM23-Translokase durch das Substrat vermittelt wird und unterschiedliche Substrate Tim44 und den Importmotor an die Translokase rekrutieren (Chacinska et al., 2005). Mba1 könnte zusammen mit Oxa1 für eine Rekrutierung einer noch unbekanntes Translokase während der ko-translationalen Insertion verantwortlich sein.

### **4.3.2 Mitochondriale Ribosomen sind unabhängig von Oxa1 und Mba1 mit der Innenmembran assoziiert**

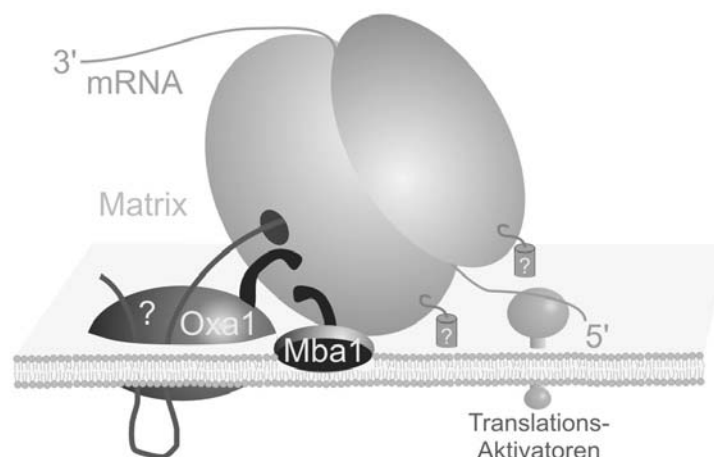
Im Zytosol von Bakterien und Eukaryoten werden sowohl lösliche Proteine als auch Membranproteine synthetisiert. Um zwischen beiden Proteinklassen zu unterscheiden, besitzen sowohl Pro- als auch Eukaryoten das SRP-System. Dieses reguliert die Interaktion des Ribosoms mit den membranständigen Insertionsmaschinerien und organisiert so die Lokalisierung der Ribosomen an der Membran. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in Mitochondrien die Ribosomen an der Membran lokalisiert sind, wobei die Interaktion von bisher nicht identifizierten Proteinen bewerkstelligt wird.

Mitochondrien importieren den Großteil ihrer Proteine aus dem Zytosol und die mitochondriale DNA kodiert für ungefähr 1% der mitochondrialen Proteine. Die kodierten Haupttranslationsprodukte sind bis auf eine Ausnahme sehr hydrophob. Diese Ausnahme stellt in *S. cerevisiae* das Var1-Protein dar, welche eine Untereinheit der kleinen Untereinheit des Ribosoms ist. Somit muss die mitochondriale Insertionsmaschinerie zwischen Membranproteinen, welche ko-translational in die Membran inseriert werden müssen, und dem löslichen Protein Var1 unterscheiden. Wie kann eine solche Differenzierung strukturell organisiert sein, wenn alle Ribosomen an der Membran lokalisiert sind und höchstwahrscheinlich stetig Oxa1 und Mba1 gebunden haben? Eine mögliche Antwort kommt aus der kürzlich gelösten Raumstruktur mitochondrialer Ribosomen. Diese besitzen einen zusätzlichen, vom klassischen *ribosome exit tunnel* abzweigenden Kanal, welcher einen alternativen Weg naszierender Polypeptide aus dem Ribosom darstellen könnte (Sharma et al., 2003). Durch diesen Kanal könnte das lösliche Protein Var1 transportiert werden. Diese Frage wurde aber experimentell noch nicht angegangen.

## **4.4 Organisation einer ko-translationalen Proteininsertion in die mitochondriale Innenmembran**

Wie ist die ko-translationalen Proteininsertion in die mitochondriale Innenmembran organisiert? Im Rahmen dieser Arbeit konnten mehrere für diesen Prozess wichtige Interaktionen zwischen Translations- und Translokationskomponenten bzw. zwischen der Innenmembran und den Ribosomen aufgezeigt werden.

In Bakterien, Chloroplasten und am ER werden naszierende Membranproteine durch SRP an die membranständigen Translokase-Komplexe geführt, wo die Proteine in einem ko-translationalen Schritt in die jeweilige Zielmembran eingebaut werden. In Mitochondrien gibt es kein SRP homologes Protein, und nur das mitochondriale Ribosomenprotein Mrp136 besitzt C-terminal eine gewisse Homologie mit dem bakteriellen Protein des SRP, dem Ffh-Protein. Diese Domäne ist nicht notwendig für das Wachstum der Hefen auf einer nicht fermentierbaren Kohlenstoffquelle (Williams et al., 2004). Interessanterweise interagiert Mrp136 Translationsaktivitäts-abhängig mit der großen Untereinheit des Ribosoms. Dies könnte auf eine SRP-ähnliche Funktion hinweisen und zukünftige Untersuchungen werden in dieser Frage Klarheit schaffen. Die Notwendigkeit, Ribosomen an die Innenmembran zu lokalisieren, ist in Mitochondrien nicht gegeben, da diese unter allen getesteten Bedingungen mit der Membran fest assoziiert waren. Dies wurde zwar schon früher postuliert (Bunn et al., 1970; Fiori et al., 2003), aber noch nicht biochemisch nachgewiesen. Die für diese Interaktion notwendigen Proteine sind noch nicht identifiziert. Diese feste Membranlokalisierung könnte eine Anpassung an die speziellen Bedingungen in Mitochondrien sein, da fast alle mitochondrialen Translationsprodukte sehr hydrophob sind und ko-translational inseriert werden (Abb. 4.1). Die wenigen hydrophilen Proteine, welche in der mitochondrialen DNA kodiert sind, könnten durch einen alternativen *ribosome exit tunnel* in die Matrix sezerniert werden.



#### Abbildung 4.1 Organisation der ko-translationalen Proteininsertion in Mitochondrien

Die m-RNAs mitochondrialer Proteine werden von membranständigen Translationsaktivatoren gebunden und ermöglichen so die Synthese des kodierten Proteins. Das mitochondriale Ribosom ist immer mit der Innenmembran assoziiert und bindet die Insertionskomponenten Oxa1 und Mba1 und eventuell andere Faktoren (?). Diese vermitteln die ko-translationalen Insertion der in der mitochondrialen DNA kodierten Membranproteine.

Darüber hinaus stellen Translationsaktivatoren sicher, dass Untereinheiten eines Komplexes in räumlicher Nähe zueinander synthetisiert werden, was die Effizienz der Biogenese dieser Komplexe zusätzlich fördert (Naithani et al., 2003).

In Bakterien, Chloroplasten und am ER interagieren translatierende Ribosomen direkt mit den Translokase-Komplexen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die beiden bis jetzt identifizierten Komponenten der mitochondrialen Insertionsmaschinerie, Oxa1 und Mba1, ebenfalls mit Ribosomen interagieren (Abb 4.1). Diese Interaktion ist nicht abhängig von der Translationsaktivität der Ribosomen oder vom Vorhandensein naszierender Substratproteine für die Insertionsmaschinerie. Aufgrund der hier erhaltenen biochemischen Ergebnisse scheinen beide Proteine dauerhaft und quantitativ mit der großen Untereinheit des Ribosoms assoziiert zu sein. Eine Substrat-abhängige oder irgendwie sonst regulierte Interaktion zwischen Ribosomen und Insertionskomponenten konnte nicht gefunden werden.

Es scheint, dass wenigstens in *S. cerevisiae* mitochondriale Ribosomen fest mit der Innenmembran assoziiert sind und die Insertionsmaschinerie stets gebunden haben. Interessanterweise ist Cox11, ein Membranprotein, welches für den Kupfereinbau in den Cytochrome *c*-Oxidase-Komplex benötigt wird, ebenfalls mit den mitochondrialen Ribosomen assoziiert (Khalimonchuk et al., 2005). Es könnte deswegen sein, dass die Biogenese der Atmungskettenkomplexe in Form eines Mikrokompartmentes organisiert ist. Dies würde die Translationsmaschinerie mit der Insertions- und Assemblierungsmaschinerie in direkte räumliche Nähe zueinander bringen und so die Biogenese der Atmungskettenkomplexe effizienter gestalten. Den Ribosomen würde in solch einem Falle eine Schlüsselrolle als Organisationsplattformen zufallen.

## 5. Zusammenfassung

Die Biogenese von Mitochondrien erfordert neben dem Import kernkodierter Proteine auch die Insertion mitochondrial kodierter Membranproteine in die Innenmembran. Diese sind meist Untereinheiten der Atmungsketten-Komplexe, welche homolog zu den Atmungsketten der bakteriellen Vorfahren dieses Organells sind. Die Biogenese von Membranproteinen in Bakterien ist sehr gut verstanden. *Signal recognition particles* (SRPs) erkennen naszierende Membranproteine während ihrer Synthese durch zytosolische Ribosomen und leiten die Ribosomen an die membranständigen Translokasekomplexe weiter. Diese vermitteln die ko-translationale Insertion in die bakterielle Innenmembran.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Organisation der ko-translationalen Insertion in die mitochondriale Innenmembran untersucht. Die mitochondriale DNA kodiert fast ausschließlich für sehr hydrophobe Membranproteine. Um eine irreversible Aggregation dieser Membranproteine während der Synthese zu verhindern, muss die Translation direkt an die Insertion gekoppelt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten direkte Interaktionen zwischen den mitochondrialen Ribosomen und Komponenten der Insertionsmaschinerie gezeigt werden. Dies zeigt, dass auch wie in Bakterien, Chloroplasten und am ER in den Mitochondrien die Ribosomen direkt an Insertionskomponenten binden können.

Oxa1 spielt eine wichtige Rolle im Insertionsprozess mitochondrial kodierter Proteine. Oxa1 gehört zu einer konservierten Familie von Membranproteinen, welche in Bakterien, Chloroplasten und Mitochondrien die Insertion und Faltung von Membranproteinen vermitteln. Dazu interagiert Oxa1 während der Biogenese mitochondrial kodierter Proteine früh mit den naszierenden Polypeptiden. Um diesen Kontakt herzustellen, bedarf es einer löslichen, C-terminalen Domäne von Oxa1. Diese ist notwendig und hinreichend für die Interaktion von Oxa1 mit den mitochondrialen Ribosomen. Ist dieser Kontakt durch Deletionen im C-Terminus von Oxa1 verhindert, führt dies zu Defekten in der Biogenese der Atmungskettenkomplexe, da mitochondrial kodierte Proteine nicht mehr effizient in die Innenmembran inseriert werden können. Die Analyse der Bindung von Oxa1 weist auf eine ionische Wechselwirkung des stark positiv geladenen C-Terminus hin. Ein nahe liegender Kandidat für einen Bindungspartner ist die



ribosomale RNA, wobei die Möglichkeit besteht, dass mehrere Komponenten eine wichtige Rolle spielen, wie dies auch in Bakterien und am ER der Fall ist.

Mba1 ist das zweite Protein, welches eine Funktion während der ko-translationalen Insertion ausübt. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mba1 als peripheres Membranprotein die Interaktion zwischen Ribosomen und Membran vermitteln kann. Darüber hinaus interagiert Mba1 mit naszierenden Membranproteinen. Dabei überlappt Mba1 funktionell mit dem C-Terminus von Oxa1. Deletionen von sowohl dieser Domäne als auch von Mba1 führen zu einer Anhäufung nicht inserierter Proteine. Aufgrund der gefundenen Hinweise ist Mba1 höchstwahrscheinlich ein Rezeptorprotein, welches die Insertion mitochondrial kodierter Proteine in die Innenmembran strukturell organisiert.

Mitochondriale Ribosomen sind fest und unabhängig von Oxa1 und Mba1 mit der Innenmembran assoziiert und müssen nicht durch SRP-ähnliche Faktoren an diese lokalisiert werden. Da sie höchstwahrscheinlich die Insertionskomponenten und Assemblierungsfaktoren stets gebunden haben, könnte es sein, dass die Biogenese der Atmungskettenkomplexe in Mitochondrien in Mikrokompartmenten organisiert ist. In diesen Mikrokompartmenten könnten Translationskomponenten zusammen mit Insertions- und Assemblierungsmaschinerien in einer Weise arrangiert sein, welche die Biogenese der Atmungskette effizient gestaltet.

Das bakterielle Protein YidC ist der Vorfahre der mitochondrialen Oxa Proteine. Durch einen funktionellen Komplementationsansatz konnte gezeigt werden, dass YidC in der Lage ist, die beiden mitochondrialen Oxa Proteine zu ersetzen. Um das während der ko-translationalen Insertion wichtige Oxa1 zu ersetzen, muss das in der mitochondrialen Innenmembran lokalisierte YidC die Ribosomenbindestelle von Oxa1 besitzen. Diese Domäne verhindert gleichzeitig, dass YidC Cox18 ersetzen kann, das zweite Oxa-Protein in Mitochondrien, welches für die Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase benötigt wird. Die in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnisse lassen den Schluss zu, dass eine frühe Genduplikation die Spezialisierung von YidC in Mitochondrien ermöglicht hat. Oxa1 wurde durch die C-terminale Ribosomenbindestelle zu einer Komponente der ko-translationalen Insertion und Cox18/Oxa2 zu einem obligat post-translationalen Assemblierungsfaktor.

## 6. Literaturverzeichnis

- Altamura, N., N. Capitanio, N. Bonnefoy, S. Papa und G. Dujardin. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* *OX1* gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. *FEBS Lett* **382**, 111-115.
- Bacher, G., H. Lutcke, B. Jungnickel, T.A. Rapoport und B. Dobberstein. (1996) Regulation by the ribosome of the GTPase of the signal-recognition particle during protein targeting. *Nature* **381**, 248-251.
- Barrientos, A., A. Zambrano und A. Tzagoloff. (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **23**, 3472-3482.
- Bauer, M.F., C. Sirrenberg, W. Neupert und M. Brunner. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* **87**, 33-41.
- Beck, K., G. Eisner, D. Trescher, R.E. Dalbey, J. Brunner und M. Muller. (2001) YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. *EMBO Rep.* **2**, 709-714.
- Beckmann, R., C.M. Spahn, N. Eswar, J. Helmers, P.A. Penczek, A. Sali, J. Frank und G. Blobel. (2001) Architecture of the protein-conducting channel associated with the translating 80S ribosome. *Cell* **107**, 361-372.
- Bonnefoy, N., M. Kerorgant, O. Groudinsky, M. Minet, P.P. Slominski und G. Dujardin. (1994) Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an *oxa1*<sup>-</sup> mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**, 11978-11982.
- Borst, P. und L.A. Grivell. (1978) The mitochondrial genome of yeast. *Cell* **15**, 705-723.
- Bunn, C.L., C.H. Mitchell, H.B. Lukins und A.W. Linnane. (1970) Biogenesis of mitochondria. 18. A new class of cytoplasmically determined antibiotic resistant mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **67**, 1233-1240.
- Chacinska, A., M. Lind, A.E. Frazier, J. Dudek, C. Meisinger, A. Geissler, A. Sickmann, H.E. Meyer, K.N. Truscott, B. Guiard, N. Pfanner und P. Rehling. (2005) Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell* **120**, 817-829.
- Dalbey, R.E. und M. Chen. (2004) Sec-translocase mediated membrane protein biogenesis. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 37-53.
- Dalbey, R.E. und A. Kuhn. (2004) YidC family members are involved in the membrane insertion, lateral integration, folding, and assembly of membrane proteins. *J. Cell Biol.* **166**, 769-774.
- Danial, N.N. und S.J. Korsmeyer. (2004) Cell death: critical control points. *Cell* **116**, 205-219.
- Economou, A. und W. Wickner. (1994) SecA promotes preprotein translocation by undergoing ATP-driven cycles of membrane insertion and deinsertion. *Cell* **78**, 835-843.
- Fiori, A., T.L. Mason und T.D. Fox. (2003) Evidence that synthesis of the *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrially encoded ribosomal protein Var1p may be membrane localized. *Eukaryot. Cell* **2**, 651-653.
- Fox, T.D. (1996) Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia* **52**, 1130-1135.

- Funes, S., L. Gerdes, M. Inaba, J. Soll und J.M. Herrmann. (2004a) The *Arabidopsis thaliana* chloroplast inner envelope protein ARTEMIS is a functional member of the Alb3/Oxa1/YidC family of proteins. *FEBS Lett.* **569**, 89-93.
- Funes, S., F.E. Nargang, W. Neupert und J.M. Herrmann. (2004b) 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**, 1853-1861.
- Gasser, S.M., G. Daum und G. Schatz. (1982) Import of proteins into mitochondria: energy-dependent uptake of precursors into isolated mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13034-13041.
- Geissler, A., A. Chacinska, K.N. Truscott, N. Wiedemann, K. Brandner, A. Sickmann, H.E. Meyer, C. Meisinger, N. Pfanner und P. Rehling. (2002) The mitochondrial presequence translocase. An essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* **111**, 507-518.
- Gier, J.W. (2005) Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* **59**, 329-355.
- Glick, B.S., A. Brandt, K. Cunningham, S. Muller, R.L. Hallberg und G. Schatz. (1992) Cytochromes c1 and b2 are sorted to the intermembrane space of yeast mitochondria by a stop-transfer mechanism. *Cell* **69**, 809-822.
- Glick, B.S. und G. von Heijne. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack a bacterial-type Sec machinery. *Protein Sci.* **5**, 1-2.
- Goffart, S. und R.J. Wiesner. (2003) Regulation and co-ordination of nuclear gene expression during mitochondrial biogenesis. *Exp Physiol* **88**, 33-40.
- Hartl, F.-U., S. Lecker, E. Schiebel, J.P. Hendrick und W. Wickner. (1990) The binding cascade of SecB to SecA to SecY/E mediates preprotein targeting to the *E. coli* plasma membrane. *Cell* **63**, 269-279.
- Hartl, F.U., B. Schmidt, E. Wachter, H. Weiss und W. Neupert. (1986) Transport into mitochondria and intramitochondrial sorting of the Fe/S protein of ubiquinol-cytochrome c reductase. *Cell* **47**, 939-951.
- Hell, K., J. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert und R.A. Stuart. (1997) Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Lett.* **418**, 367-370.
- Hell, K., J.M. Herrmann, E. Pratje, W. Neupert und R.A. Stuart. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 2250-2255.
- Hell, K., W. Neupert und R.A. Stuart. (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* **20**, 1281-1288.
- Herrmann, J.M., H. Koll, R.A. Cook, W. Neupert und R.A. Stuart. (1995) Topogenesis of cytochrome oxidase subunit II - Mechanisms of protein export from the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* **270**, 27079-27086.
- Herrmann, J.M. und W. Neupert. (2003) Protein insertion into the inner membrane of mitochondria. *IUBMB Life* **55**, 219-225.
- Herrmann, J.M., W. Neupert und R.A. Stuart. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear encoded Oxa1p. *EMBO J.* **16**, 2217-2226.
- Herrmann, J.M., B. Westermann und W. Neupert. (2001) Analysis of protein-protein interaction in mitochondria by co-immunoprecipitation and chemical cross-linking. *Methods Cell Biol.* **65**, 217-230.

- Houben, E.N., R. Zarivach, B. Oudega und J. Luirink. (2005) Early encounters of a nascent membrane protein: specificity and timing of contacts inside and outside the ribosome. *J Cell Biol* **170**, 27-35.
- Jia, L., M. Dienhart, M. Schramp, M. McCauley, K. Hell und R.A. Stuart. (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: The importance of the C-terminal hydrophilic region of Oxa1. *EMBO J.* **22**, 6438-6447.
- Jiang, F., L. Yi, M. Moore, M. Chen, T. Rohl, K.J. Van Wijk, J.W. De Gier, R. Henry und R.E. Dalbey. (2002) 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**, 19281-19288.
- Johnson, A.E. und M.A. van Waes. (1999) The translocon: a dynamic gateway at the ER membrane. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**, 799-842.
- Khalimonchuk, O., K. Ostermann und G. Rodel. (2005) Evidence for the association of yeast mitochondrial ribosomes with Cox1 lp, a protein required for the Cu(B) site formation of cytochrome c oxidase. *Curr. Genet.* **47**, 223-233.
- Knop, M., K. Siegers, G. Pereira, W. Zachariae, B. Winsor, K. Nasmyth und E. Schiebel. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* **15**, 963-972.
- Kuhn, A., R. Stuart, R. Henry und R.E. Dalbey. (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* **13**, 510-516.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lill, R. und G. Kispal. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352-356.
- Luirink, J. und B. Dobberstein. (1994) Mammalian and Escherichia coli signal recognition particles. *Mol Microbiol* **11**, 9-13.
- Meier, S., W. Neupert und J.M. Herrmann. (2005) Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria. *J Cell Biol* **170**, 881-888.
- Mokranjac, D. und W. Neupert. (2005) Protein import into mitochondria. *Biochem Soc Trans* **33**, 1019-1023.
- Mokranjac, D., S.A. Paschen, C. Kozany, H. Prokisch, S.C. Hoppins, F.E. Nargang, W. Neupert und K. Hell. (2003) Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* **22**, 816-825.
- Nagamori, S., I.N. Smirnova und H.R. Kaback. (2004) Role of YidC in folding of polytopic membrane proteins. *J. Cell Biol.* **165**, 53-62.
- Naithani, S., S.A. Saracco, C.A. Butler und T.D. Fox. (2003) 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**, 324-333.
- Nargang, F.E., M. Preuss, W. Neupert und J.M. Herrmann. (2002) The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translocase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* **277**, 12846-12853.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863-917.
- Okamoto, K., A. Brinker, S.A. Paschen, I. Moarefi, M. Hayer-Hartl, W. Neupert und M. Brunner. (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J* **21**, 3659-3671.

- Orrenius, S., B. Zhivotovsky und P. Nicotera. (2003) Regulation of cell death: the calcium-apoptosis link. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 552-565.
- Paschen, S.A., T. Waizenegger, T. Stan, M. Preuss, M. Cyrklaff, K. Hell, D. Rapaport und W. Neupert. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**, 862-866.
- Pelham, H.R.B. und R.J. Jackson. (1976) An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. *Eur. J. Biochem.* **67**, 247-256.
- Perez-Martinez, X., S.A. Broadley und T.D. Fox. (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J.* **22**, 5951-5961.
- Pfanner, N., N. Wiedemann, C. Meisinger und T. Lithgow. (2004) Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 1044-1048.
- Poyton, R.O., D.M.J. Duhl und G.H.D. Clarkson. (1992) Protein export from the mitochondrial matrix. *Trends Cell Biol.* **2**, 369-375.
- Pozzan, T. und R. Rizzuto. (2000) The renaissance of mitochondrial calcium transport. *Eur J Biochem* **267**, 5269-5273.
- Preuss, M., K. Leonhard, K. Hell, R.A. Stuart, W. Neupert und J.M. Herrmann. (2001) Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **153**, 1085-1096.
- Prinz, A., C. Behrens, T.A. Rapoport, E. Hartmann und K.U. Kalies. (2000) Evolutionarily conserved binding of ribosomes to the translocation channel via the large ribosomal RNA. *Embo J* **19**, 1900-1906.
- Rapoport, T.A. (1992) Transport of proteins across the endoplasmic reticulum membrane. *Science* **258**, 931-936.
- Rep, M. und L.A. Grivell. (1996) *MBAl* encodes a mitochondrial membrane-associated protein required for biogenesis of the respiratory chain. *FEBS Lett.* **388**, 185-188.
- Rep, M., J. Nooy, E. Guelin und L.A. Grivell. (1996) Three genes for mitochondrial proteins suppress null-mutations in both *Afg3* and *Rca1* when over-expressed. *Curr Genet* **30**, 206-211.
- Robinson, C. und A. Bolhuis. (2004) Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta* **1694**, 135-147.
- Rojo, E.E., R.A. Stuart und W. Neupert. (1995) Conservative sorting of  $F_0$ -ATPase subunit 9: export from matrix requires delta pH across inner membrane and matrix ATP. *EMBO J.* **14**, 3445-3451.
- Rothstein R.J. (1983) One-step gene disruption in yeast. *Methods Enzymol.* **101**, 202-211.
- Samuelson, J.C., F. Jiang, L. Yi, M. Chen, J.W. de Gier, A. Kuhn und R.E. Dalbey. (2001) Function of YidC for the insertion of M13 procoat protein in *Escherichia coli*: translocation of mutants that show differences in their membrane potential dependence and Sec requirement. *J. Biol. Chem.* **276**, 34847-34852.
- Saracco, S.A. und T.D. Fox. (2002) Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **13**, 1122-1131.
- Scotti, P.A., M.L. Urbanus, J. Brunner, J.L. de Gier, G. von Heijne, C. van der Does, A.J.M. Driessen, B. Oudega und L. Luirink. (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* **19**, 542-549.
- Serek, J., G. Bauer-Manz, G. Struhalla, L. Van Den Berg, D. Kiefer, R. Dalbey und A. Kuhn. (2004) *Escherichia coli* YidC is a membrane insertase for Sec-independent proteins. *EMBO J.* **23**, 294-301.

- Sharma, M.R., E.C. Koc, P.P. Datta, T.M. Booth, L.L. Spemulli und R.K. Agrawal. (2003) Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* **115**, 97-108.
- Shaw, J.M. und J. Nunnari. (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* **12**, 178-184.
- Sikorski, R.S. und P. Hieter. (1989) A system of shuttle vectors and host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **122**, 19-27.
- Sirrenberg, C., M.F. Bauer, B. Guiard, W. Neupert und M. Brunner. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* **384**, 582-585.
- Soll, J. und E. Schleiff. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 198-208.
- Ullers, R.S., E.N. Houben, A. Raine, C.M. ten Hagen-Jongman, M. Ehrenberg, J. Brunner, B. Oudega, N. Harms und J. Luirink. (2003) Interplay of signal recognition particle and trigger factor at L23 near the nascent chain exit site on the Escherichia coli ribosome. *J Cell Biol* **161**, 679-684.
- van Bloois, E., G. Jan Haan, J.W. de Gier, B. Oudega und J. Luirink. (2004) F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase subunit c is targeted by the SRP to YidC in the E. coli inner membrane. *FEBS Lett.* **576**, 97-100.
- van Bloois, E., S. Nagamori, G. Koningstein, R.S. Ullers, M. Preuss, B. Oudega, N. Harms, H.R. Kaback, J.M. Herrmann und J. Luirink. (2005) The Sec-independent Function of Escherichia coli YidC Is Evolutionary-conserved and Essential. *J. Biol. Chem.* **280**, 12996-13003.
- van der Laan, M., P. Bechtluft, S. Kol, N. Nouwen und A.J. Driessen. (2004) F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase subunit c is a substrate of the novel YidC pathway for membrane protein biogenesis. *J. Cell Biol.* **165**, 213-222.
- van der Laan, M., M.L. Urbanus, C.M. Ten Hagen-Jongman, N. Nouwen, B. Oudega, N. Harms, A.J. Driessen und J. Luirink. (2003) A conserved function of YidC in the biogenesis of respiratory chain complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 5801-5806.
- von Heijne, G. (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* **5**, 1335-1342.
- von Heijne, G. (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**, 456-458.
- Watson, K. (1972) The organization of ribosomal granules within mitochondrial structures of aerobic and anaerobic cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* **55**, 721-726.
- Westermann, B., J.M. Herrmann und W. Neupert. (2001) Analysis of mitochondrial translation products in vivo and in organello in yeast. *Methods Cell Biol.* **65**, 429-438.
- Wiedemann, N., A.E. Frazier und N. Pfanner. (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 14473-14476.
- Wiedemann, N., V. Kozjak, A. Chacinska, B. Schonfisch, S. Rospert, M.T. Ryan, N. Pfanner und C. Meisinger. (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* **424**, 565-571.
- Williams, E.H., X. Perez-Martinez und T.D. Fox. (2004) MrpL36p, a highly diverged L31 ribosomal protein homolog with additional functional domains in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Genetics* **167**, 65-75.
- Yamamoto, H., M. Esaki, T. Kanamori, Y. Tamura, S. Nishikawa und T. Endo. (2002) Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell* **111**, 519-528.



## Veröffentlichungen

Im Rahmen dieser Arbeit entstanden folgende Veröffentlichungen:

Szyrach, G., **M. Ott**, N. Bonnefoy, W. Neupert und J.M. Herrmann. (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates cotranslational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* **22**, 6448-6457.

Preuss, M., **M. Ott**, S. Funes, J. Luirink und J.M. Herrmann. (2005) Evolution of mitochondrial Oxa proteins from bacterial YidC: Inherited and acquired functions of a conserved insertion machinery. *J. Biol. Chem.* **280**, 13004-13011.

**M. Ott**, M. Prestele, H. Bauerschmitt, S. Funes, N. Bonnefoy und J.M.Herrmann. Mba1, a ribosome receptor in mitochondria.

Manuskript in Vorbereitung, geplante Einreichung bei *EMBO J.*

O. Khalimonchuk\*, **M. Ott\***, K. Ostermann, G. Rödel und J.M. Herrmann. Sequential processing of a mitochondrial tandem protein: Insight into the protein import in *Schizosaccharomyces pombe*.

Eingereicht bei *Eukaryotic Cell*

\* Beide Autoren trugen zu dieser Studie gleichermassen bei.





## Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Dr. Walter Neupert danken, an dessen Institut diese Arbeit angefertigt wurde. Sein stetes Streben nach wissenschaftlichem Fortschritt und qualitativ hochwertiger Arbeit wird mir auch in Zukunft ein Vorbild sein. Ganz besonders bedanken möchte ich mich für die Bereitstellung eines hervorragenden wissenschaftlichen Umfelds, für die interessanten Diskussionen und Seminare.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Soll danke ich für die Bereitschaft, meine Dissertation an der Fakultät für Biologie zu vertreten und für die Organisation des exzellenten FEBS-Kurses in Wildbad Kreuth.

Ganz besonders möchte ich mich bei PD Dr. Hannes Herrmann bedanken, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit entstand. Seine Kreativität und Ideenreichtum, verbunden mit einem nie endenden Optimismus, haben entscheidend zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Darüber hinaus möchte ich mich auch ganz herzlich bei allen Mitarbeitern der AG Hannes bedanken, die den Labor-Alltag vielfältig und interessant gemacht haben. Vor allem meiner "Mitbewohnerin" Heike danke ich für die nette Zeit im kleinen Labor und die vielen Kekse. Herzlichen Dank auch an Gregor, Stephan, Marc, Sole, Nikola, Karl, Ilona, Martin und den vielen Praktikanten. Besonders bei Michael möchte ich mich für den Spaß und die produktive Zusammenarbeit während seines 3-monatigen Praktikums bei mir danken. Herzlichen Dank auch den beiden technischen Assistentinnen Tanja und Sandra, die bei einigen Experimenten mitgeholfen haben.

Allen Institutsangehörigen möchte ich für den Austausch von Wissen und Materialien danken. Die vielen stimulierenden Diskussionen werde ich vermissen.

Bedanken möchte ich mich bei Frau Döge, Frau Hauck und Frau Branse für die Hilfe bei vielen Verwaltungsangelegenheiten. Bei Frau Reisenauer für die Bereitstellung von Milch für mein tägliches Müsli und zusammen mit den anderen Mitarbeiterinnen der Spülküche für die Organisation der Ordnung im Labor. Bei den Mitarbeitern der Hauswerkstatt danke ich Peter für die Unterstützung durch den Bau von vielen Laborutensilien, Willi für die technische Unterstützung zu jeder Zeit und Gerd für die vielen interessanten und witzigen Gespräche. Den Mitarbeiterinnen des Tierstalls danke ich für hervorragende Zusammenarbeit und das Bestreben,

sowohl den Doktoranden als auch den Kaninchen gute "Arbeitsbedingungen" bereitzustellen. Den Kaninchen 306, 308, 337, 339, 342 danke ich für die Herstellung der Antikörper.

Bei meinen alten Professoren Sten Orrenius und Dieter Brdiczka bedanke ich mich sehr herzlich für die fortlaufende Unterstützung und den netten Kontakt.

Meiner Familie, und da ganz besonders meiner Mutter, gebührt großer Dank für die Unterstützung in vielen Lebenslagen. Meinem Vater verdanke ich die Begeisterung für die Naturwissenschaften und für die Berge. Leider kann er den Abschluss meiner wissenschaftlichen Ausbildung nicht mehr erleben.

Zum Schluss möchte ich mich bei Esther bedanken, die mich immer unterstützt und aufgebaut hat. Du warst für mich ein ruhiger Gegenpol in Zeiten, in denen es im Labor mal nicht so lief, wie ich mir das gewünscht hätte, und hast akzeptiert, dass die Doktorarbeit oft Vorrang vor gemeinsamen Unternehmungen hatte.

## Lebenslauf

Martin Ott

- |            |   |
|------------|---|
| 16.07.1974 | geboren in München  |
| 1982-86    | Besuch der Grundschule in Weilheim i. Obb.  |
| 1986-95    | Besuch des Gymnasiums Weilheim  |
| 1995-96    | Zivildienst im integrativen Kindergarten in Polling   |
| 1996-2001  | Studium der Biologie an der Universität Konstanz  |
| 2000-01    | Diplomarbeit am Karolinska Institut in Stockholm im Lehrstuhl von Prof. Dr. Sten Orrenius „Mitochondrial involvement in cell death“ |
| 2002       | Beginn der vorliegenden Dissertation an der LMU München bei Prof. Dr. Dr. W. Neupert in der Arbeitsgruppe von PD Dr. J. M. Herrmann |

