

**Charakterisierung der Untereinheit  $\epsilon$  der mitochondrialen  
 $F_1F_0$ -ATP Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae***

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

von  
**Susanne Brunner**  
aus München

München  
2002

Dissertation eingereicht am: 15. April 2002

1. Gutachter: Prof. Dr. Reinhold Herrmann
  2. Gutachter: PD Dr. Lutz Eichacker
- Sondergutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Juni 2002

## ABKÜRZUNGEN

<b>Abb.</b>	Abbildung
<b>ADP</b>	Adenosin-5'-diphosphat
<b>Amp</b>	Ampicillin
<b>APS</b>	Ammoniumperoxodisulfat
<b>ATP</b>	Adenosin-5'-triphosphat
<b>bidest.</b>	doppelt destilliert
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin
<b>°C</b>	Grad Celsius
<b>CIP</b>	Calf Intestine Phosphatase (alkalische Phosphatase)
<b>C-terminal</b>	carboxyterminal
<b>C-Terminus</b>	Carboxyterminus
<b>COX</b>	Cytochrom-Oxidase
<b>Cox x</b>	Protein x der Cytochrom c-Oxidase
<b>Cyt b</b>	Cytochrom b
<b>Cyt c<sub>1</sub></b>	Cytochrom c <sub>1</sub>
<b>Cyt b<sub>2</sub></b>	Cytochrom b <sub>2</sub>
<b>DMP</b>	Dimethylpimelimidat
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxid
<b>DNS</b>	Desoxyribonukleinsäure
<b>dATP</b>	Desoxyadenosin-5'-triphosphat
<b>dCTP</b>	Desoxycytosin-5'-triphosphat
<b>dGTP</b>	Desoxyguanosin-5'-triphosphat
<b>dNTP</b>	Desoxyribonucleosid-5'-triphosphat
<b>dTTP</b>	Desoxythymidin-5'-triphosphat
<b>DSG</b>	Disuccimidylglutarat
<b>DTNB</b>	5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)
<b>DTT</b>	Dithiothreitol
<b><i>E.coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDC</b>	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid Hydrochlorid
<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraacetat
<b>EPR</b>	Electron Paramagnetic Resonance
<b>FAD</b>	Flavinadenin-dinucleotid (oxidierte Form)
<b>FADH<sub>2</sub></b>	Flavinadenin-dinucleotid (reduzierte Form)
<b>FeS</b>	Rieske Eisen-Schwefel
<b>F<sub>1</sub>α</b>	Untereinheit α des F <sub>1</sub> -Teils der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase
<b>F<sub>1</sub>β</b>	Untereinheit β des F <sub>1</sub> -Teils der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase
<b>g</b>	Gramm

<b>Gal</b>	Galaktose
<b>h</b>	Stunde
<b>H<sup>+</sup></b>	Protonen
<b>H<sub>2</sub>O</b>	Wasser (zweifach destilliert)
<b>HEPES</b>	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethanolsulfonat
<b>HIS/His</b>	Histidin
<b>IgG</b>	Imunglobulin G
<b>IM</b>	mitochondriale Innenmembran
<b>Imp1</b>	Innenmembranprotease 1
<b>IMS</b>	intermembrane space (Intermembranraum)
<b>IP</b>	Immunopräzipitation
<b>kan</b>	Kanamycin
<b>kDa</b>	Kilo-Dalton
<b>l</b>	Liter
<b>LB</b>	Luria Bertani (E.coli-Nährlösung)
<b>LEU</b>	Leucin
<b>M</b>	Molar
<b>mA</b>	Milliampere
<b>MBS</b>	m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimidester
<b>β-ME</b>	β-Mercaptoethanol
<b>μg</b>	Mikrogramm
<b>μl</b>	Mikroliter
<b>μM</b>	Mikromolar
<b>min</b>	Minuten
<b>ml</b>	Mililiter
<b>mM</b>	Milimolar
<b>mmol</b>	Milimol
<b>NADH</b>	Nikotinamidadenindinucleotid
<b>Ni-NTA</b>	Nickel-Nitrilotriacetat
<b>N-terminal</b>	Aminoterminal
<b>N-Terminus</b>	Aminoterminus
<b>nm</b>	Nanometer
<b>O<sub>2</sub></b>	Sauerstoff
<b>OAc</b>	Acetat
<b>Od<sub>x</sub></b>	Optische Dichte bei x nm
<b>ORF</b>	open reading frame
<b>OSCP</b>	oligomycin sensitivity conferring protein
<b>PAGE</b>	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
<b>PAS</b>	Protein A-Sepharose

<b>PCR</b>	Polymerasekettenreaktion
<b>PEG</b>	Polyethylenglykol
<b>PI</b>	Präimmunserum
<b>PK</b>	Proteinase K
<b>PMSF</b>	Phenylmethylsulfonylfluorid
<b>PVDF</b>	Polyvinyliden-difluorid
<b>Q</b>	Ubiquinon
<b>QH<sub>2</sub></b>	Ubiquinol
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b><i>S.cerevisiae</i></b>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<b>sec</b>	Sekunden
<b>SDS</b>	Natriumdodecylsulfat
<b>Su x</b>	Untereinheit x der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase
<b>Taq</b>	Thermophilus aquaticus
<b>TCA</b>	Trichloressigsäure
<b>TEMED</b>	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
<b>Tim23</b>	Protein der Translokationsmaschinerie der Innenmembran
<b>TIM</b>	Translokationsmaschinerie der Innenmembran
<b>Tris</b>	Tris-(hydroxymethyl)-ethylendiamin
<b>U</b>	enzymatische Einheiten (Units)
<b>UpM</b>	Umdrehungen pro Minute
<b>UV</b>	Ultraviolett
<b>Val</b>	Valinomycin
<b>V</b>	Volt
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>WT</b>	Wildtyp



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Struktur und Funktion der Mitochondrien</b>	<b>1</b>
<b>1.2</b>	<b>Der mitochondriale Elektronentransport</b>	<b>2</b>
<b>1.3</b>	<b>Suprakomplexe der Atmungskettenenzyme</b>	<b>4</b>
1.3.1	Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex und Cytochrom <i>c</i> -Oxidase	6
1.3.2	Struktur und Assemblierung des Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -Suprakomplexes in der Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	7
<b>1.4</b>	<b>Die mitochondriale F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase</b>	<b>8</b>
1.4.1	Struktur und Funktion der mitochondrialen F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase	8
1.4.2	Die F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase liegt als dimerer Komplex vor	13
1.4.3	Dimerspezifische Untereinheiten des F <sub>0</sub> -Sektors der ATP Synthase	13
1.4.4	Die Untereinheit <i>e</i> der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase	15
<b>1.5</b>	<b>Fragestellung und Zielsetzung</b>	<b>17</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>18</b>
<b>2.1</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>18</b>
2.1.1	Verwendete Plasmide	18
2.1.2	Polymerase-Kettenreaktion	18
2.1.3	Isolierung von Plasmid-DNS aus <i>E.coli</i>	19
2.1.4	Konzentrationsbestimmung der DNS	20
2.1.5	Phenolextraktion und Ethanol <span>­</span> fällung	21
2.1.6	Agarose-Gelelektrophorese	21
2.1.7	Isolierung von DNS aus Agarosegelen mittels QUIAquick kit	22
2.1.8	Enzymatische Modifikationen von DNS	22
2.1.9	Transformation von <i>E.coli</i> mit Plasmid-DNS	23
2.1.10	Klonierungsstrategien	24
<b>2.2</b>	<b>Methoden der Hefegenetik</b>	<b>26</b>
2.2.1	Verwendete Stämme von <i>S. cerevisiae</i>	26
2.2.2	Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	27
2.2.3	Test des Wachstumsphänotyps von <i>S. cerevisiae</i>	28
2.2.4	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNS	28
2.2.5	Disruption der Gene von <i>Cox8</i> und <i>Suk</i> <sup>hom</sup> in <i>S. cerevisiae</i>	29
2.2.6	Nachweis von Gendisruptionen in <i>S. cerevisiae</i>	30
<b>2.3</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>32</b>
2.3.1	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	32
2.3.2	Schnellisolierung von Mitochondrien	33
2.3.3	ATP-Depletion von Mitochondrien	33
2.3.4	Aufhebung des Membranpotentials	33

<b>2.4</b>	<b>Proteinchemische Methoden</b>	<b>34</b>
2.4.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	34
2.4.2	Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose	35
2.4.3	Proteinbestimmung nach Bradford	35
2.4.4	TCA-Fällung von Proteinen	36
2.4.5	Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine	36
2.4.6	Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)	37
2.4.7	Ni-NTA-Chromatographie	38
2.4.8	Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex- Aktivitätsbestimmung	39
2.4.9	Cytochrom <i>c</i> -Oxidase- Aktivitätsbestimmung	40
<b>2.5</b>	<b>Immunologische Methoden</b>	<b>40</b>
2.5.1	Koppelung synthetischer Peptide an Ovalbumin	40
2.5.2	Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen	41
2.5.3	Kovalente Koppelung von Antikörpern an Protein A-Sepharose	41
2.5.4	Immunfällungen unter denaturierenden Bedingungen	42
2.5.5	Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen	43
<b>2.6</b>	<b>Chemikalien und Geräte</b>	<b>43</b>
2.6.1	Chemikalien und Enzyme	43
2.6.2	Laborgeräte und sonstige Materialien	45
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>46</b>
<b>3.1</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung der Untereinheit e der mitochondrialen F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase</b>	<b>46</b>
3.1.1	<i>Sue</i> ist beteiligt an der Dimerisierung der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase	47
3.1.1.1	Mittels einer Version von <i>Sue</i> mit C-terminalem Histidin-Anhang läßt sich das Dimere der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase isolieren	47
3.1.1.2	<i>Sue</i> existiert als ein Dimeres	50
3.1.1.3	Nur in <i>Sue</i> Disruptionsstämmen kommt die F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase gänzlich in monomerer Form vor	52
3.1.1.4	Für die Dimerisierung der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase wird die C-terminale Region von <i>Sue</i> nicht benötigt	54
3.1.2	Die Untereinheit e der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATP Synthase steht mit der Untereinheit k in enger Beziehung	55
3.1.2.1	In <i>Sue</i> Disruptionsstämmen ist die Expression von <i>Suk</i> signifikant reduziert	55
3.1.2.2	C-terminale Modifikationen von <i>Sue</i> beeinträchtigen die Expression von <i>Suk</i> nicht	57
3.1.2.3	<i>Sue</i> und <i>Suk</i> sind räumlich eng benachbart	58
3.1.2.4	Die Interaktion von <i>Sue</i> mit anderen Proteinen wird nicht durch eine Veränderung des Membranpotentials beeinflusst.	61

<b>3.2</b>	<b>Gibt es ein dem <i>Suk</i> verwandtes Protein?</b>	<b>62</b>
3.2.1	Es existiert im Genom von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> eine Sequenz, die für ein dem <i>Suk</i> verwandtes Protein kodieren könnte	63
3.2.2	<i>Suk<sup>hom</sup></i> ist für die Funktion der Atmungskette nicht erforderlich	66
3.2.3	Die Disruption von <i>Suk<sup>hom</sup></i> beeinflusst die Expressionsrate verschiedener kleiner Untereinheiten der F <sub>O</sub> -Domäne der F <sub>1</sub> F <sub>O</sub> -ATP Synthase nicht	67
3.2.4	<i>Suk<sup>hom</sup></i> ist für die Dimerisierung der F <sub>1</sub> F <sub>O</sub> -ATP Synthase nicht essentiell	68
<b>3.3</b>	<b>Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion zwischen dem Cytochrom <i>bc</i><sub>1</sub>-Suprakomplex und der F<sub>1</sub>F<sub>O</sub>-ATP Synthase</b>	<b>70</b>
3.3.1	Die Assemblierung der F <sub>1</sub> F <sub>O</sub> -ATP Synthase wird für die optimale Aktivität des Cytochrom <i>c</i> -Oxidase- und des Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplexes benötigt	70
3.3.2	In Abwesenheit von <i>Sue</i> ist die Expression der Untereinheit 2 der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase reduziert	73
3.3.3	Defekte in der Assemblierung des Cytochrom <i>c</i> -Oxidase- und des Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplexes haben keine signifikanten Auswirkungen auf die Stabilität von Untereinheiten des F <sub>O</sub> -Sektors der F <sub>1</sub> F <sub>O</sub> -ATP Synthase	74
3.3.4	Der Assemblierungszustand der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase hat keine Auswirkungen auf die Assemblierung der F <sub>1</sub> F <sub>O</sub> -ATP Synthase	76
3.3.5	Die Assemblierung der F <sub>1</sub> F <sub>O</sub> -ATP Synthase beeinflusst die Assemblierung des Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -COX-Suprakomplexes	78
3.3.6	In Stämmen mit C-terminal modifizierter <i>Sue</i> liegt der Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -COX-Suprakomplex vollständig assembliert vor	81
3.3.7	Die Umgebung von <i>Sue</i> der ATP Synthase ändert sich, sobald der Cytochrom <i>c</i> -Oxidase- oder der Cytochrom <i>bc</i> <sub>1</sub> -Komplex nicht korrekt assembliert ist	83
3.3.8	<i>Sue</i> befindet sich in enger Nachbarschaft von <i>Cox2</i>	86
3.3.9	Hemmung der Aktivität der ATP Synthase führt zu einer Aufhebung der Vernetzbarkeit von <i>Sue</i> mit <i>Cox2</i>	88
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>90</b>
<b>4.1</b>	<b>Die Funktion von <i>Sue</i> in der mitochondrialen F<sub>1</sub>F<sub>O</sub>-ATP Synthase</b>	<b>90</b>
4.1.1	<i>Sue</i> ist in der Lage, Homodimere zu bilden	90
4.1.2	<i>Sue</i> spielt eine zentrale Rolle bei der Dimerisierung der F <sub>1</sub> F <sub>O</sub> -ATP Synthase	92
4.1.3	Erfolgt die Dimerisierung der ATP Synthase in dynamischer Weise oder liegt ein stabiles Dimeres vor?	92
4.1.4	Ist ein ATP Synthase-Dimeres eine Voraussetzung für die Bindung des ATPase-Inhibitor-Proteins INH <sub>1</sub> ?	94
4.1.5	<i>Sue</i> steht in engem Kontakt zu <i>Suk</i>	97

<b>4.2</b>	<b>Gibt es ein der Untereinheit k homologes Protein?</b>	<b>99</b>
<b>4.3</b>	<b>Interagiert die <math>F_1F_0</math>-ATP Synthase mit dem Cytochrom <math>bc_1</math>-Suprakomplex?</b>	<b>101</b>
4.3.1	Die Assemblierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase korreliert mit der Aktivität der Komponenten des Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplexes	101
4.3.2	Die Assemblierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase beeinflusst die Assemblierung des Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplexes	103
4.3.3	Die Untereinheit e der $F_1F_0$ -ATP Synthase ist wahrscheinlich Untereinheiten des Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplexes benachbart	105
4.3.4	Sue – ein Regulationsfaktor innerhalb der Atmungskette?	106
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>109</b>
<b>6.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>111</b>

## 1. Einleitung

Die Zellen von Eukaryonten sind im Gegensatz zu denjenigen von Prokaryonten durch Biomembranen in verschiedene Kompartimente unterteilt. Biomembranen bestehen aus einer Lipiddoppelschicht, in die Proteine eingelagert und an die Proteine angelagert sind. Sie sind selektiv permeabel: prinzipiell sind sie undurchlässig für Makromoleküle oder hydrophile Teilchen, mit Ausnahme von Wasser. Die in die Membranen integrierten Proteine können jedoch molekulare Pumpen oder Kanäle bilden, durch die nur ganz bestimmte Moleküle oder Ionen gelangen. Dadurch entstehen innerhalb der Zelle verschiedene Bereiche mit unterschiedlichem chemischen Milieu, in denen unterschiedliche, für jedes abgeteilte Kompartiment (Zellorganell) spezifische biochemische Reaktionen ablaufen. Neben Zellorganellen, die von einer einfachen Membran umgeben sind, wie dem Endoplasmatischen Reticulum, dem Golgi-Apparat, den Lysosomen und den Peroxisomen gibt es solche, die von zwei Membranen umgeben sind: den Zellkern, die Chloroplasten (in Pflanzen) und die Mitochondrien.

Die Tatsache, dass Mitochondrien und Chloroplasten von zwei Biomembranen umgeben sind, wird durch die Endosymbiontentheorie erklärt. Danach stammen diese Zellorganellen von Vorfahren heute existierender aerober Bakterien ab (R.G. Herrmann, 1997). Sie wurden vor etwa einer Milliarde Jahren endozytotisch von Eukaryonten als Symbionten aufgenommen. Sie wurden also zusätzlich von einer Membran der aufnehmenden Zelle umschlossen. Im Verlauf der Evolution verloren sie ihre Autonomie. Allerdings besitzen diese Organellen weiterhin eine eigene Erbinformation, die jedoch nur für einen kleinen Teil der Proteine innerhalb des Zellorganells kodiert. Die Erbinformation für den größeren Teil der Proteine ist im Zellkern lokalisiert.

### 1.1 Struktur und Funktion der Mitochondrien

Mitochondrien sind Zellorganellen von etwa 0,5-1  $\mu\text{m}$  Durchmesser und bis zu 10  $\mu\text{m}$  Länge. Durch die beiden sie umgebenden Biomembranen sind sie in vier Subkompartimente unterteilt: auf die äußere Membran folgt der Intermembranraum, der wiederum durch eine innere Membran von der Matrix abgegrenzt wird. Durch die Außenmembran, die von Poren aus Proteinen durchsetzt ist, können Moleküle bis zu einer Größe von ca. 3 kDa diffundieren. In

der Innenmembran befinden sich spezielle Transportsysteme, die selektiv den Import beziehungsweise Export definierter Moleküle oder Ionen erlauben.

In der Innenmembran lokalisiert beziehungsweise an sie assoziiert sind außerdem Enzyme des Fettsäurestoffwechsels, der Biosynthese von Aminosäuren, Pyrimidinen, Nukleotiden und Phospholipiden. Dort befinden sich auch die Enzyme, die für die Hauptaufgabe der Mitochondrien, die Energiegewinnung, benötigt werden: die Enzyme des Citratcyclus und der oxidativen Phosphorylierung. Um Raum für eine ausreichende Zahl dieser Enzymkomplexe zu schaffen, bildet die innere Membran der Mitochondrien Einstülpungen in die Matrix, Cristae genannt.

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* liegt die Erbinformation für nur 8 der etwa 600 mitochondrialen Proteine innerhalb der mitochondrialen Matrix. Damit stellt sich das Problem des Transports der kernkodierten Proteine im Anschluß an ihre Translation im Cytosol in das für sie vorgesehene Zellkompartiment sowie das Problem ihrer Assemblierung in größere makromolekulare Strukturen. Um ihren Transfer in den korrekten Bestimmungsort zu ermöglichen, besitzen die Proteine Erkennungssignale, die von Rezeptoren auf der Oberfläche von Zellorganellen erkannt werden (Hartl *et al.*, 1989; Schatz und Dobberstein, 1996; Neupert, 1997). Der Import der Proteine, die im entfalteten Zustand vorliegen müssen, wird durch Proteintranslokasen vermittelt, sowie durch Hilfsproteine, sogenannte Chaperone (Chirico *et al.*, 1988; Deshaies *et al.*, 1988; Caplan *et al.*, 1992). Weitere Chaperone unterstützen nach der Translokation der Proteine in die Mitochondrien ihre erneute Faltung und ihre Assemblierung in höhermolekulare Proteinkomplexe (Craig, 1993; Stuart *et al.*, 1994).

## 1.2 Der mitochondriale Elektronentransport

Die Hauptaufgabe von Mitochondrien liegt darin, chemisch gebundene Energie in Form von ATP bereitzustellen. Die Energie hierzu wird gewonnen, indem Elektronen von NADH beziehungsweise  $\text{FADH}_2$ , Molekülen mit niedrigem elektrochemischen Redoxpotential, entlang einer Folge von Überträgermolekülen auf den Akzeptor Sauerstoff, der ein hohes elektrochemisches Redoxpotential besitzt, übertragen werden.

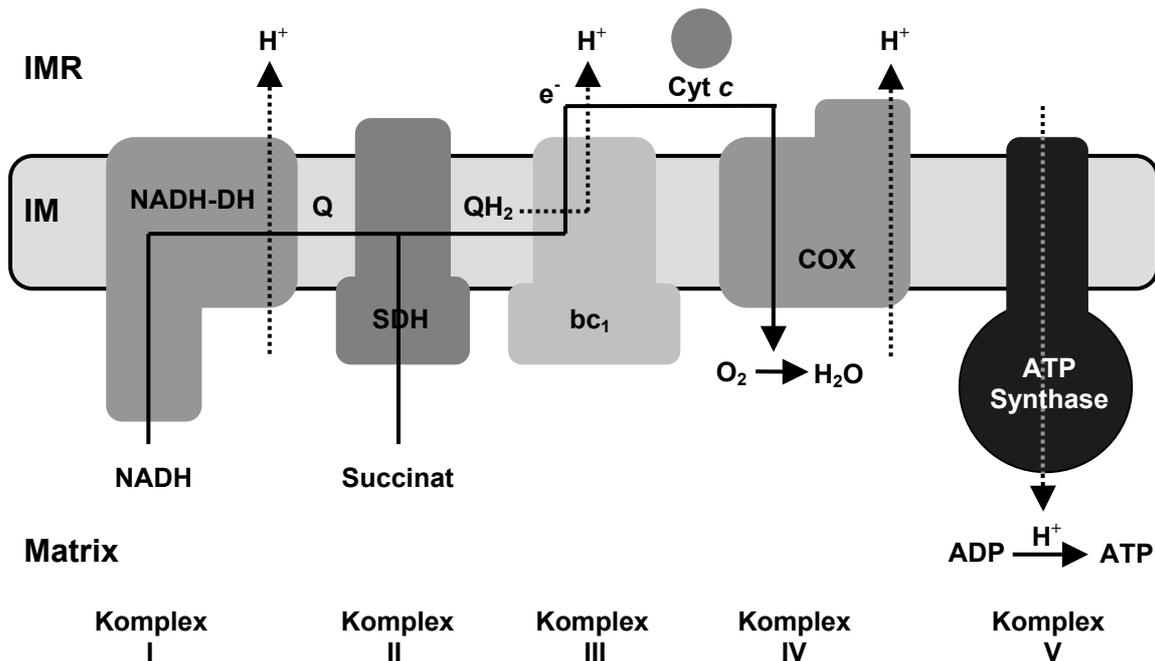
Die Überträgermoleküle bilden eine sogenannte Elektronentransportkette (auch als Atmungskette bezeichnet), die aus großen in die innere Membran der Mitochondrien eingebetteten Enzymkomplexen besteht und deren elektrochemisches Übertragungspotential schrittweise steigt: Komplex I

(NADH-Ubichinol-Oxidoreduktase), Komplex II (Succinat-Ubichinol-Oxidoreduktase), Komplex III (Cytochrom  $bc_1$ -Komplex) und Komplex IV (Cytochrom  $c$ -Oxidase).

Zunächst wird NADH durch Ubichinon, der oxidierten Form des Coenzym Q der NADH-Ubichinol-Oxidoreduktase, oxidiert, wobei Ubichinol entsteht. Die Elektronen werden dann unter Oxidation von Ubichinol (der reduzierten Form des Coenzym Q) auf den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex übertragen und von dort unter Vermittlung von Cytochrom  $c$ , einem peripher an die innere Membran assoziierten Molekül, auf die Cytochrom  $c$ -Oxidase weitergeleitet. Von dort erfolgt unter Bildung von Wasser ihre Übertragung auf Sauerstoff. Da  $FADH_2$  ein höheres elektrochemisches Potential als NADH besitzt, wird dieses Molekül erst durch die Succinat-Ubichinol-Oxidoreduktase oxidiert.

Die Übertragung der Elektronen innerhalb der Elektronentransportkette ist (außer bei der Succinat-Ubichinol-Oxidoreduktase) an einen Transfer von Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gekoppelt (Brandt und Trumppower, 1994; Tzagoloff, 1995; Brandt, 1997; Yoshikawa *et al.*, 1998; Michel, 1998). Dabei wird die Energie umgesetzt, die bei der Elektronenübertragung von einem Komplex der Atmungskette auf den folgenden frei wird. Es entsteht somit ein Protonengradient über die innere Membran. Durch Ausnützung dieses Protonengradienten erfolgt die katalytische Bildung von ATP aus ADP durch die  $F_1F_0$ -ATP Synthase (die auch als Komplex V bezeichnet wird). Dabei fließen Protonen durch einen Protonenkanal in dem Enzym vom Intermembranraum in die Matrix zurück (Abb.1). Diese Vorgänge sind als chemiosmotische Hypothese von Mitchell bekannt (Mitchell, 1961). Der Prozess des Elektronentransportes mit gekoppelter ATP-Synthese wird als oxidative Phosphorylierung bezeichnet (Übersicht: Saraste, 1999).

Die Übertragung der Elektronen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* erfolgt in etwas anderer Weise. Der Komplex I wird hier durch verschiedene NADH-Dehydrogenasen ersetzt (de Vries und Marres, 1987). Zwei davon sind in der inneren Membran lokalisiert und übertragen Elektronen von dem im Cytosol beziehungsweise in der Matrix gebildeten NADH auf Ubichinon. Eine weitere ist in der äußeren Membran lokalisiert und überträgt Elektronen direkt auf das Cytochrom  $c$ . Zudem befindet sich im Intermembranraum ein zusätzliches Enzym, das den Transfer von Elektronen von L-Lactat auf das Cytochrom  $c$  vermittelt, die L-Lactat-Cytochrom  $c$ -Oxidoreduktase oder Cytochrom  $b_2$  (de Vries und Marres, 1987).



**Abb.1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Elektronentransportkette (nach Saraste *et al.*, 1999). Beschreibung im Text.**

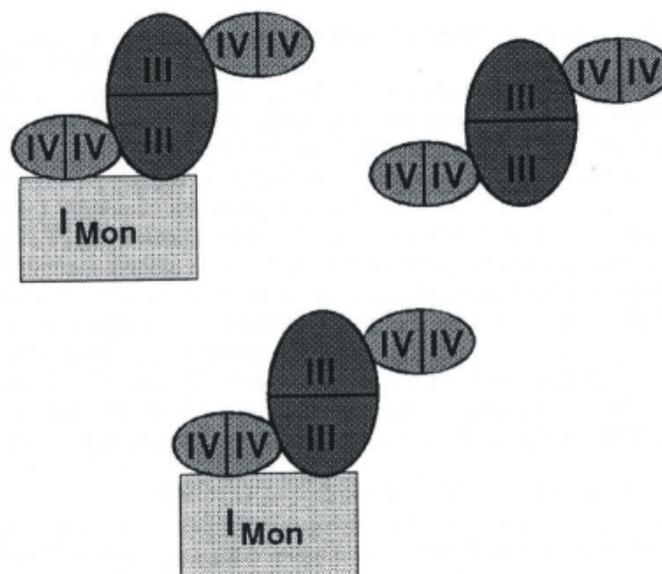
Unter Ausnutzung der Energie aus der Übertragung von Elektronen innerhalb der Elektronentransportkette werden Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Der Ausgleich des entstandenen Gradienten über die innere mitochondriale Membran durch die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase führt zur Synthese von ATP. NADH-DH=NADH-Ubichinol-Oxidoreduktase; SDH=Succinat-Ubichinol-Oxidoreduktase; bc<sub>1</sub>=Cytochrom bc<sub>1</sub>-Komplex; COX=Cytochrom c-Oxidase; Q/QH<sub>2</sub>=Ubichinon/Ubichinol; Cyt c=Cytochrom c

### 1.3 Suprakomplexe der Atmungskettenenzyme

Die Enzyme der oxidativen Phosphorylierung stellen große, in die innere Membran der Mitochondrien eingebettete Komplexe dar, die aus zahlreichen Untereinheiten aufgebaut sind. Der Elektronentransfer zwischen ihnen erfolgt durch kleinere Moleküle, das in der Membran lokalisierte Ubichinon und das im Intermembranraum befindliche Cytochrom c. Zur Organisation der Enzyme innerhalb der Membran sind zwei unterschiedliche Modelle entwickelt worden (Übersicht: Rich, 1984): Entsprechend dem „liquid state“-Modell diffundieren die Komponenten der Atmungskette lateral und frei beweglich in der Membran. Die Effizienz des Elektronentransfers zwischen den voneinander unabhängigen Komponenten hinge demnach vom Zufall ab, der durch den

Diffusionsvorgang bestimmt wäre (Gupte und Hackenbrock, 1988 a,b; Chazotte und Hackenbrock, 1989; Gupte *et al.*, 1989).

Nach dem „solid state“-Modell bilden die einzelnen Enzymkomplexe der Atmungskette einen stabilen und geordneten Suprakomplex. Hinweise auf eine stabile Organisation der Atmungskettenkomponenten ergaben kinetische Analysen, Titrationsanalysen und Untersuchungen zur Stöchiometrie (Rich, 1984; Boumans *et al.*, 1998; Hatefi und Rieske, 1967; Yu und Yu, 1980). Vor kurzem gelang es mittels Solubilisierung durch das milde Detergenz Digitonin makromolekulare Strukturen, die aus den Komplexen III und IV aufgebaut sind, aus Mitochondrien der Hefe zu isolieren (Cruciat *et al.*, 1999, 2000; Schägger und Pfeiffer, 2000). Anhand von Ergebnissen der Isolierung von Suprakomplexen aus Mitochondrien von Rindern und Studien zum stöchiometrischen Verhältnis der Komponenten der Atmungskette (Schägger und Pfeiffer, 2000, 2001; Hatefi, 1985) wurde das Modell eines stabilen Netzwerkes aus den Komponenten der Elektronentransportkette entwickelt (Abb.2). Es wurde als Respirasom bezeichnet (Schägger und Pfeiffer, 2000).



**Abb.2: Modell eines Netzwerkes aus Komponenten der Atmungskette von Säugermitchondrien (aus Schägger und Pfeiffer, 2000).**

Das Modell postuliert die Existenz von zwei Suprakomplexen aus den Komplexen I (Mon=Monomer), III und IV, sowie einem kleineren Suprakomplex aus den Komplexen III und IV der Atmungskette. Sie bilden wahrscheinlich ein Netzwerk in der Innenmembran der Mitochondrien.

### 1.3.1 Cytochrom $bc_1$ -Komplex und Cytochrom $c$ -Oxidase

Die Aufgabe des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes und der Cytochrom  $c$ -Oxidase ist es, Elektronen entsprechend einem elektrochemischen Gefälle weiterzuleiten, wobei die dadurch frei werdende Energie genutzt wird, um Protonen aus der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum zu pumpen.

Die Struktur des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes konnte vor kurzem mittels Röntgenbeugungsanalyse von Kristallen vollständig aufgeklärt werden (Iwata *et al.*, 1998). Der dimere Komplex des Enzyms aus *Saccharomyces cerevisiae* besitzt eine Molekularmasse von etwa 500 kDa und ist aus jeweils zehn Proteinuntereinheiten aufgebaut (Brandt *et al.*, 1994). Die Domänen der Untereinheiten Cytochrom  $c_1$  und des Rieske FeS-Proteins, die die redoxprothetischen Gruppen enthalten, sowie die Untereinheit 8 sind in den Intermembranraum exponiert. In der Matrix lokalisiert sind die Untereinheiten Core1 und Core2, Qcr1, Qcr6 und Qcr9. Durch die Verbindung der aminoterminalen Region von Qcr7 und Core1 sind diese Untereinheiten mit der Innenmembran verankert.

In der Innenmembran befinden sich weiterhin Cytochrom  $b$ , das ebenfalls eine redoxprothetische Gruppe enthält, und die Untereinheiten Qcr10 und Qcr11. Die Funktion der Untereinheiten, die keine prosthetischen Gruppen tragen, ist noch weitgehend ungeklärt. Im Cytochrom  $bc_1$ -Komplex von Bakterien sind sie, obwohl die enzymatische Aktivität des Komplexes demjenigen von Mitochondrien entspricht, nicht vorhanden (Yang und Trumppower, 1986; Kriauciunas *et al.*, 1989).

Ein Modell zum Protonentransfer durch die katalytisch aktiven Domänen innerhalb des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes wurde von Mitchell vorgeschlagen (Mitchell, 1975). Er wurde als „Q-Zyklus“ bezeichnet und später weiterentwickelt (Brandt und Trumppower, 1994; Brandt, 1996a,b; Crofts und Berry, 1998). Dieser Zyklus beschreibt die Übertragung von Elektronen, die aus der Oxidation von Ubichinol gewonnen werden, auf das im Intermembranraum lokalisierte Cytochrom  $c$ . Das Cytochrom  $c$  vermittelt die Übertragung der Elektronen aus der Oxidation des Ubiquinols auf die Cytochrom  $c$ -Oxidase. Diese Enzym überträgt sie wiederum unter Transfer von Protonen aus der Matrix in den Intermembranraum auf Sauerstoff, wobei Wasser entsteht (Wilkström, 1989, Babcock und Wilström, 1992; Konstantinov *et al.*, 1997; Michel, 1998; Wilkström, 1998).

Die Cytochrom  $c$ -Oxidase besteht in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* aus einem Dimer der Molekularmasse von etwa 500 kDa. Im Monomer

sind die mitochondrial kodierten und als katalytisch aktiv betrachteten Untereinheiten Cox1, Cox2 und Cox3 von bislang 8 bekannten kleineren, kernkodierten Untereinheiten umgeben (Taanman und Capaldi, 1992). Cox1 ragt mit dem N- und dem C-Terminus in die Matrix. Die N- und C-terminalen Regionen von Cox2 hingegen sind in den Intermembranraum exponiert (Tsukihara *et al.*, 1996; Yoshikawa *et al.*, 1998).

Der im Verlauf des oben beschriebenen Elektronentransfers durch den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex und die Cytochrom  $c$ -Oxidase aufgebaute Protonengradient über die innere mitochondriale Membran wird von der  $F_1F_0$ -ATP Synthase genutzt, um das energiereiche ATP herzustellen.

### **1.3.2 Struktur und Assemblierung des Cytochrom $bc_1$ -Suprakomplexes in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae***

Der Cytochrom  $bc_1$ -Suprakomplex setzt sich aus dem Cytochrom  $bc_1$ -Komplex (Komplex III) und der Cytochrom  $c$ -Oxidase (Komplex IV der Elektronentransportkette) zusammen. Limitierend für die Quantität des Suprakomplexes ist die Menge an Cytochrom  $c$ -Oxidase innerhalb der Membran. Diese wiederum hängt von den Wachstumsbedingungen, denen der betreffende Organismus ausgesetzt ist, ab. (Schägger und Pfeiffer, 2000). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* besitzt der Suprakomplex eine Molekular-masse von geschätzten 1000 kDa und ist vermutlich aus zwei Cytochrom  $c$ -Oxidasen und zwei Cytochrom  $bc_1$ -Komplexen zusammengesetzt (Cruciat *et al.*, 2000; Schägger und Pfeiffer, 2000). Jede der beiden Komponenten des Suprakomplexes kann als Dimeres isoliert werden, wenn die andere nicht assembliert ist. Das bedeutet, dass die Komponenten zunächst vollständig zu einem funktionsfähigen dimeren Molekül assemblieren, bevor der Cytochrom  $bc_1$ -Suprakomplex entsteht (Cruciat *et al.* 2000).

## 1.4 Die mitochondriale $F_1F_0$ -ATP Synthase

Die  $F_1F_0$ -ATP Synthase spielt in allen lebenden Organismen bei der Synthese des Energiespeichers ATP eine entscheidende Rolle. Während sie bei Prokaryonten in der Plasmamembran lokalisiert ist, befindet sie sich bei Eukaryonten in der inneren Membran von Chloroplasten und Mitochondrien. Das Enzym fungiert auf verschiedene Art und Weise: Als ATP Synthase bildet es unter Ausnutzung der Energie des Protonengradienten über die innere Membran ATP; es ist jedoch auch in der Lage, ATP zu hydrolysieren, um Protonen entgegen einem elektrochemischen Gradienten aus der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien zu pumpen.

### 1.4.1 Struktur und Funktion der mitochondrialen $F_1F_0$ -ATP Synthase

Die Struktur der  $F_1F_0$ -ATP Synthase ist bei Prokaryonten und Eukaryonten ähnlich, allerdings ist die mitochondriale  $F_1F_0$ -ATP Synthase von Eukaryonten, insbesondere der  $F_0$ -Sektor, etwas komplizierter aufgebaut. Besonders gut untersucht ist hier die Struktur der  $F_1F_0$ -ATP Synthase von Rindermitochondrien, deren Kristallstruktur zu einem großen Teil bekannt ist (Abrahams *et al.*, 1994; Menz *et al.*, 2001).

Die mitochondriale  $F_1F_0$ -ATP Synthase kann funktionell in zwei unterschiedliche Domänen unterteilt werden: Der  $F_1$  (Faktor 1)-Sektor ragt in die Matrix und birgt die katalytische Aktivität für ATP-Synthese und ATP-Hydrolyse. Der  $F_0$  (Faktor Oligomycin)-Sektor ist in der inneren Membran lokalisiert und bildet einen Protonenkanal über den ein Protonenausgleich möglich ist, indem Protonen vom Intermembranraum in die Matrix fließen (Boyer, 1993; Pedersen, 1996; Boyer, 1997; Weber und Senior, 1997; Engelbrecht und Junge, 1997). Der  $F_0$ - und der  $F_1$ - Sektor werden durch den  $F_A$ -Sektor miteinander verbunden (Abb.3).

Die  $F_1$ -Domäne ist wasserlöslich und kann leicht aus dem Enzymkomplex gelöst werden. Sie ist in Pro- und Eukaryonten identisch und besteht aus fünf unterschiedlichen Untereinheiten:  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  und  $\epsilon$  in einem stöchiometrischen Verhältnis von 3:3:1:1:1. Die homologen Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  sind alternierend um die Untereinheit  $\gamma$  angeordnet. Die beiden ersteren sind in der Lage, Nukleotide zu binden, aber nur die Untereinheit  $\beta$  ist an der katalytischen Aktivität des Enzyms beteiligt. Somit besteht die katalytisch aktive Domäne

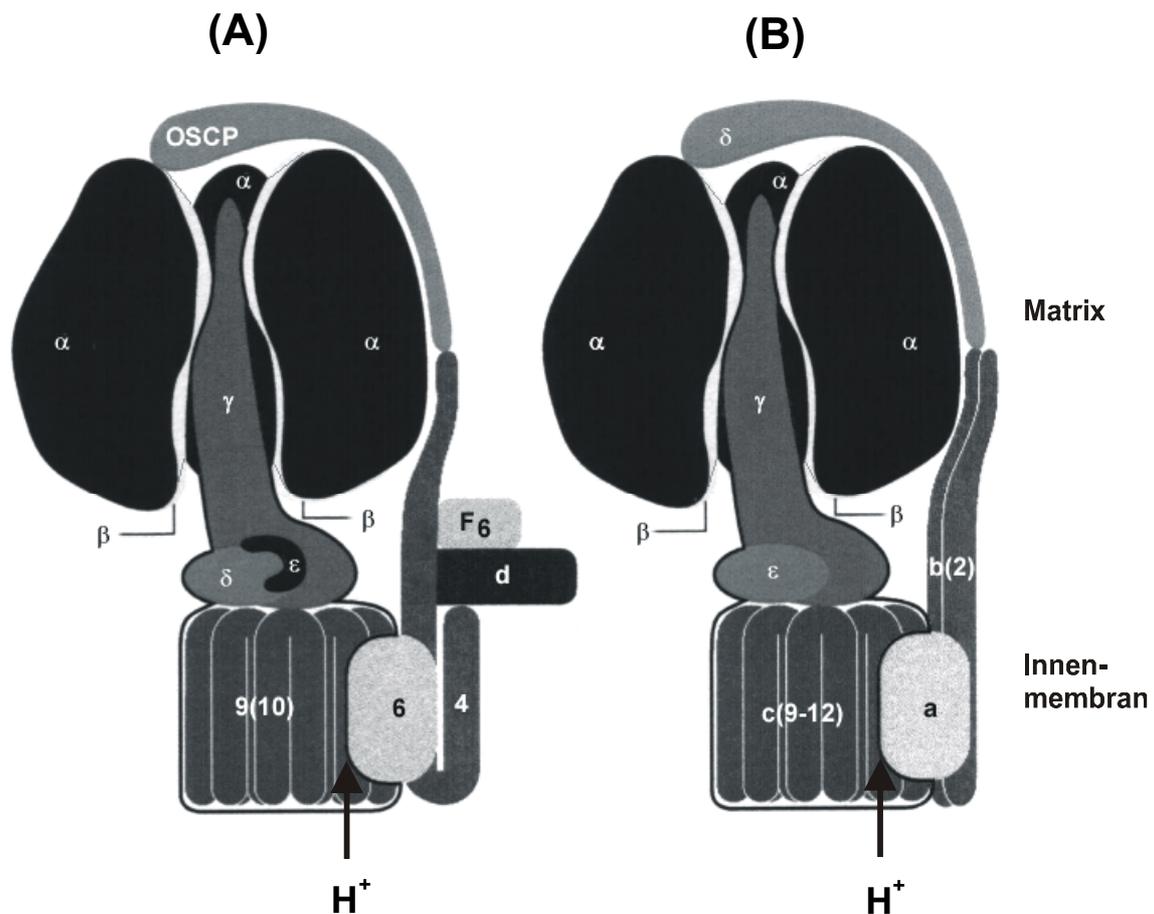
der  $F_1F_0$ -ATP Synthase aus drei aktiven, um die Untereinheit  $\gamma$  rotierenden Bindungsstellen, die drei unterschiedlichen Stadien der Katalyse (bei der Synthese von ATP) entsprechen: Stadium 1 „offen“ entspricht einer leeren Bindungsstelle; Stadium 2 „locker“ entspricht einem Zustand mit gebundenem ADP und Phosphat; Stadium 3 „fest“ entspricht dem Zustand mit fest gebundenem ATP. Energie wird nicht für die Bildung von ATP selbst, sondern für die Bindung der Substrate und die Ablösung von ATP aus dem katalytischen Zentrum benötigt („binding exchange mechanism“ Boyer, 1997). Hierbei spielt die Interaktion des (statischen) Hexamers aus den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  mit der (in Abhängigkeit des Protonengradienten rotierenden) Untereinheit  $\gamma$  eine zentrale Rolle: Die Untereinheit  $\gamma$  tritt mit dem C-terminalen Ende der Untereinheiten  $\beta$  in Kontakt, wobei die katalytischen Bindungsstellen geöffnet beziehungsweise geschlossen werden (Abrahams *et al.*, 1994). Dadurch wird die Aufnahme von ADP und Phosphat und die Ablösung von ATP erleichtert. Die Hydrolyse von ATP erfolgt durch eine Rotation der ATPase in die entgegengesetzte Richtung unter Energiefreisetzung und Umkehrung der Protonenflußrichtung (Noji *et al.*, 1997; Omote *et al.*, 1999; Yasuda *et al.*, 2001). Kürzlich wurde das Modell des „binding exchange mechanism“ von Boyer, die eine leere, offene Bindungsstelle voraussetzt, angezweifelt, weil die berechnete Drehrichtung bei der ATP-Hydrolyse und ATP-Synthese hier identisch wäre. Es wurde deshalb ein Mechanismus vorgeschlagen, bei dem alle katalytisch aktiven Bindungsstellen von Substrat besetzt sind (Weber und Senior, 2001).

Die  $F_A$ -Domäne besteht aus zwei parallel angeordneten stielähnlichen Strukturen, die aus Untereinheiten der  $F_0$ - und  $F_1$ - Domäne zusammengesetzt sind. Sie bilden ein zentral lokalisiertes, rotierendes und ein peripher lokalisiertes, unbewegliches Verbindungsstück. Das zentrale Verbindungsstück ist in Eubakterien aus den Untereinheiten  $\epsilon$  und  $\gamma$  zusammengesetzt, in Mitochondrien aus den Untereinheiten  $\delta$  (entspricht der bakteriellen Untereinheit  $\epsilon$ ),  $\epsilon$  und  $\gamma$ . Durch seine Rotation ist es in die katalytische Funktion der  $F_1F_0$ -ATP Synthase involviert und ist eng an den Protonentransport durch den  $F_0$ -Sektor gekoppelt. Das periphere Verbindungsstück besteht in Eubakterien aus den Untereinheiten  $b$  und  $\delta$ , in Mitochondrien aus den Untereinheiten  $F_6$ ,  $b$ ,  $d$  und OSCP (oligomycin-sensitivity conferral protein; entspricht der bakteriellen Untereinheit  $\delta$ ). Es verbindet wahrscheinlich den Ring aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten der  $F_1$ - Domäne statisch mit der membrangebundenen  $F_0$ -

Domäne (Boyer, 1997; Bottcher *et al.*, 1998; Karrasch und Walker, 1999; Gibbons *et al.*, 2000).

Die  $F_0$ -Domäne nimmt eine zentrale Funktion bei der Umsetzung des Protonengradienten über die innere Membran in die katalytisch wirksame Rotation des Enzyms ein. Im Vergleich zur  $F_0$ -Domäne der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase ist diejenige der bakteriellen  $F_1F_0$ -ATP Synthase relativ einfach aufgebaut. Ihre drei Untereinheiten a, b und c sind in die Plasmamembran eingebettet (ein Teil von b ragt in die Matrix) und liegen in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:2:9-12 vor (Jones *et al.*, 1998). Die Stöchiometrie der Untereinheiten scheint allerdings abhängig von der Kohlenstoffquelle zu sein (Schemidt *et al.*, 1998). Die Untereinheiten c bilden wahrscheinlich einen zentral lokalisierten Ring, der sich synchron mit der Rotation der Untereinheit  $\gamma$  der  $F_1$ -Domäne in der Membran bewegt. Er kann gemeinsam mit ihr isoliert und kristallisiert werden. Dabei ist das C-terminale Ende jeder Untereinheit c nach außen, das N-terminale Ende in das Zentrum des Ringes orientiert (Sambongi *et al.*, 1999; Stock *et al.*, 1999, 2000).

Die Bewegung des Ringes erfolgt, wie es scheint, relativ zur der Untereinheit a. Diese wiederum besitzt wahrscheinlich fünf Transmembrandomänen, die basische und saure Aminosäurereste enthalten. Dies würde eine Protonentranslokation begünstigen (Valiyaveetil und Fillingame, 1998; Wada *et al.*, 1999). Durch den Durchfluß von positiv geladenen Protonen würden exponierte, negativ geladene Aminosäurereste (Glu65) der Untereinheiten c neutralisiert, die dann nicht mehr von einem positiv geladenen Aminosäurerest (Arg227) der Untereinheit a elektrochemisch angezogen würden. Die Untereinheit c wäre somit nicht mehr fixiert, es käme zu einer durch thermische Vibrationen erzeugten Drehung. Eine Drehung des Ringes aus 9-12 Untereinheiten c und der damit verbundenen Untereinheit  $\gamma$  der  $F_1$ -Domäne wäre somit gekoppelt an den Protonentransport durch die Membran (Modell von Junge *et al.* 1997).



**Abb.3:** Schematische Darstellung der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase (nach Stock *et al.*, 2000). Beschreibung im Text

Die Darstellungen wurden abgeleitet aus den aktuellen Erkenntnissen der Struktur des Enzyms aus (A) Mitochondrien. (B) Eubakterien. Die nicht direkt in die katalytische Aktivität involvierten kleineren Untereinheiten des F<sub>0</sub>-Sektors wurden nicht abgebildet.

In Mitochondrien von Eukaryonten ist die F<sub>0</sub>-Domäne komplizierter aufgebaut. Zusätzlich zu den seit längerem bekannten Untereinheiten 6, 4 und 9 (sie entsprechen den Untereinheiten a, b und c aus *E. coli*) enthält sie auch die Untereinheiten d und 8 (A6L), sowie F6, die bislang in der Hefe nicht gefunden wurde (Collinson *et al.*, 1994, Law *et al.*, 1995). In der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase von Rindern wurden weiterhin die Untereinheiten e, f und g identifiziert (Walker *et al.*, 1991, 1995), die kürzlich auch in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* gefunden wurden (Arnold *et al.*, 1997, 1998; Vaillier *et al.*, 1999; Boyle *et al.*, 1999). Außerdem enthält das Enzym in der Hefe Untereinheiten, die bis jetzt noch nicht in Enzymen von Säugern gefunden wurden:

die Untereinheiten h, j (i), und k (Arselin *et al.*, 1996; Spannagel *et al.*, 1997; Arnold *et al.*, 1998, 1999; Vaillier *et al.*, 1999).

Wie es auch bei den anderen Enzymen der Atmungskette der Fall ist, sind die Untereinheiten der Enzymkomplexe teilweise kern- und teilweise mitochondrial kodiert (Law *et al.*, 1995; Walker *et al.*, 1991, 1995). Im Organismus *Saccharomyces cerevisiae* sind die Untereinheiten 6, 8 und 9, die eine wichtige Rolle bei der Assemblierung des F<sub>O</sub>-Sektors spielen, mitochondrial kodiert, alle anderen Untereinheiten des F<sub>O</sub>-, F<sub>A</sub>- und F<sub>1</sub>- Sektors sind kernkodiert.

**Tabelle 1:** Untereinheiten der F<sub>O</sub>-Domäne der F<sub>1</sub>F<sub>O</sub>-ATP Synthase des Organismus „*Saccharomyces cerevisiae*“. Die unterstrichenen Gene sind mitochondrial kodiert.

Untereinheit	Gen	Aminosäurereste	Masse (kDa)	Homologes in <i>E.coli</i>	Funktion
Su6	<u>ATP6</u>	249	27,9	Su a	Protonenkanal
Su9	<u>ATP9</u>	76	3,5	Su c	Protonenkanal
Su8	<u>ATP8</u>	48	5,9	-	Assemblierung?
Su4	ATP4	209	23,3	Su b	peripherer Stiel
OSCP	ATP5	195	20,9	δ	peripherer Stiel
Sud	ATP7	173	19,7	-	peripherer Stiel
Suh	ATP14	92	9,5	-	Assemblierung?
Suf	ATP17	95	10,6	-	Assemblierung?
Sui/j	ATP18	59	6,7	-	Assemblierung?
Suk	ATP19	68	7,5	-	unbekannt
Sug	ATP20	115	12,8	-	Dimerisierung?
Sue	ATP21	96	10,9	-	Dimerisierung?

Eine bedeutende Rolle bei der Biogenese der F<sub>1</sub>F<sub>O</sub>-ATP Synthase spielen weitere Proteine, die nicht als Untereinheiten des Enzyms betrachtet werden. ATP10 wird für die Assemblierung des F<sub>O</sub>-Sektors benötigt (Ackerman und Tzagoloff, 1990b). ATP11 und ATP12 sind essentiell für die Assemblierung des F<sub>1</sub>-Sektors (Ackerman und Tzagoloff, 1990a; Ackerman *et al.*, 1992; Bowman *et al.*, 1991).

#### 1.4.2 Die $F_1F_0$ -ATP Synthase liegt als dimerer Komplex vor

Kürzlich wurde belegt, dass die mitochondriale  $F_1F_0$ -ATP Synthase in dimerer Form vorliegt (Arnold *et al.*, 1998; Schägger und Pfeiffer, 2000). Hierbei wurden die Mitochondrien unter sehr milden Lysebedingungen bei Anwendung geringer Mengen des schwachen nichtionischen Detergenz Digitonin solubilisiert. Die Untersuchung des Lysates erfolgte mittels blauer Nativgelelektrophorese. Es konnten zwei Formen der  $F_1F_0$ -ATP Synthase mit einer Molekularmasse von etwa 500 kDa und etwa 1000 kDa nachgewiesen werden. Ihre Größe entsprach derjenigen der monomeren beziehungsweise der dimeren Form des Enzyms. Die Analyse der einzelnen Untereinheiten des Monomers und des Dimers mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestätigte die Annahme, dass es sich um ein Monomer und ein Dimer der  $F_1F_0$ -ATP Synthase handelt. Wurde nach der Solubilisierung zur Isolierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase die Technik der Gelfiltration angewendet, erhielt man ausschließlich die dimere Form des Enzyms mit einer Molekularmasse von etwa 1000 kDa (Arnold *et al.*, 1997). Somit handelt es sich bei der monomeren Form der ATP Synthase wahrscheinlich um ein im Verlauf der blauen Nativgelelektrophorese gebildetes Artefakt. Das Dimere der  $F_1F_0$ -ATP Synthase wurde nach einer milden Solubilisierung der Zellorganellen mit dem Detergenz Digitonin auch in Mitochondrien von Rindern nachgewiesen (Schägger und Pfeiffer, 2000).

Zur Isolation des Dimers der  $F_1F_0$ -ATP Synthase sind sehr milde Lysebedingungen nötig sind. So führte die Verwendung steigender Konzentrationen des milden nichtionischen Detergenz Triton X-100 zur Erhöhung des Anteils an monomerer ATP Synthase gegenüber der dimeren Form (Arnold *et al.*, 1998). Die Anwendung zu aggressiver Solubilisierungsbedingungen ist deshalb möglicherweise der Grund dafür, warum bisher in anderen Untersuchungen keine dimere Form der ATP Synthase nachgewiesen wurde.

#### 1.4.3 Dimerspezifische Untereinheiten des $F_0$ -Sektors der ATP Synthase

Im Vergleich zum  $F_0$ -Sektor der bakteriellen  $F_1F_0$ -ATP Synthase ist, wie bereits erwähnt, der  $F_0$ -Sektor des mitochondrialen Enzyms von *Saccharomyces cerevisiae* erheblich komplexer gebaut. Es konnte bisher nicht beobachtet werden, dass die im  $F_0$ -Sektor der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP zusätzlich vorhandenen Untereinheiten direkt in die Umsetzung eines Protonengradienten in

motorische Bewegung involviert sind (Übersicht: Devenish *et al.*, 2000). Einige dieser Untereinheiten, beispielsweise den Untereinheiten 8, f, h oder i/j, sind allerdings für die Assemblierung des  $F_0$ -Sektors und somit einer funktionell aktiven  $F_1F_0$ -ATP Synthase von Bedeutung sind (Marzuki *et al.*, 1989; Spannagel *et al.*, 1997; Arselin *et al.*, 1996; Vaillier *et al.*, 1999; Arnold *et al.*, 1999).

Die Analyse des mittels blauer Nativgelelektrophorese isolierten monomeren beziehungsweise dimeren Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase durch anschließende hochauflösende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ergab, dass der dimere Komplex gegenüber dem Monomeren zusätzliche Untereinheiten enthielt. Die Isolierung dieser Untereinheiten, ihre Sequenzierung und ein Abgleich der gewonnenen Daten mit der Hefegenom-Datenbank führte zur ihrer Identifizierung.

Es handelte sich um die im  $F_0$ -Sektor lokalisierten Untereinheiten e, g und k. Da sie nur in der dimeren, nicht aber in der monomeren Form der ATP Synthase nachweisbar waren, wurden sie als dimerspezifische Untereinheiten bezeichnet (Arnold *et al.*, 1998). *Sue* und *Sug* sind in der inneren Membran der Mitochondrien lokalisiert, während *Suk* dem  $F_0$ -Sektor peripher assoziiert ist.

Die Disruption der Untereinheiten e, g und k wirkte sich nicht nachweisbar auf die katalytische Funktion der  $F_1F_0$ -ATP Synthase aus. Die Oligomycin-sensitive ATPase-Aktivität der ATP Synthase entsprach in *Sue*-, *Suk*- und *Sug*- Nullmutanten derjenigen intakter Wildtypformen (Arnold *et al.*, 1998; Boyle *et al.*, 1999). Somit sind die dimerspezifischen Untereinheiten nicht essentiell für die Funktion des Enzyms.

Eine weitere Untersuchung der Disruptanten zeigte jedoch eine Auswirkung der Disruption auf die Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase: In Abwesenheit von *Sue* beziehungsweise *Sug* konnte die dimere Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase mittels blauer Nativgelelektrophorese nach Solubilisierung der betreffenden Mitochondrien unter sehr milden Bedingungen nicht mehr nachgewiesen werden. Somit sind *Sue* und *Sug* notwendig für die Assemblierung eines stabilen Dimeren der  $F_1F_0$ -ATP Synthase.

Das Fehlen von *Suk* hat hingegen keine Auswirkungen auf den Assemblierungszustand des Enzyms (Arnold *et al.*, 1998).

Für die Untereinheit g wurde außerdem eine Funktion bei der Interaktion der  $F_1F_0$ -ATP Synthase und der Cytochrom *c*-Oxidase postuliert. Es zeigte sich, dass die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase in Abwesenheit von Sug um etwa 30 % reduziert war (Boyle *et al.*, 1999). Die Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase scheint in Sug Nullmutanten jedoch nicht betroffen zu sein. Deshalb vermuten die Autoren, dass die Reduktion der Aktivität der Oxidase eine direkte Folge des Fehlens von Sug sein könnte.

Die dimerspezifischen Untereinheiten werden nicht unabhängig voneinander exprimiert: Die Anwesenheit von Sue beeinflusst die stabile Expression von Sug und Suk. In Sue Disruptanten konnten diese beiden Untereinheiten nicht nachgewiesen werden (Arnold *et al.*, 1998). Für eine stabile Expression von Suk ist außerdem die Anwesenheit von Sug erforderlich. Auf der anderen Seite wird Sue in Sug Disruptanten exprimiert, allerdings in geringeren Mengen. Eine Disruption von Suk hingegen beeinflusst die Expression der beiden anderen dimerspezifischen Untereinheiten nicht.

#### 1.4.4 Die Untereinheit e der $F_1F_0$ -ATP Synthase

Die Untereinheit e der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde zunächst als Bestandteil der Translokations-Maschinerie der inneren Membran betrachtet (Tokatlidis *et al.*, 1996). Das entsprechend als Tim11 bezeichnete Protein konnte chemisch mit dem Sortierungssignal von Cytochrom *b*<sub>2</sub> quervernetzt werden. Es wurde darum postuliert, dass Tim11 innerhalb der Translokations-Maschinerie am Import und der Sortierung von Proteinen der inneren mitochondrialen Membran beteiligt ist. Es konnte allerdings nicht gezeigt werden, dass Tim11 tatsächlich eine Komponente der TIM-Maschinerie ist.

In einer späteren Veröffentlichung wurde das Protein eindeutig als Untereinheit e der  $F_0$ -Domäne der ATP Synthase identifiziert (Arnold *et al.*, 1997). Es wurde beobachtet, dass die Aminosäuresequenz mit Ausnahme einer um 30 Aminosäuren längeren C-terminalen Region eine signifikante Sequenzähnlichkeit zu Untereinheiten e von weiteren mitochondrialen ATP Synthasen verschiedener Säugerorganismen aufweist. Die Sequenzähnlichkeit zu Untereinheiten e von Säugern erstreckt sich auch auf das Profil der Transfer-Energie und die Wahrscheinlichkeit, sogenannte „coiled-coil“-Strukturen zu bilden. Dieses „coiled-coil“-Motiv findet man bei vielen Proteinen, die dimere Strukturen ausbilden.

Es gelang außerdem, *Sue* mit den Untereinheiten  $\alpha$  und  $\beta$  des  $F_1$ -Sektors der ATP Synthase auf einer Gelfiltrationssäule zu kofraktionieren. Durch spezifische Koimmunfällung von *Sue* mit Antikörpern gegen  $F_1\alpha$  wurde ein weiterer Beweis erbracht, dass *Sue* ein Bestandteil der  $F_1F_0$ -ATP Synthase ist.

In sogenannten  $\rho^0$ -Stämmen, in denen die mitochondriale Erbinformation fehlt, ist der  $F_0$ -Sektor der  $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht assembliert. Seine Untereinheiten werden demzufolge nicht exprimiert. In diesen Stämmen wurde *Sue* nicht, Cytochrom  $b_2$  dagegen vollständig exprimiert. Auch dieses Ergebnis bestätigte, dass *Sue* nicht als eine Untereinheit der inneren Translokationsmaschinerie an der Sortierung von Cytochrom  $b_2$  beteiligt, sondern eine Untereinheit der ATP Synthase ist. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb die Bezeichnung Tim11 durch die Bezeichnung *Sue* (für „Untereinheit e“ der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase) ersetzt.

*Sue* besitzt eine Molekularmasse von 10,9 kDa und ist aus 96 Aminosäureresten zusammengesetzt. Sie besitzt eine Transmembrandomäne, wobei der C-Terminus in den Intermembranraum und der N-Terminus in die mitochondriale Matrix exponiert ist (Arnold *et al.*, 1997). Wie auch für weitere Homologe aus Säugern beschrieben (Belogradov *et al.*, 1996), besitzt die Sequenz von *Sue* das Potential, eine sogenannte „coiled-coil“-Struktur auszubilden. Dies wiederum impliziert theoretisch die Fähigkeit zu dimerisieren. Aus *Sue* Disruptanten ließ sich nach schonender Lyse mit dem Detergenz Digitonin und anschließender blauer Nativgelelektrophorese kein stabiles ATP Synthase-Dimeres isolieren. Aufgrund dieser Tatsache und seinem Potential „coiled-coil“-Strukturen zu bilden, wird das Protein deshalb als ein Dimerisierungsfaktor der  $F_1F_0$ -ATP Synthase diskutiert, wobei es eventuell von Sug unterstützt wird (Arnold *et al.*, 1998).

Hefezellen, in denen *Sue* disruptiert worden war, zeigten auf nicht fermentierbaren Kohlenstoffquellen ein vermindertes Wachstum, was auf eine verminderte Atmungsleistung zurückzuführen ist (Tokatlidis *et al.*, 1997; Arnold *et al.*, 1998). Die Assemblierung zu einem funktionell aktiven Protein wurde jedoch durch das Fehlen von *Sue* nicht beeinträchtigt (Arnold *et al.*, 1998). Allerdings wurde beobachtet, dass in *Sue* Nullmutanten die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase um etwa 50% reduziert ist (Tokatlidis *et al.*, 1997).

## 1.5 Fragestellung und Zielsetzung

(1) Nachdem die Untereinheit  $e$  der  $F_1F_0$ -ATP Synthase aus *Saccharomyces cerevisiae* zugeordnet werden konnte, stellte sich nun die Frage nach der Funktion des Proteins innerhalb des Enzymkomplexes. Zunächst sollte untersucht werden ob *Sue*, entsprechend seinem Potential „coiled-coil“-Strukturen zu bilden, homo-dimere Strukturen ausbildet.

Wäre *Sue* in der Lage zu dimerisieren, könnte es als ein Dimerisierungsfaktor innerhalb der  $F_0$ -Domäne die Dimerisierung der ATP Synthase bewirken. Unterstützt wird das Modell einer wichtigen Funktion von *Sue* bei der Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase durch die Beobachtung, dass in *Sue*-Disruptanten kein stabiles ATP Synthase-Dimeres nachgewiesen werden kann.

(2) Im Zusammenhang mit der Untersuchung der Funktion von *Suk* wurde im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* eine weitere Sequenz entdeckt, die eine signifikante Homologie zu *Suk* aufweist. Diese Sequenz wurde  $Suk^{hom}$  genannt. Es sollte geklärt werden, ob das hypothetische Protein  $Suk^{hom}$  tatsächlich existiert und ob es eine noch unbekannte Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATP Synthase darstellt.

(3) Weiterhin sollte untersucht werden, welche Bedeutung die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase für die Zelle haben könnte. Verschiedene Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass der Verlust von möglicherweise an der Dimerisierung beteiligten Untereinheiten der ATP Synthase eine Reduzierung der Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase zur Folge hat. Es sollte entsprechend die Auswirkung der Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase auf Aktivität und Assemblierung der Komponenten III (Cytochrom  $bc_1$ -Komplex) und IV (Cytochrom *c*-Oxidase) der Elektronentransportkette untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 Verwendete Plasmide

**Tabelle 2 : Verwendete Plasmide**

Die Klonierungsstrategien für die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind unter 2.1.10 beschrieben.

<b>pGEM4-Plasmid</b>	<b>Referenz</b>
pGEM4-Sue	I. Arnold

<b>Yep51vK</b>	<b>Referenz</b>
YEP51-Oxa1	K. Hell
YEP51-Sue $\Delta$ C36	diese Arbeit
YEP51-Sue- His <sub>12</sub>	diese Arbeit

#### 2.1.2 Polymerase-Kettenreaktion

DNS-Fragmente können durch die „Polymerase-Kettenreaktion“ (PCR) spezifisch vervielfältigt werden (Saiki *et al.*, 1985, 1988). Eine exponentielle Synthese der DNS-Fragmente wird dabei durch den wiederholten Ablauf von Strangtrennung, Anlagerung zweier Oligonukleotide („Primer“), die zu bestimmten Sequenzen der DNS-Matrize komplementär sind, und DNS-Synthese mit einer hitzebeständigen DNS-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* (*Taq* DNS-Polymerase) erreicht. Hierbei werden die freien 3'-Enden der Primer zu zwei neuen komplementären DNS-Strängen verlängert. Jeder Reaktionsansatz (50-100  $\mu$ l) enthielt 1-2 U *Taq* DNS-Polymerase, je 50  $\mu$ M dNTPs und je 400  $\mu$ M Oligonukleotid in dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Als Matrize dienten 0,1  $\mu$ g Plasmid-DNS bzw. 0,1  $\mu$ g genomische DNS des Hefestammes W303-1A (vgl. 2.2.1). Alle Proben wurden mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um ein Verdampfen der Reaktionslösung zu verhindern. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde folgendermaßen durchgeführt:

- |                           |  |
|---------------------------|--|
| 1. 3 min, 94°C            | Inaktivierung von Nukleasen und vollständige Denaturierung |
| 2. 30 Zyklen: 1 min, 94°C | Denaturierung der DNS                                      |
| 1 min, 45°C               | Binden der Oligonukleotide                                 |
| 1,5 min, 72°C             | Polymerasekettenreaktion                                   |
| 3. 4 min, 72°C            | Vervollständigung des letzten Reaktionsschrittes           |
| 4. Abkühlen auf 4°C       |  |

Zur Kontrolle der Reaktion wurden anschließend 5% des Ansatzes auf einem Agarosegel analysiert (2.1.6). Das restliche Produkt wurde mit Phenol extrahiert und mit Ethanol gefällt (2.1.5). Die überhängenden DNS-Enden wurden mit Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I aus *E.coli* aufgefüllt (2.1.8). Nach erneuter Phenolextraktion wurde die DNS gefällt und mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut (2.1.8). Durch präparative Gelelektrophorese (2.1.7) wurde das modifizierte PCR-Produkt von Nebenprodukten getrennt und in einen geeigneten Vektor ligiert (2.1.8).

### 2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNS aus *E.coli*

#### a) Minipräparationen von DNS

Um Klone eines Transformationsexperimentes zu analysieren, wurde die Plasmid-DNS in kleinem Maßstab nach der Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) isoliert. Hierfür wurden einzelne Bakterienklone in 2-5 ml LB-Amp-Medium (siehe unten) über Nacht aerob bei 37°C geschüttelt. 1,5 ml der Über-Nacht-Kultur wurden abzentrifugiert (14000 UpM, Tischzentrifuge, 1 min). Die sedimentierten Bakterien wurden in 100µl GTE-Lösung (50 mM Glukose; 25 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA) resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Lyse erfolgte anschließend durch Zugabe von 200 µl 0,2 M NaOH und 1% (w/v) SDS. Nach einer Inkubation für 3 min auf Eis wurden die Proben mit 150 µl 3 M KOAc (pH 4,8) neutralisiert und für 10 min zentrifugiert (14000 UpM, Tischzentrifuge). Der Überstand wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und mit Ethanol gefällt (2.1.5). Die bei RT getrocknete DNS wurde in 20 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert. 2-4 µl der DNS-Lösung wurde durch Restriktionsverdau (2.1.8) analysiert.

### *b) Maxipräparationen von DNS*

Für Präparation größerer Mengen Plasmid-DNS (bis 0,5 mg) wurde der „Jetstar-Kit“ der Firma Genomed benutzt. Eine Anionen-Austauschersäule wurde mit 30 ml Lösung E4 (0,6 M NaCl; 0,1 M NaOAc (pH 5,0); 0,15% Triton X-100) äquilibriert. Währenddessen wurden *E.coli*-Zellen aus 100 ml einer Über-Nacht-Kultur in LB-Amp-Medium (siehe unten) durch Zentrifugation (4000 UpM, Beckman JA10-Rotor, 5 min, RT) geerntet. Die Bakterien wurden in 10 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl (pH 8,0); 10 mM EDTA) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 10 ml Lösung E2 (200 mM NaOH; 1% SDS) für 5 min bei RT lysiert. Das Zell-Lysat wurde durch Zugabe von 11 ml Lösung E3 (3,2 M KOAc (pH 5,5)) neutralisiert. Nach einer Zentrifugation (12000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 10 min, RT) wurde der Überstand auf die äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wurde anschließend mit 60 ml Lösung E5 (800 mM NaCl; 100 mM NaOAc (pH 5,0)) gewaschen. Im darauffolgenden Schritt erfolgte die Elution der Plasmid-DNS mit 15 ml Lösung E6 (1,25 M NaCl; 100 mM Tris/HCl (pH 8,5)). Die DNS wurde durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und anschließender Zentrifugation (12000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 30 min, 4°C) aus dem Eluat gefällt. Die DNS wurde mit 70%-igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 200 µl H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei -20°C gelagert. 1 µl DNS-Lösung wurde auf einem Agarosegel analysiert (2.1.6) und die Konzentration der DNS bestimmt (2.1.4).

*LB-Medium:* 10 g/l Bacto-Trypton; 5 g/l Bacto-Hefeextrakt; 10 g/l NaCl; pH 7,4 mit NaOH einstellen.

*LB-Amp-Medium:* zusätzlich 100 mg/l Ampicillin (sterilfiltriert)

### **2.1.4 Konzentrationsbestimmung der DNS**

Die Konzentration von DNS wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm (OD<sub>260</sub>) photometrisch bestimmt. Eine OD<sub>260</sub> von 1 entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNS bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNS (linearer Bereich: 0,1-1 OD).

### 2.1.5 Phenolextraktion und Ethanolfällung

Durch Phenolextraktion werden Proteinverunreinigungen aus DNS-haltigen Lösungen entfernt (Sambrook *et al.*, 1989). Hierbei wurde Phenol verwendet, das mit 1/20 Volumen Tris/HCl (pH 8,0) äquilibriert worden war.

Die zu reinigende DNS-Lösung wurde mit dem gleichen Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und zur Phasentrennung 1 min zentrifugiert (14000 UpM, Eppendorf Tischzentrifuge, RT). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt und wie zuvor zentrifugiert.

Nach der Phenolextraktion wurde die DNS-Lösung mit 1/10 Volumen einer 3 M NaOAc-Lösung (pH 6,0) und mit dem 2,5-fachen Volumen Ethanol versetzt und für 30 min bei  $-80^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (18000 UpM, Sigma 12145-Rotor, 30 min,  $2^{\circ}\text{C}$ ) wurde die DNS mit 70%-igem Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet, in 20  $\mu\text{l}$  H<sub>2</sub>O resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Durch Ethanolfällung werden wässrige DNS-Lösungen konzentriert und von unerwünschten Salzen befreit.

### 2.1.6 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Reinigung, Trennung und Identifizierung von DNS-Fragmenten wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Die Agarose wurde je nach Größe der zu analysierenden Fragmente zu 0,8-2% (w/v) in einem Mikrowellenherd in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat (pH 7,5); 20 mM NaOAc; 1 mM EDTA) gelöst und bei  $65^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Agarosegele enthielten Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,25 mg/l. Der Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid, der sich in die DNS einlagert und sie unter UV-Licht sichtbar macht, wurde zur Detektion der DNS-Banden auf dem Gel verwendet.

Als Elektrodenpuffer diente TAE-Lösung. Die zu analysierenden DNS-Lösungen wurden vor dem Auftragen mit 1/4 Volumen 5 x DNS-Probenpuffer (5 mM EDTA; 15% (w/v) Ficoll400; 0,05% (w/v) Bromphenolblau; 0,05% (w/v) Xylenylanol; 0,5% SDS; 0,2 M Tris/HCl (pH 7,5)) versetzt. Zum Längenvergleich der DNS-Fragmente wurde eine DNS-Präparation mit bekanntem Restriktionsmuster verwendet. Die Elektrophorese wurde je nach Größe des Gels bei 50-120 V durchgeführt.

### 2.1.7 Isolierung von DNS aus Agarosegelen mittels QUIAquick Kit

Zur Extraktion von DNS-Fragmenten aus einem Agarosegel nach elektrophoretischer Auftrennung wurde der QUIAquick Gel Extraction Kit der Firma QUIAGEN (Best. Nr. 28704) verwendet. Hierbei wurden die Fragmente unter UV-Licht aus den Gelen ausgeschnitten und in dem dreifachen Volumen des Lösungspuffers (QG) bei 50°C im Verlauf von 10 Minuten aufgelöst. Danach wurde die so erhaltene Lösung in die DNS-bindende QIAquick Säule überführt. Die Bindung erfolgte während der Zentrifugation mit einer Eppendorf-Tischzentrifuge. Nach Waschen mit dem ethanolhaltigen Waschpuffer (PE) wurde die Membran der Säule mit 30 µl Elutionspuffer EB (10mM Tris/HCl, pH 8,5) versetzt und für 10 min bei RT stehengelassen. Anschließend erfolgte die Elution mittels Zentrifugation für 1 min bei 14000 UpM.

### 2.1.8 Enzymatische Modifikationen von DNS

#### *a) Spaltung von DNS durch Restriktionsendonukleasen*

Restriktionsendonukleasen erkennen in doppelsträngigen DNS-Molekülen spezifische (häufig palindromische) Basensequenzen und spalten sie innerhalb dieser Erkennungssequenz.

Die spezifische Spaltung von DNS mit Restriktionsendonukleasen wurde in den vom Hersteller mitgelieferten Puffern durchgeführt (Sambrook *et al.*, 1989). Es wurden etwa 2-3 U Enzym für 1 µg DNS eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug 2 h bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur. Die erhaltenen Fragmente wurden anschließend durch Phenolextraktion (2.1.5) beziehungsweise präparative Agarose-Gelelektrophorese (2.1.6) und Elution aus dem Agarosegel (2.1.7) gereinigt.

#### *b) Dephosphorylierung von DNS-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase*

Vor einer Ligation wurden die 5'-Phosphatgruppen der linearisierten Vektormoleküle mit alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) entfernt, um einen internen Ringschluß von Vektoren bei Ligationsreaktionen zu verhindern (Chaconas und van de Sande, 1980). Dazu wurden 30 µg linearisierte Vektor-DNS in 100 µl CIP-Puffer (1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM Tris/HCl (pH 9,0), 10 mM Spermidin) resuspendiert und mit 1 U Enzym versetzt. Der Ansatz wurde anschließend zunächst 15 min bei 37°C und dann 15 min bei 56°C inkubiert.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 12 µl 10 x STE-Puffer (0,1 M Tris/HCl (pH 8,0), 1 M NaCl, 10 mM EDTA) und 10 min Erwärmung bei 65°C beendet. Die DNS wurde durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung gereinigt (2.1.5).

*c) Auffüllen überhängender DNS-Enden mit dem Klenow-Fragment der E.coli DNS-Polymerase I*

Zum Auffüllen überhängender Enden nach der PCR wurden 5'-überhängende Enden mit dem Klenow-Fragment der DNS-Polymerase I aufgefüllt (Telford *et al.*, 1979). Dazu wurden 0,1-4 µg DNS in 50 µl Klenow-Puffer (10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT, 10 mM Tris/HCl (pH 7,5), je 12,5 µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP) mit 1 U Enzym 30 min bei 37°C inkubiert. Das Enzym wurde anschließend 10 min bei 65°C denaturiert. Die Reinigung der DNS erfolgte durch Phenolextraktion und Ethanol-fällung (2.1.5).

*d) Ligation von DNS*

Zur Insertion eines DNS-Fragmentes in einen zuvor linearisierten Vektor wurde die DNS-Ligase des Bakteriophagen T4 verwendet (Sambrook *et al.*, 1989). In 20 µl Ligationspuffer (50 mM Tris/HCl (pH 7,6); 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT; 1 mM ATP; 5% PEG 8000) wurden 50 ng Plasmid-DNS mit einem zwei- bis fünffachen molaren Überschuß an DNS-Fragmenten und mit 1 U Enzym über Nacht bei 14°C inkubiert. Anschließend wurde das Enzym 10 min bei 65°C inaktiviert. 1-2 µl des Ligationsansatzes wurden in *E.coli* transformiert (2.1.9).

### **2.1.9 Transformation von *E.coli* mit Plasmid-DNS**

Zur Transformation von *E.coli* wurde die Methode der Elektroporation angewendet (Dower *et al.*, 1988). Zur Herstellung kompetenter *E.coli*-Zellen wurde eine *E.coli*-Über-Nacht-Kultur 1:100 in 500 ml LB-Medium (2.1.4) verdünnt und unter Schütteln auf eine OD<sub>578</sub> von 0,5 angezogen. Anschließend wurden die Zellen 30 min auf Eis gekühlt, in einen sterilen JA10-Zentrifugationsbecher überführt und durch Zentrifugation (5000 UpM, Beckman JA10-Rotor, 15 min, 4°C) geerntet. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit einer eiskalten 10%-igen (v/v) Glycerinlösung (je 500 ml, 250 ml und 50 ml) wurde das Zellsediment in 500 µl der 10%-igen Glycerinlösung aufgenommen und in 40 µl-Portionen bei -80°C eingefroren.

Die Transformation erfolgte durch Elektroporation mit einem „Gene Pulser“ der Firma BioRad. Dazu wurden die kompetenten *E.coli*-Zellen auf Eis aufgetaut, mit 2 µl des Ligationsansatzes versetzt und in eine eisgekühlte Elektroporationsküvette (0,2 cm Elektrodenabstand) überführt. Anschließend wurden die Zellen durch einen Stromstoß (2,5 kV, 400 W, 25 µF, Zeitkonstante 8-9 msec) mit der DNS transformiert. Dann wurden die Zellen sofort in 1 ml SOC-Medium (0,5% (w/v) Hefeextrakt; 0,2% (w/v) Trypton; 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Glucose) aufgenommen und für 30-60 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5000 UpM, Eppendorf Tischzentrifuge, 3min; RT) sedimentiert und in 200 µl SOC-Medium resuspendiert. Die Zellsuspension wurde auf eine LB-Amp-Platte (2.1.4) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Positive Klone wurden über eine DNS-Minipräparation (2.1.3) und mit Hilfe eines Restriktionsverdau (2.1.8) identifiziert.

### 2.1.10 Klonierungsstrategien

#### a) Konstruktion des Stämme *sue+Sue-His<sub>12</sub>* und *Δsue+Sue-His<sub>12</sub>*

Zur Expression des Sue- Proteins mit einem C-terminalen His<sub>12</sub>-tag (*Sue-His<sub>12</sub>*) wurde der *Sue*- Leserahmen durch Amplifizierung der Plasmid-DNS pGEM4-*Sue* (I. Arnold, unveröffentlicht) mittels Polymerasekettenreaktion mit den folgenden Primern erhalten:

N-terminal (*SueNB1*): 5'-GAG AGG ATC CAT GTC GAC AGT TAA TGT TTT G-3'

C-terminal (*SueCX96*): 5'-GAG ATC TAG ATG TTG AAG CTT CCT TCA GGG-3'

Das resultierende PCR-Produkt wurde als *BamHI/XbaI*-Fragment in den „multicopy“ Hefeexpressionsvektor Yep51-Oxa1 (K. Hell, unveröffentlicht) kloniert. Dieser enthielt ein Oxa1-His<sub>12</sub>-Derivat stromabwärts eines *Gall*-Promotors. Der Oxa1-Anteil wurde durch *BamHI/XbaI*-Verdau entfernt und im nachfolgenden Ligationsschritt durch *Sue-His<sub>12</sub>* ersetzt. Der entstandene Vektor Yep51-*Sue-His<sub>12</sub>* besitzt ein *LEU2*-Gen als Marker zum Testen auf erfolgreich durchgeführte Transformation. Der Shuttlevektor YEP51-*Sue-His<sub>12</sub>* wurde zunächst mittels Elektroporation in den *E.coli*-Stamm DH1 (Genotyp: *supE44*, *hsdR17*, *recA*, *endA1*, *gyrA96*, *thi-1*, *relA1* transformiert (2.1.9), um ihn zu vermehren. Nach Isolation des Plasmids (2.1.3) wurde es in den Wildtyp-Stamm W303-1A beziehungsweise in den Stamm *Δsue* transformiert (2.2.4).

Die Selektion der positiven Transformanten erfolgte durch Wachstum auf SD-Platten ohne Leucin beziehungsweise ohne Leucin und Histidin.

*b) Konstruktion des Hefestammes sue+SueΔC36:*

Um das Protein Sue mit einer Deletion von 36 C-terminalen Aminosäuren (SueΔC36) herzustellen, wurde ebenfalls das Plasmid pGEM4-Sue als Matrix in der Polymerasekettenreaktion verwendet. Zur Amplifizierung des Gens von SueΔC36 wurden folgende Primer verwendet:

N-terminal: siehe oben

C-terminal: 5'-GAG ATC TAG ATA CTA CAG GGT GTA GCT TGG C-3'

Das resultierende PCR-Produkt wurde als *Bam*HI/*Xba*I-Fragment in den Vektor Yep51-Sue- His<sub>12</sub> kloniert und ersetzte das intakte Protein. Die Amplifizierung des Vektors, sein Transfer in den Hefestamm W303-1A und die Selektion auf positive Transformanten erfolgte wie oben beschrieben.

## 2.2 Methoden der Hefegenetik

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

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit benutzten Hefestämme sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

**Tabelle 3: Verwendete Hefestämme**

Stamm	Genotyp	Referenz
W303-1A	<i>MATa, his3, leu2, trp1, ura3, ade2, can1</i>	Rothstein und Sherman, 1980
W303-1B	<i>MAT<math>\alpha</math>, his3, leu2, trp1, ura3, ade2, can1</i>	Rothstein und Sherman, 1980
sue+Sue-His <sub>12</sub>	W303-1A + Plasmid YEP51-Sue- His <sub>12</sub>	diese Arbeit
$\Delta$ sue	W303-1A, <i>sue::HIS3</i>	Arnold <i>et al.</i> , 1997
$\Delta$ sue+Sue- His <sub>12</sub>	$\Delta$ sue + Plasmid YEP51-Sue- His <sub>12</sub>	diese Arbeit
$\Delta$ sue+Sue $\Delta$ C	$\Delta$ sue + Plasmid YEP51-Sue $\Delta$ C36	diese Arbeit
$\Delta$ sug	W303-1A, <i>sug::HIS3</i>	Arnold <i>et al.</i> , 1998
$\Delta$ suk	W303-1A, <i>suk::HIS3</i>	Arnold <i>et al.</i> , 1998
$\Delta$ suk <sup>hom</sup>	W303-1B, <i>suk<sup>hom</sup>::HIS3</i>	diese Arbeit
$\Delta$ suk/ $\Delta$ suk <sup>hom</sup>	$\Delta$ suk, <i>suk<sup>hom</sup>::CAN1</i>	diese Arbeit
$\Delta$ ATP 10	W303-1A, <i>atp 10::LEU2</i>	Ackerman u. Tzagoloff, 1990b
$\Delta$ core1	W303-1A, <i>core1::HIS3</i>	Tzagoloff <i>et al.</i> , 1986
$\Delta$ cox4	<i><math>\alpha</math>, ade2, his3, leu2, trp1, ura3, can1, cox4::TRP1</i>	B. Guiard
$\Delta$ cox8	W303-1A, <i>cox8::HIS3</i>	diese Arbeit
$\Delta$ cox12	W303-1A, <i>cox12::URA3</i>	LaMarche <i>et al.</i> , 1992
$\Delta$ cox20	W303-1A, <i>cox20::URA3</i>	Hell <i>et al.</i> , 2000
$\Delta$ impl	<i><math>\alpha</math>, leu2, trp1, pet2858::LEU2</i>	Behrens <i>et al.</i> , 1991
$\Delta$ som1	W303-1A, <i>som1::HIS3</i>	F. Baumann

### 2.2.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Zellen von *S. cerevisiae* wurden in einer 15%-igen (w/v) Glycerinlösung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert und vor der Überführung in Flüssigkultur auf YPGal- beziehungsweise SD-Agarplatten kultiviert. Um ein einheitliches Zellwachstum gewährleisten zu können, erfolgte die Anzucht in flüssigen Vorkulturen zunehmenden Volumens bei einer Temperatur von  $30^{\circ}\text{C}$ . Die Hauptkultur wurde auf eine  $\text{OD}_{578}$  von 0,1-0,2 angeimpft und über Nacht bei 130 UpM und  $30^{\circ}\text{C}$  geschüttelt. Die Anzucht der Hefestämme erfolgte in YPGal-Medium (YPGal+0,5% Laktat) beziehungsweise, wenn selektioniert werden sollte, in SD-Laktat-Medium, das entsprechend der gewünschten Selektionsbedingungen mit Markersubstanzen (Antibiotika), benötigten Aminosäuren, sowie Glucose beziehungsweise Galaktose (0,1%) versetzt war.

*YPGal-Medium*: 10 g Hefeextrakt; 20 g Bacto-Pepton; 5,5 ml 90% Milchsäure; mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 930 ml auffüllen; pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen; nach dem Autoklavieren 67 ml 30% Galaktose dazugeben.

*YPD-Medium*: 10 g Hefeextrakt; 20 g Bacto-Pepton; mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 930 ml auffüllen; pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen; nach dem Autoklavieren 67 ml 30% Glucose dazugeben.

*YPG-Medium*: 10 g Hefeextrakt; 20 g Bacto-Pepton; mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 900 ml auffüllen; pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen; nach dem Autoklavieren 100 ml 30% Glycerin dazugeben.

*SD-Laktat-Medium*: 2% Laktat, 0,67% Stickstoffbasis aus Hefe (ohne Aminosäuren), pH 5,5 mit 10 M KOH einstellen. Von den Stammlösungen der Markersubstanzen wurde unter Berücksichtigung der zu selektierenden Auxotrophie-Marker 2 ml Tryptophan- und Histidin- bzw. 3 ml Leucin- und Lysin- bzw. 10 ml Adenin- und Uracil- Lösung pro Liter Medium zugesetzt.

Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 2% (w/v) Bacto-Agar zugesetzt. Alle verwendeten Medien, Aminosäure- (10g/l) sowie Uracil- und Adenin- (2g/l) Lösungen wurden mit Ausnahme der Tryptophan-Lösung für 20 min bei  $120^{\circ}\text{C}$  autoklaviert. Die Tryptophan-Lösung wurde sterilfiltriert.

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

Nur Hefestämme, die eine intakte Atmungskette besitzen, sind in der Lage, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen. Die Fähigkeit einzelner Hefestämme, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen, wurde auf Agarplatten mit YPG-Medium (2.2.2) getestet. YPG enthält die nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle Glycerin.

Die Hefestämme wurden zunächst auf YPD-Agarplatten (2.2.2) ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Anschließend wurden die Hefezellen einer Platte in 500 µl sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Aus dieser Suspension wurde eine Verdünnungsreihe angesetzt (10; 1; 0,1; 0,01; 0,001 Skalenteile OD<sub>578</sub> je 100 µl Zellsuspension). Je 2 µl der Verdünnungen wurden auf eine YPG- und eine YPD-Platte punktförmig aufgetragen. Die Platten wurden für zwei Tage bei 30°C inkubiert.

### 2.2.4 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNS

Die Transformation von Hefezellen erfolgte mittels Lithiumacetat nach der von Gietz *et al.* (1992) beschriebenen Methode. Eine 50 ml-Kultur in YPD-Medium (2.2.2) wurde bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0,5 unter Schütteln bei 30°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (3000 UpM, Heraeus Bactifuge, 5 min, RT) und mit 25 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und sedimentiert (14000 UpM, Eppendorf Tischzentrifuge, RT, 15 sec). Danach wurden die Zellen in 500 µl 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. 50 µl dieser Suspension wurden sedimentiert und mit 240 µl 50% (w/v) PEG-3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 25 µl beschallter, denaturierter Lachsspermien-DNS (2 mg/ml) und 50 µl (0,1-10 µg) zu transformierender DNS versetzt und gut durchmischt. Der Ansatz wurde für 30 min bei 30°C und anschließend für 20 min bei 42°C inkubiert. Nach kurzer Zentrifugation (14000 UpM, Eppendorf Tischzentrifuge, 15 sec) wurden die Zellen in 150 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen und auf Selektivmedium (SD-Medium) ausplattiert. Alle verwendeten Lösungen waren steril.

### 2.2.5 Disruption der Gene von *Cox8* und *Suk<sup>hom</sup>* in *S. cerevisiae*

#### a) Disruption des *Cox8*-Gens:

Die Konstruktion des  $\Delta\text{cox8}$ - Disruptionsstammes erfolgte durch homologe Rekombination nach einer Methode von Wach *et al.* (1994) und Arnold *et al.* (1998). Zur Disruption des *Cox8*-Gens in dem haploiden Hefestamm W303-1A wurde ein PCR-Fragment benutzt, das aus einer Marker-Kassette (Auxotrophie-Marker *HIS3*) und den kurzen, flankierenden Regionen des genomischen Ziel-Lokus bestand. Ein solches PCR-Fragment kann durch homologe Rekombination stabil in den genomischen Ziel-Lokus integriert werden. Das PCR-Fragment wurde mit den Primern S1 und S2 und der Plasmid-Matrize pFA6a-HIS3MX6 (EUROFAN-Six-Pack) durch die Polymerase-Kettenreaktion (2.1.2) hergestellt und nach Phenolextraktion und Ethanol-fällung (2.1.5) in den haploiden Wildtyp-Stamm W303-1A transformiert (2.2.4). Die Selektion positiver Klone wurde auf SD-Medium (2.2.4) durchgeführt, das Adenin, Uracil, Leucin und Tryptophan enthielt, nicht aber Histidin.

**Primer S1:** 5'-GAG CAA ACT AAA CAG AAA AGT TAT CCA TTT CCA TTA CGC ACG TAC GCT GCA GGT CGA C-3' (homolog zu den Nukleotiden -40 bis -1 des *Cox8*-Lokus und zu 18 Nukleotiden der Polylinkerregion in pFA6a-HIS3MX6, die den *HIS3MX6*-ORF auf der 5'-Seite flankieren)

**Primer S2:** 5'-CCT TCT TTC CCG CCG TCA TCG ATG AAT TCG AGC TCG-3' (komplementär zu den Nukleotiden + 238 bis + 278 des *Cox8*-Lokus und zu 19 Nukleotiden der Polylinkerregion in pFA6a-HIS3MX6, die den *HIS3MX6*-ORF auf der 3'-Seite flankieren)

#### b) Disruption des hypothetischen *Suk<sup>hom</sup>*-Gens:

Die Konstruktion des  $\Delta\text{suk}^{\text{hom}}$  - Disruptionsstammes erfolgte im Prinzip wie diejenige des Stammes  $\Delta\text{cox8}$ . Allerdings wurde das hypothetische *Suk<sup>hom</sup>* - Gen im Stamm W303-1B disruptiert. Die verwendeten Primer HOM-S1 und HOM-S2 sind unten aufgeführt.

Zur Herstellung der Doppeldisruptante  $\Delta\text{suk}/\Delta\text{suk}^{\text{hom}}$  wurde im Stamm  $\Delta\text{suk}$  das hypothetische Gen für *Suk<sup>hom</sup>* durch eine Kanamycin-Resistenz ersetzt. Es wurde ein PCR-Fragment benutzt, das aus einer Marker-Kassette (Antibiotika-Resistenzmarker *can*) und den kurzen, flankierenden Regionen des genomischen Ziel-Lokus bestand. Das PCR-Fragment wurde mit den Primern

HOM-S1 und HOM-S2 und der Plasmid-Matrize pFA6a-canMX6 (EUROFAN-Six-Pack) durch die Polymerase-Kettenreaktion (2.1.2) hergestellt und nach Phenolextraktion und Ethanol-fällung (2.1.5) in den haploiden Wildtyp-Stamm W303-1B transformiert (2.2.4).

Die Selektion positiver Klone wurde auf YPGal-Medium (2.2.4) durchgeführt, das das Antibiotikum Kanamycin (100mg/l) enthielt.

**Primer HOM-S1:** 5'-TCT AAA CAT AAG ATA TAC AAA AAT AAA TAT AGC TAT CTC ACG TAC GCT GCA GGT CGA C-3' (homolog zu den Nukleotiden -40 bis -1 des  $Su_k^{\text{hom}}$ -Lokus und zu 18 Nukleotiden der Polylinkerregion in pFA6a-canMX4 beziehungsweise pFA6a-HIS3MX6, die den *canMX4*-ORF beziehungsweise den *HIS3MX6*-ORF auf der 5'-Seite flankieren)

**Primer HOM-S2:** 5'-CGA TGA AGA ACA CCA CCA TTT CAG AAA TTT TTA TAC ATA AAT CGA TGA ATT CGA GCT CG-3' (komplementär zu den Nukleotiden + 273 bis + 313 des  $Su_k^{\text{hom}}$ -Lokus und zu 19 Nukleotiden der Polylinkerregion in pFA6a-canMX4 beziehungsweise pFA6a-HIS3MX6, die den *canMX4* beziehungsweise den *HIS3MX6*-ORF auf der 3'-Seite flankieren)

### 2.2.6 Nachweis von Gendisruptionen in *S.cerevisiae*

Zum Nachweis chromosomaler Gendisruptionen wurde die PCR-Methode verwendet. Die benutzten Primer waren zu Sequenzbereichen komplementär, die den genomischen Ziel-Lokus auf der 5'-Seite (Primer A1) bzw. 3'-Seite (Primer A2) flankierten. In dem PCR-Ansatz wurden ganze Zellen des zu testenden Hefestammes mit Zellen des isogenen Wildtyp-Stammes verglichen. Die korrekte Integration der Marker-Kassetten (*HIS3MX6* beziehungsweise *canMX4*, 2.2.5) wurde durch Größenvergleich der einzelnen PCR-Produkte nachgewiesen.

Die Disruption des Cox8-Gens (2.2.5) wurde mittels folgender Primer gezeigt:

**Primer A1:** 5'-CGA GAG AAG TGT TCG GTG-3' (homolog zu den Nukleotiden -192 bis -175 des Cox8-Lokus)

**Primer A4:** 5'-CCT TCT TTC CCG CCG TC-3' (komplementär zu den Nukleotiden + 403 bis + 420 des Cox8-Lokus)

Die Disruptionen des hypothetischen  $Suk^{hom}$  -Gens konnte mittels folgender Primer nachgewiesen werden:

**Primer HOM-A1:** 5'-GCC AGC TGC CTC AGA AAG-3' (homolog zu den Nukleotiden -317 bis -300 des hypothetischen  $Suk^{hom}$  -Lokus)

**Primer HOM-A4:** 5'-GGC CAT CAA CTA TCA CTT AC-3' (komplementär zu den Nukleotiden + 563 bis + 582 des hypothetischen  $Suk^{hom}$  -Lokus)

Ein Zellklon des entsprechenden Hefestammes wurde in ein Reaktionsgefäß überführt. Durch Zugabe von je 50 µl einer Zymolyaselösung (1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) und Inkubation für 10 min bei RT wurde die Zellwand der Hefezellen entfernt. Die so entstandenen Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (5000 UpM, Sigma Tischzentrifuge, 1min, RT) reisoliert, 5 min bei 92°C inkubiert, dann auf Eis abgekühlt und in 25 µl PCR-Reaktionsmix (10 mM Tris/HCl (pH 8,3), 50 mM KCl, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM dNTP, je 1 µM der Primer A1 und A4 beziehungsweise A1-HOM und A4-HOM, 1 U Taq-DNS-Polymerase) resuspendiert. Der PCR-Ansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Polymerase-Kettenreaktion verlief wie folgt:

1. 2 min, 94°C
2. 30 Zyklen 30 sec, 94°C  
30 sec, 50°C  
90 sec, 72°C
3. Abkühlen auf 4°C

Nicht aufgeschlossene Zellen wurden anschließend mit der Tischzentrifuge abgetrennt. Je 10 µl der entsprechenden PCR-Ansätze wurden auf einem Agarsegel analysiert (2.1.6).

## 2.3 Zellbiologische Methoden

### 2.3.1 Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

Die Isolierung von Hefemitochondrien erfolgte nach der von Herrmann *et al.* (1994) beschriebenen Methode. Die Hefezellen wurden wie unter 2.2.2 beschrieben kultiviert und bei einer durchschnittlichen OD<sub>578</sub> von 1-2 durch Zentrifugation (5000 UpM, Beckman JA10-Rotor, 5 min; RT) geerntet. Nach dem Waschen mit H<sub>2</sub>O wurde das Zellpellet gewogen und mit einer Endkonzentration von 0,5 g/ml in DTT-Puffer (100 mM Tris/SO<sub>4</sub> (pH 9,4); 10 mM DTT) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde für 15 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert, erneut wie oben beschrieben zentrifugiert und mit 100 ml 1,2 M Sorbitol gewaschen. Für den enzymatischen Aufschluß der Zellwände wurden die Zellen in Zymolyase-Puffer (1,2 M Sorbitol; 20 mM Kaliumphosphat, pH 7,4) aufgenommen (0,15 g/ml), mit 2 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht versetzt und für 30-45 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der enzymatische Abbau der Zellwand (Sphäroplastenbildung) wurde durch osmotische Lyse getestet. Dazu wurden je 50 µl Zellsuspension in 2 ml H<sub>2</sub>O bzw. 1,2 M Sorbitol gegeben. Die Sphäroplastenbildung war beendet, wenn die OD<sub>578</sub> der ersten Lösung 10-20% der OD<sub>578</sub> der Sorbitollösung betrug. Alle darauffolgenden Schritte erfolgten bei 4°C. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (5000 UpM, Beckman JA10-Rotor, 5 min, 4°C) reisoliert und in kaltem Homogenisierungspuffer (0,6 M Sorbitol; 10 mM Tris/HCl (pH 7,4); 1 mM EDTA; 0,2% (w/v) BSA; 1 mM PMSF) resuspendiert (0,15 g/ml). Anschließend wurde die Zellsuspension mit einem Dounce-Homogenisator homogenisiert (10 Hübe). Große Zelltrümmer und ganze Zellen wurden durch zweimalige Zentrifugation (4000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 5 min, 4°C) entfernt. Aus dem Überstand wurden die Mitochondrien sedimentiert (12000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 12 min, 4°C), dann in SEM-Puffer (10 mM MOPS/KOH (pH 7,2), 250 mM Sucrose, 1 mM EDTA) gewaschen, nochmals von Zelltrümmern gereinigt (4000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 5 min, 4°C) und erneut isoliert (12000 UpM, Beckman JA20-Rotor, 12 min, 4°C). Die isolierten Mitochondrien wurden in 500 µl SEM-Puffer aufgenommen, auf eine Proteinkonzentration von 10 mg/ml eingestellt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

### 2.3.2 Schnellisolierung von Mitochondrien

Zur schonenderen Präparation aktiver Komponenten der Atmungskette wurde eine Schnellisolierung durchgeführt.

Hefezellen (11 Über-Nacht-Kultur einer  $OD_{578}$  von 1-2) wurden durch 5 min Zentrifugation bei 4000 U (JA10-Rotor, Beckman) sedimentiert und in 5 ml Saccharosepuffer (250 mM Saccharose, 5mM 6-Aminocapronsäure, 10 mM Tris/HCl (pH 7,0)) resuspendiert und 5 min auf Eis inkubiert. Die Mitochondriensuspension wurde zu 5ml Glasperlen (0,25-0,5 mm) in ein 50 ml Reaktionsgefäß gegeben und 10 mal für je 1 min gevortext. Nach einer Verdünnung mit 10 ml Saccharosepuffer und Sedimentierung der Glasperlen wurde der Überstand vorsichtig in JA 20-Zentrifugationsgefäße überführt und 20 min bei 4000 UpM zentrifugiert (Beckman, JA 20 Rotor).

Die mitochondrialen Membranen wurden nach einem erneuten Zentrifugationsschritt des Überstandes (30 min, 15000 UpM, JA 20-Rotor) gewonnen und in Saccharospuffer bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt.

### 2.3.3 ATP-Depletion von Mitochondrien

Zur ATP-Depletion der Matrix wurde Oligomycin eingesetzt, das die Aktivität der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase reversibel hemmt. Parallel wurde Apyrase, das bereits vorhandenes ATP hydrolysiert, verwendet.

Vor Durchführung einer Quervernetzungsreaktion (2.4.5) wurden die isolierten Mitochondrien für 2 min bei  $25^{\circ}\text{C}$  mit  $20\ \mu\text{M}$  Oligomycin beziehungsweise  $40\ \text{U/ml}$  Apyrase vorinkubiert.

### 2.3.4 Aufhebung des Membranpotentials

Mit Hilfe von Valinomycin wird das Membranpotential in irreversibler Weise aufgehoben. Vor Durchführung einer Quervernetzungsreaktion (2.4.5) wurden die Mitochondrien zunächst mit  $1\ \mu\text{M}$  Valinomycin für 2 min bei  $25^{\circ}\text{C}$  vorinkubiert.

## 2.4 Proteinchemische Methoden

### 2.4.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche, vertikale Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970) aufgetrennt. Sammel- und Trenngel hatten eine Größe von 1×15 cm bzw. 9×15 cm bei 0,8 cm Dicke. Um Gele mit verschiedenen Trenneigenschaften herzustellen, wurden verschiedene Konzentrationen an Acrylamid bzw. N, N'-Methylenbisacrylamid verwendet.

Zusammensetzung der Gellösungen und der Pufferlösungen:

*Bodengel:* 20% (w/v) Acrylamid; 0,13% bzw. 0,4% (w/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl (pH 8,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) APS; 0,25% (v/v) TEMED

*Trenngel:* 12-16% (w/v) Acrylamid; 0,08%-0,3% (w/v) Bisacrylamid; 380 mM Tris/HCl (pH 8,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED

*Sammelgel:* 5% (w/v) Acrylamid; 0,03% (w/v) Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) APS; 0,1% (v/v) TEMED

*Elektrophoresepuffer:* 50 mM Tris/HCl (pH 8,3); 384 mM Glycin; 0,1% (w/v) SDS

*Laemmli-Puffer:* 60 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,02% (w/v) Bromphenolblau; 10% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol (außer, wenn die Proben mit DTNB quervernetzt worden waren)

Die Auftrennung kleiner Proteine (Molekularmasse < 14 kDa) erfolgte mit Hilfe der SDS-Harnstoff-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.

Zusammensetzung der Gellösungen:

*Bodengel:* 20% (w/v) Acrylamid; 0,13% bzw. 0,4% (w/v) Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl (pH 8,8); 0,1% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) APS; 0,25% (v/v) TEMED

*Trenngel:* 27% (w/v) Acrylamid; 0,35% (w/v) Bisacrylamid; 50% (w/v) Harnstoff; 1 M Tris/HCl (pH 8,8); 0,14% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED

*Sammelgel:* 6,2% (w/v) Acrylamid; 0,08% (w/v) Bisacrylamid; 44% (w/v) Harnstoff; 154 mM Tris/HCl (pH 6,8); 0,14% (w/v) SDS; 0,05% (w/v) APS; 0,05% (v/v) TEMED

Die aufzutrennenden Proben wurden in 20 µl Laemmli-Puffer gelöst, für 3 min auf 95°C erhitzt und dann auf das SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern bei einer konstanten Stromstärke von 28 mA. Nach dem Lauf wurden die Proteine entweder auf Nitrozellulose transferiert (2.4.2) oder 15 min mit 0,1% (w/v) Coomassie-Brilliant-Blau R-250 in 10% (v/v) Essigsäure und 40% (v/v) Methanol angefärbt und anschließend 0,5-2h mit 10% (v/v) Essigsäure und 40% (v/v) Methanol entfärbt und über Nacht bei 50°C im Vakuum auf Whatman-3MM-Filterpapier getrocknet.

#### 2.4.2 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose

Die mittels SDS-PAGE (2.4.1) aufgetrennten Proteine wurden nach der von Towbin *et al.* (1979) und Kyhse-Anderson (1984) beschriebenen „Semi-dry“-Methode auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Hierfür wurden das Gel und die Membran in Transferpuffer (20 mM Tris; 150 mM Glycin; 20% (v/v) Methanol; 0,08% (w/v) SDS) eingeweicht. Anschließend wurde auf eine Graphitplatte ein mit Transferpuffer getränktes Whatman-3MM-Filterpapier, eine Membran, das Gel und ein weiteres getränktes Filterpapier gelegt und mit einer Graphitplatte bedeckt. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte durch Anlegen eines elektrischen Feldes bei 200 mA für 1,5 h. Die Proteine wurden mit Ponceau S-Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S; 3% (w/v) TCA) angefärbt. Nach einer BN-PAGE (2.4.6) wurden die Gele vor dem Transfer auf die Nitrozellulosemembran für etwa 0,5h in einem Transferpuffer ohne Methanol eingeweicht. Auch die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte in Transferpuffer ohne Methanol.

#### 2.4.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit dem „BioRad-Proteinassay“ nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie-Blau G-250 an Proteine. Dabei verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm auf 595 nm. 2 und 5 µl der zu vermessenden Proben wurden mit 1 ml einer 1:5-

Verdünnung des Farbstoff-Konzentrates gemischt und 5-10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 595 nm gemessen.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer Eichkurve, die mit einem Proteinstandard (IgG aus Rind, Biorad) erstellt wurde.

#### 2.4.4 TCA-Fällung von Proteinen

Proteine wurden durch Zugabe von 12% (w/v) TCA gefällt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 30 min bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden die denaturierten Proteine sedimentiert (18000 Upm, Sigma 12154-Rotor,  $2^{\circ}\text{C}$ , 15 min), zweimal mit kaltem Aceton ( $-20^{\circ}\text{C}$ ) gewaschen, bei  $56^{\circ}\text{C}$  getrocknet und in Laemmli-Puffer (2.4.1) aufgenommen.

#### 2.4.5 Chemische Quervernetzung mitochondrialer Proteine

Enge räumliche Interaktionen zwischen verschiedenen Proteinen lassen sich mit Hilfe chemischer Quervernetzer nachweisen, die eine kovalente Verknüpfung der Interaktionspartner erlauben. In der vorliegenden Arbeit wurden DSG (Disuccimidylglutarat), DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure)), EDC (1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]-carbodiimid Hydrochlorid) und MBS (*m*-Maleimidobenzoyl-*N*-hydroxysuccinimidester) als Quervernetzungsreagenzien verwendet. DSG erlaubt eine irreversible Vernetzung benachbarter Proteine über die freien Aminogruppen von Lysinresten. EDC erlaubt eine Vernetzung benachbarter Proteine über die freien Amino- und Carboxygruppen. DTNB ermöglicht die reversible Vernetzung über freie Sulfhydrylgruppen von Cysteinresten und MBS die irreversible Vernetzung über eine freie Aminogruppe eines Lysinrestes mit der freien Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes.

Isolierte Mitochondrien (150  $\mu\text{g}$ ) wurden in 400  $\mu\text{l}$  SH-Puffer (0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4)), der 2 mM NADH enthielt resuspendiert und 2 min bei  $25^{\circ}\text{C}$  und danach 2 min bei  $0^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden sie mit einer Stammlösung von 20 mM Quervernetzungsreagenz versetzt. Die Endkonzentration des Quervernetzers betrug 0,5 mM. Als Kontrolle diente ein Ansatz mit reinem DMSO. Nach einer Inkubation für 30 min bei  $0^{\circ}\text{C}$  wurde die Vernetzungsreaktion durch Zugabe von 1 M Glycin (pH 8,0) zu einer Endkonzentration von 0,1 M gestoppt. Nach weiterer Inkubation für 15 min auf Eis wurden die Mitochondrien reisoliert (13000 UpM, Sigma 12154-

Rotor, 2°C, 15 min), mit SH (0,6 M Sorbitol; 20 mM HEPES/KOH (pH 7,4)) gewaschen und in 30 µl Laemmli-Puffer (2.4.1) aufgenommen. Die Quervernetzungsaddukte wurden durch SDS-PAGE (2.4.1), Transfer auf Nitrozellulose (2.4.2) und Immundekoration (2.5.5) analysiert.

#### 2.4.6 Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)

Die blaue Nativgelelektrophorese erfolgte nach der von Schagger und Jagow (1991) entwickelten Methode zur Analyse von Proteinkomplexen. Das Verfahren beruht auf der Bindung des Farbstoffes Serva Blau G an Proteinkomplexe, die dadurch eine negative Gesamtladung erhalten und in einem elektrischen Feld aufgetrennt werden. Sammel- und Trenngel hatten eine Größe von 1×15 cm bzw. 9×15 cm bei einer Dicke von 0,8 cm.

Zusammensetzung der Gel- und Pufferlösungen:

*Bodengel:* 20% (w/v) Acrylamid, 0,13% (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,05 % (w/v) APS, 0,025% (w/v) TEMED

*Trenngel:* linearer Gradient von 5-10% (w/v) Acrylamid, 0,15-0,3% (w/v) Bisacrylamid und 0-16% (w/v) Glycerin, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,04 % (w/v) APS, 0,04% (w/v) TEMED

*Sammelgel:* 3,8% (w/v) Acrylamid, 0,12% (w/v) Bisacrylamid, 0,5 M 6-Aminocapronsäure, 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0), 0,08 % (w/v) APS, 0,08% (w/v) TEMED

*Kathodenpuffer:* 50 mM Tricine, 15 mM Bistris, 0,02% (w/v) Serva Blau G (pH 7,0)

*Anodenpuffer:* 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0)

Isolierte Mitochondrien (200 µg pro Gelspur) wurden in 40 µl Digitonin-Puffer (1% (w/v) Digitonin; 50 mM Kaliumacetat (pH 7,4); 30 mM HEPES/KOH (pH 7,4); 10% (w/v) Glyzerin; 1 mM PMSF) für 30 min auf Eis solubilisiert. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation (45000 UpM, Beckman TLA45-Rotor, 2°C 30 min), um nichtsolubilisierendes Material zu entfernen. Der Überstand wurde abgenommen, mit 4 µl Probenpuffer (5% (w/v) Serva Blau G in 500 mM 6-Aminocapronsäure) versetzt und auf das Nativgel aufgetragen. Als Kathodenpuffer diente zunächst ein Serva Blau G enthaltender Puffer (50 mM Tricin; 15 mM Bistris/HCl (pH 7,0); 0,02% (w/v) Serva

Blau G), der nach etwa einem Drittel des Elektrophoreselaufes gegen den entsprechenden Kathodenpuffer ohne Farbstoff ausgewechselt wurde. Der Anodenpuffer enthielt 50 mM Bistris/HCl (pH 7,0). Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C. Zunächst wurde eine Spannung von 100 V angelegt. Sobald die Proteine das Trenngel erreicht hatten, wurde die Spannung auf 500 V erhöht. Als Markerproteine dienten Rinderthyreoglobulin (670 kDa), Pferdemißzapferferritin (443 kDa) und Rinderserumalbumin (132 kDa, Dimer und 66 kDa, Monomer).

#### 2.4.7 Ni-NTA-Chromatographie

Die Ni-NTA-Chromatographie diente als Nachweis der engen räumlichen Lokalisation von Proteinen. Sie wurde entweder im Anschluß an eine native Lyse oder im Anschluß an ein Quervernetzungsexperiment zur Isolierung von Interaktionspartnern durchgeführt.

Zur Lyse unter nativen Bedingungen wurden 2 Ansätze à 300 µg isolierter Mitochondrien in je 300 µl Digitonin-Lysepuffer (150 mM Kaliumacetat; 30 mM HEPES (pH 7,4), 1% (w/v) Digitonin, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF) vorsichtig resuspendiert und 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Konzentration des milden Detergenz Digitonin in den Proben mit dem gleichen Volumen Verdünnungspuffer (wie Lysepuffer, ohne Digitonin) reduziert. Nach Sedimentation der nicht gelösten Partikel (45000 UpM, Beckman TLA45-Rotor, 2°C 30 min) wurden die Überstände in ein neues Reaktionsgefäß vereinigt. Nichtgelöstes Material wurde in Laemmli-Puffer (2.4.1) aufgenommen. Davon wurden 50 µg Protein mittels SDS-PAGE analysiert. 100 µl des Überstandes wurden zur Überprüfung der Lyse mit TCA gefällt. Auch hiervon wurden 50 µg Protein mittels SDS-PAGE analysiert. Der restliche Überstand wurde in 3 Ansätze à 300 µl aufgeteilt, 1:1 mit Waschpuffer (wie Lysepuffer, mit 0,5% (w/v) Digitonin) verdünnt, und auf 30 µg pro Ansatz einer mehrmals mit Waschpuffer vorbehandelten Ni-NTA-Suspension (QUIAGEN) gegeben. Die Bindung von Proteinen mit Histidin-Anhang an Ni-NTA erfolgte unter Rotation der Reaktionsgefäße bei 4°C für 1 h. Die Ni-NTA-Partikel wurden anschließend sedimentiert (10000 UpM, Eppendorf Tischzentrifuge, 1 min, 4°C), 200 µl Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine TCA-Fällung vorgenommen. 50 µg gefälltes Protein wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Die Ni-NTA-Partikel wurden dreimal mit Digitonin-Waschpuffer (siehe oben) gewaschen. Die Elution der Proteine er-

folgte durch Schütteln (10 min, 4°C) und Erhitzen (3 min 95°C) mit 30 µl Laemmli-Puffer (2.4.1), der 400 mM Imidazol enthielt. Dabei wurde zunächst ein Ansatz eluiert, das Eluat auf den nächsten Ansatz gegeben, wiederum eluiert und anschließend mit diesem Eluat der dritte Ansatz eluiert (Dreifachelution). Die eluierten Proteine wurden gemeinsam mit der Kontrolle der Lyse und dem Überstand der Bindung an Ni-NTA mittels SDS-PAGE (2.4.1) und nachfolgende Immundekoration (2.5.5) analysiert.

Nach einem Quervernetzungsexperiment (2.4.5) wurden die Mitochondrien (3 Ansätze à 500 µg) in je 30 µl SDS-Lysepuffer (1% SDS, 0,1 M Tris/HCl (pH 7,4), 2mM PMSF) aufgenommen, 10 min bei 4°C geschüttelt und 3 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde der Detergenzextrakt mit 20 Volumen SDS-Verdünnungspuffer (30 mM Tris/HCl (pH 7,4), 0,5% Triton-X-100, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF) verdünnt. Nach Zentrifugation des Detergenzextraktes (15 min, 20 000 Upm, Sigma, Rotor 12154, 4°C) wurde der Überstand der Ansätze in ein 2 ml-Reaktionsgefäß zusammengefasst. Nicht gelöstes Material wurde in Laemmli-Puffer (2.4.1) aufgenommen und 50 µg Protein analysiert. 120 µl des Überstandes wurden zur Kontrolle der Lyse mit TCA gefällt. Der restliche Überstand wurde in 3 Proben à 500 µl aufgeteilt und auf 30 µl mit SDS-Verdünnungspuffer vorbehandelte Ni-NTA-Suspension (QUIAGEN) gegeben. Die Elution und Analyse des an Ni-NTA gebundenen Materials erfolgte wie oben beschrieben.

#### 2.4.8 Cytochrom $bc_1$ -Komplex- Aktivitätsbestimmung

Zur Messung der Aktivität des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes wurde die Reduktion von Cytochrom  $c$  nach Zugabe von NADH, dem Substrat des Enzyms, nach der Methode von Tzagoloff *et al.* (1975) bestimmt.

Isolierte Mitochondrien (keine Schnellpräparationen!) wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml in 20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,5 M Sorbitol resuspendiert. In zwei Quarzküvetten wurden jeweils 0,92 ml Pufferlösung (10 mM Kaliumphosphat (pH 7,5), 0,1 mM KCN) mit 0,08 ml einer Lösung von 1% (w/v) Cytochrom  $c$  in 20 mM Kaliumphosphat (pH 7,5) versetzt. In eine der Küvetten wurden 10 µg Proteinsuspension gegeben und die Extinktion bei 23 °C und 550 nm in einem UVICON 930-Spectrophotometer während 0,5 min gemessen.

Anschließend wurden 10 µl einer Lösung von 0,1 M NADH in 10 mM Kaliumphosphat (pH 7,4) zugefügt und die Reduktion von Cytochrom *c* über einen Zeitraum von 1-2 min beobachtet.

#### 2.4.9 Cytochrom *c*-Oxidase- Aktivitätsbestimmung

Zur Messung der Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase wurde die Oxidation von Cytochrom *c* nach Zugabe von Mitochondrienprotein nach der Methode von Tzagoloff *et al.* (1975) bestimmt.

Isolierte Mitochondrien (keine Schnellpräparationen!) wurden in einer Konzentration von 10 mg/ml in 20 mM Tris/HCl (pH 7,5), 0,5 M Sorbitol resuspendiert. In zwei Quarzküvetten wurden jeweils 0,92 ml Pufferlösung (10 mM Kaliumphosphat (pH 7,5)) mit 0,08 ml einer Lösung von 1% (w/v) Cytochrom *c* in 20 mM Kaliumphosphat (pH 7,5) versetzt. Das Cytochrom *c* wurde in der Referenzküvette mit etwas Fe(CN)<sub>3</sub>-Lösung oxidiert. In eine der Küvetten wurden 10 µg Proteinsuspension gegeben und die Extinktion bei 23 °C und 550 nm in einem UVICON 930-Spectrophotometer während 1-2 min gemessen.

### 2.5 Immunologische Methoden

#### 2.5.1 Koppelung synthetischer Peptide an Ovalbumin

Zur Herstellung spezifischer Antikörper wurden chemisch synthetisierte Oligopeptide (Firma Neosystem S.A., Straßburg) verwendet. Diese wurden über einen endständigen Cysteinrest an ein aktiviertes Trägerprotein gekoppelt (Modrow und Wolf, 1986; Modrow *et al.*, 1989). Als Trägerprotein diente Maleimid-aktiviertes Ovalbumin (Pierce). Zunächst wurden 2 mg des Peptids in 200 µl einer 50 mM Kaliumphosphat-Pufferlösung (pH 7,2), und parallel dazu 2 mg Maleimid-aktiviertes Ovalbumin in 200 µl H<sub>2</sub>O gelöst. Beide Lösungen wurden anschließend sofort gemischt und 2 h bei 25 °C inkubiert. Danach wurde das Konjugat durch Gelfiltration mit Hilfe einer PD10-Säule (Pharmacia) unter Verwendung von 100 mM NaCl, 20 mM Kaliumphosphat (pH 7,2) gereinigt. Es wurden 10 Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt. Fraktionen, die das Konjugat enthielten, wurden durch eine Proteinbestimmung (2.4.3) ermittelt und in Portionen zu 200 µg bei -20 °C gelagert.

### 2.5.2 Herstellung polyklonaler Antiseren in Kaninchen

Zur Herstellung polyklonaler Antikörper wurden an Ovalbumin gekoppelte Peptide (2.5.1) verwendet. Für die erste Injektion des Kaninchens wurden 200 µg des gekoppelten Peptids mit 200 µl des Immunstimulans Titermax<sup>TM</sup> zu einer homogenen Lösung vermischt und subkutan nahe der Lymphknoten in die Achselregion des Kaninchens injiziert. Weitere Injektionen erfolgten im Abstand von 4-6 Wochen, wobei Titermax<sup>TM</sup> durch inkomplettes Freundsches Adjuvans ersetzt wurde. Nach der Erstinjektion wurde die Folgeinjektion nach bereits zwei Wochen durchgeführt. Zehn Tage nach jeder Immunisierung sowie vor der ersten Injektion (Präimmunserum) wurden dem Kaninchen etwa 30 ml Blut aus der Ohrvene entnommen und zur Gerinnung mindestens 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Serum durch zwei Zentrifugationsschritte (2x 3000g, 5 min; danach 12000 g, 12 min) gewonnen. Zur Inaktivierung des Komplementsystems wurde es 30 min bei 56°C inkubiert. Anschließend wurde das Serum aliquotiert und bei -20°C gelagert. Folgende polyklonale Antiseren wurden auf diese Weise hergestellt: Antiserum gegen die C-terminale Region von Sue mit Hilfe des synthetischen Peptids CVILNAVESLKEAS; Antiserum gegen Sug mit Hilfe des synthetischen Peptids CIGRRKLVGYKHH; Antiserum gegen Suk mit Hilfe des synthetischen Peptids CENYLKKHSDKQDA; Versuch der Herstellung von Antiserum gegen das hypothetische Protein Suk<sup>hom</sup> mit Hilfe des synthetischen Peptids CTTKPKTKNEGKNS. Die Peptide wurden vor der Injektion an aktiviertes Ovalbumin gekoppelt (2.5.1).

### 2.5.3 Kovalente Koppelung von Antikörpern an Protein A-Sepharose

Für Immunfällungen mit dem Antiserum gegen den C-Terminus von Sue wurden die Antikörper zur Herabsetzung des Hintergrundsignals kovalent an Protein A-Sepharose gekoppelt. Als Quervernetzungsreagenz diente DMP (Dimethylpimelimidat; Sigma). 40 µl Protein A-Sepharose-Suspension (Pharmacia) wurden zunächst dreimal mit 10 Volumen PBS-Puffer (150 mM NaCl; 2,7 mM KCl; 6,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) gewaschen und dazwischen abzentrifugiert (6000 UpM, Sigma Tischzentrifuge, RT). Dann wurden die Protein A-Sepharose-Partikel mit 140 µl Antiserum bzw. Präimmun und 300 µl PBS-Puffer für 1h bei 4°C unter leichtem Rotieren inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der PAS-Partikel mit 500 µl 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) wurden diese in 750 µl 0,2 M Natriumborat (pH 9,0) aufgenommen

und mit 6 mg DMP versetzt. Die Quervernetzungsreaktion erfolgte unter leichtem Rotieren für 30 min bei RT. Die Reaktion wurde durch Waschen der PAS-Partikel mit 500  $\mu$ l 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) und zweistündiges Rotieren der Partikel in 750  $\mu$ l 0,2 M Ethanolamin (pH 8,0) bei RT gestoppt. Es erfolgten zwei weitere Waschschriffe der Partikel mit 750  $\mu$ l TBS-Lösung (10 mM Tris/HCl (pH 7,4), 150 mM NaCl). Danach wurden nicht kovalent gebundene Antikörper durch Waschen mit 750  $\mu$ l 0,1 M Glycin (pH 2,5) entfernt. Die Matrix wurde durch zweimaliges Waschen mit 500  $\mu$ l 0,1 M Tris/HCl (pH 8,8) und zweimaliges Waschen mit 500  $\mu$ l TBS neutralisiert. Die Lagerung der gekoppelten Antikörper erfolgte in 500  $\mu$ l TBS bei 4°C. Diese Suspension wurde für Immunfällungen eingesetzt (2.5.4).

#### 2.5.4 Immunfällungen unter denaturierenden Bedingungen

Zum Nachweis der engen räumlichen Beziehung zwischen *Sue* und *Suk* der  $F_1F_0$ -ATP Synthase wurden Protein A-Sepharose Partikel verwendet, an die Antikörper gegen den C-Terminus der Untereinheit *e* kovalent gekoppelt worden waren, verwendet (2.5.3).

Nach einem Quervernetzungsexperiment (2.4.5) wurden die Mitochondrien (8 Ansätze à 300  $\mu$ g) in je 30  $\mu$ l SDS-Lysepuffer (0,5% SDS, 0,1 M Tris/HCl (pH 7,4), 2mM PMSF) aufgenommen, 10 min bei 4°C geschüttelt und 3 min bei 95°C erhitzt. Anschließend wurde der Detergenzextrakt mit 20 Volumen TBS verdünnt. Nach Zentrifugation des Detergenzextraktes (15 min, 20 000 Upm, Sigma, Rotor 12154, 4°C) wurde der Überstand von jeweils 2 Ansätzen zusammengefasst und in einem Parallelansatz eine Immunfällung mit Präimmunserum (PI) beziehungsweise Antiserum gegen den C-Terminus von *Sue* ( $\alpha$ -*Sue*), die an Protein A-Sepharose gekoppelt waren, durchgeführt. Die adsorbierten Proteine wurden durch 15 min Schütteln bei 4°C in 30  $\mu$ l Laemmli-Puffer eluiert und durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Immundekoration mit Antiseren gegen *Sue* beziehungsweise *Suk* auf die Anwesenheit von Quervernetzungsprodukten mit *Sue* beziehungsweise *Suk* untersucht.

### 2.5.5 Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Der immunologische Nachweis von auf Nitrozellulose transferierten Proteinen (2.4.2) erfolgte durch Immundekoration. Alle Inkubationen wurden unter Schütteln bei RT durchgeführt. Zunächst wurden alle unspezifischen Bindungsstellen auf der Membran durch 30 min Inkubation mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS (2.5.3) abgesättigt. Anschließend erfolgte die Immundekoration für 1,5 h mit spezifischen Antisera, die je nach Titer 1:200 bis 1:10000 mit Milchpulver/TBS verdünnt worden waren. Die Membran wurde nun nacheinander für je 10 min mit TBS, TBS/0,05% Triton X-100 und nochmals mit TBS gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu entfernen. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde ein Konjugat aus Meerrettich-Peroxidase und anti-Kaninchen-IgG aus Ziegen (Biorad) verwendet. Die Verdünnung dieser Antikörper betrug 1:5000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBS. Nach einer Inkubation für 30 min wurde die Nitrozellulosemembran dreimal wie oben beschrieben gewaschen und mit Luminol-Reagenz (ECL, Amersham) inkubiert. Die gebundene Peroxiase wurde mit Hilfe der Chemolumineszenzreaktion und Inkubation auf einem Röntgenfilm (Fuji NewRX) sichtbar gemacht und dokumentiert.

## 2.6 Chemikalien und Geräte

### 2.6.1 Chemikalien und Enzyme

Agfa-Gevaert, München: Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

Amersham-Buchler, Braunschweig: ECL Reagenz für Western Blots, Taq-DNS-Polymerase

Behringwerke, Marburg: Freund's inkomplettes Adjuvans

Biometra, Göttingen: Kit für die Polymerase-Kettenreaktion („Prime Zyme“)

BioRad, München: Reagenzien zur Proteinbestimmung, HRP-gekoppelte Anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelte Anti-Maus IgG (aus Ziege)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim: Nukleotide, NADH, NADPH, Proteinase K, DTT, Lysozym, RNase A, Ethidiumbromid, Klenow-Enzym, Oligomycin, Aprotinin,  $\alpha$ 2-Makroglobulin, Kreatin-Kinase, Restriktionsenzyme, Tris, BisTris

CytRX, Norcross, USA: TiterMax™

DIFCO, Detroit, USA: Bacto-Agar, Pepton, Hefeextrakt, „Yeast Nitrogen Base“ (ohne Aminosäuren)

Eurogentec, Seraing, Belgien: Oligonukleotide  
Fluka, Buchs, Schweiz: Trichloressigsäure  
Fuji: Röntgenfilme  
Genomed, Bad Oeyenhausen: Kit zur Präparation von Plasmid-DNS („Jetstar-Kit“)  
Gerbu, Gaiberg: Acrylamid, Ampicillin, DTT, NADH  
GIBCO-BRL, Karlsruhe: Agarose („ultra pure, low endoosmosis“), T4-DNS-Ligase, Restriktionsenzyme  
Kodak, München: Röntgenfilme X-Omat XR  
Neosystem, Straßburg, Frankreich: Oligopeptide  
Nestlé-Alete, München: Magermilchpulver  
New England Biolabs, Schwalbach: Restriktionsenzyme  
Pharmacia, Freiburg: Protein A-Sepharose CL4B  
Pierce, Rochester, USA: DSG, EDC, MBS  
Promega, Heidelberg: pGEM-Vektoren  
QIAGEN: QUIAquick Gel Extraktion Kit  
Riedel de Haen, Seelze: Kaliumacetat  
Schleicher & Schüll, Dassel: Nitrozellulosemembran (0,2 µm), Faltenfilter, Filterpapier  
Serva, Heidelberg: Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Serva Blau G, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, Saccharose, SDS, TEMED  
Sigma, München: Ammoniumperoxodisulfat (APS), Aminosäuren, Apyrase Grade VIII, BSA (fettsäurefrei), Cytochrom *c* (aus Pferdeherz), DTNB, DMP, Ethidiumbromid, Glyzerin, Lachsspermien-DNS, Leupeptin, β-Mercaptoethanol, Mineralöl, Molekulargewichtsstandards für SDS-PAGE und BN-PAGE, Oligomycin, PMSF, Triton X-100, Trypsin (Typ XIII aus Rinderpankreas), Valinomycin A

Von der Firma Merck, Darmstadt, wurden alle übrigen Chemikalien als analysenreine Substanzen bezogen.

## 2.6.2 Laborgeräte und sonstige Materialien

Abimed, Düsseldorf: Kolbenhubpipetten

Agfa-Gevaert, München: Entwicklermaschine Gevamatc 60

Beckman Instruments, München: Kühlzentrifugen J2-21, Ultrazentrifugen (L8.Serie), Tischultrazentrifuge TL-100, einschließlich der Rotoren und Zentrifugenröhrchen

Bender und Hobein, München: Mixer zum Vortexen

BioRad, München: „Gene Pulser“ für Elektroporationen

Branson, Heusenstamm: Ultraschallgerät Sonifier 250

Braun und Melsungen: Schüttelwasserbäder, „Certomat“-Schüttler

Eppendorf, Hamburg: Photometer, Schüttler, Thermostate, Tischzentrifugen 5415, Reaktionsgefäße

Genser, Rothenburg: Geltrockner Jet1

Heraeus Christ, Osterode: Brutschränke, Inkubatoren, Bactifuge

Ika, Staufen: Magnetrührer

Memmert, Hannover: Wärmeschränke

Perkin Elmer Cetus, Überlingen: PCR-Maschine

Pharmacia, Freiburg: Spannungsgeräte

Sartorius, Mainz: Feinwaagen, „Semi-Dry“-Blotkammern, Filtrationsapparatur

Schleicher & Schüll, Dassel: Nitrozellulosemembran (0,2 µm), Faltenfilter, Filterpapier, Whatman-3MM-Filterpapier

Schütt, Göttingen: „Bioclav“-Autoklav

Shimadzu, Kyoto, Japan: Photometer UV-240 und UV-120-02

Sigma, München: Tisch-Kühlzentrifugen

Werkstatt, Institut für Physiologische Chemie, München: Gelapparaturen, „Semi-Dry“-Blotkammern

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Funktionelle Charakterisierung der Untereinheit e (Sue) der mitochondrialen $F_1F_0$ -ATP Synthase

Die Untereinheit e der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase, ursprünglich als Tim11 bezeichnet, wurde zunächst als eine Untereinheit der TIM-Maschinerie beschrieben. Die Ergebnisse einiger Experimente erbrachten den Hinweis, dass sie an der Sortierung von Präcytochrom  $b_2$  beteiligt war (Tokatlidis *et al.*, 1996). Später wurde jedoch Sue als eine bisher unbekannte Untereinheit des  $F_0$ -Sektors der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifiziert, die eine signifikante Ähnlichkeit zu den bisher bekannten Untereinheiten e der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthasen anderer Säugerorganismen aufweist.

Außerdem konnte gezeigt werden, dass sie keine Untereinheit der TIM-Maschinerie war (Arnold *et al.*, 1997). Zwar beeinträchtigt die Abwesenheit von Sue die enzymatische Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht, sie hat jedoch Auswirkungen auf die Assemblierung des Enzyms. Die  $F_1F_0$ -ATP Synthase liegt in dimerer Form vor (Arnold *et al.*, 1998). Zudem lassen sich im Monomeren des Enzyms, das man durch Behandlung mit einem milden Detergenz isolieren kann, weder die Untereinheit e, noch die Untereinheit g oder eine weitere Untereinheit, die Untereinheit k nachweisen. Sue, Sug und Suk, alle Komponenten der  $F_0$ -Domäne, wurden daher als dimerspezifische Untereinheiten der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase der Hefe postuliert (Arnold *et al.*, 1998). Disruptiert man Sue oder Sug, wird nur eine monomere Form der ATP Synthase gebildet. Möglicherweise spielen diese Untereinheiten des  $F_0$ -Sektors eine wichtige Rolle bei der Assemblierung der ATP Synthase zu einem dimeren Komplex.

### 3.1.1 Sue ist beteiligt an der Dimerisierung der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase

#### 3.1.1.1 Mittels einer Version von Sue mit C-terminalem Histidin-Anhang läßt sich das Dimere der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase isolieren

Um eine detaillierte Charakterisierung der Funktion von Sue zu ermöglichen, wurden entsprechend der in Material und Methoden beschriebenen Vorgehensweise an das C-Terminale Ende des Proteins Sue 12 Histidinreste angefügt. Das resultierende in Hefe exprimierte Protein wurde als Sue-His<sub>12</sub> bezeichnet. Das Gen für Sue-His<sub>12</sub> wurde in den Hefe-Expressionsvektor YEP51 hinter einen Gal1-Promotor kloniert. YEP51-Sue-His<sub>12</sub> wurde in den Hefestamm  $\Delta$ sue transformiert. Es erfolgte eine Selektion auf Leucin- und Histidin-Auxotrophie. Positive Klone sollten ausschließlich das Protein Sue-His<sub>12</sub> exprimieren und wurden entsprechend  $\Delta$ sue+Sue-His<sub>12</sub> genannt. Durch Western-Blot Analyse isolierter Mitochondrien von  $\Delta$ sue+Sue-His<sub>12</sub> konnte bestätigt werden, dass Sue tatsächlich mit einem Anhang aus Histidinresten versehen war (Abb.4A). Scheinbar werden im Vergleich zu Sue geringere Mengen an Sue-His<sub>12</sub> gebildet. Das könnte daran liegen, dass der Antikörper, der spezifisch den C-terminalen Bereich von Sue erkennt, an die veränderte Form mit Histidin-Anhang nicht mehr so gut bindet, oder das tatsächlich weniger Sue exprimiert wird.

Anschließend wurde untersucht, ob der Assemblierungsstatus der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase durch das Anfügen des C-terminalen Histidin-Anhanges an Sue beeinflusst wird. Dazu wurden isolierte Mitochondrien des Wildtyp-Stammes W303-1A beziehungsweise der Stämme  $\Delta$ sue oder  $\Delta$ sue+Sue-His<sub>12</sub> unter nativen Bedingungen mit dem Detergenz Digitonin solubilisiert und mittels blauer Nativgelelektrophorese analysiert. Der Nachweis des ATPase-Proteinkomplexes erfolgte durch Transfer auf Nitrozellulose und Immundekoration mit einem für die Untereinheit F<sub>1</sub> $\alpha$  des F<sub>1</sub>-Sektors der ATPase spezifischen Antiserum. Während in  $\Delta$ sue die ATPase nur als Monomeres zu erkennen war und zudem freie Untereinheit F<sub>1</sub> nachgewiesen werden konnte, wurde die dimere Form der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase sowohl im Wildtyp, als auch in der Sue-Disruptante, die Sue-His<sub>12</sub> exprimierte, beobachtet (Abb.4B). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Dimerisierung der ATP Synthase nicht beeinträchtigt wird, wenn man Sue durch Sue-His<sub>12</sub> ersetzt.

Zur Beantwortung der Frage, ob *Sue* als ein Dimerisierungsfaktor der  $F_1F_0$ -ATP Synthase in Betracht kommt, sollte nun untersucht werden, ob *Sue* innerhalb des ATP Synthase-Dimeren ebenfalls in dimerer Form vorliegt. Dazu wurde versucht, unter nativen Bedingungen mittels *Sue*-His<sub>12</sub> unter Anwendung von Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus einem heterogenen ATP Synthase-Dimeren *Sue* zu isolieren. Das Plasmid YEP51-*Sue*-His<sub>12</sub> wurde deshalb in den Wildtyp-Stamm W303-1A transformiert. In dem resultierenden, bezüglich *Sue* heterogenen Stamm *sue*+*Sue*-His<sub>12</sub> werden theoretisch entweder homodimere Formen (*Sue*/*Sue* beziehungsweise *Sue*-His<sub>12</sub>/*Sue*-His<sub>12</sub>) oder aber die heterodimere Form gebildet. Als Kontrolle der Spezifität der Bindung an Ni-NTA diene der Wildtyp-Stamm W303-1A, der nur *Sue* enthält. Es sollte abgesichert werden, dass die Isolierung von *Sue* mittels Ni-NTA-Agarose ausschließlich über *Sue*-His<sub>12</sub> erfolgt und nicht durch eine unspezifische Bindung von *Sue*. Nach Solubilisierung mit Digitonin wurden die Lysate der jeweiligen Mitochondrien einer Behandlung mit Ni-NTA-Agarose unterzogen. Eluat (gebundenes Material) sowie Überstand (nicht-gebundenes Material) wurden mittels SDS-PAGE analysiert. Der Nachweis von *Sue* beziehungsweise *Sue*-His<sub>12</sub> erfolgte durch Transfer auf Nitrozellulose und Immunodekoration mit einem für *Sue* spezifischen Antikörper. Im Eluat der Ni-NTA-Fraktion des heterogenen Stammes wurden äquivalente Mengen von *Sue* und *Sue*-His<sub>12</sub> beobachtet (Abb.4C). Die Isolation der Wildtyp-Form von *Sue* konnte nur spezifisch mittels *Sue*-His<sub>12</sub> erfolgt sein, da in Stamm W303-1A, also in Abwesenheit von *Sue*-His<sub>12</sub>, keinerlei Bindung an Ni-NTA beobachtet wurde. Das Auftreten ähnlicher Mengen an *Sue* und *Sue*-His<sub>12</sub> in der Ni-NTA-Fraktion des heterogenen Stammes legt den Schluss nahe, dass sich hier vorwiegend die heterodimere Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase gebildet hat. *Sue*-His<sub>12</sub> liegt demnach mit *Sue* in einem Komplex vor. Da es möglich war, auch  $F_1\alpha$  mittels *Sue*-His<sub>12</sub> spezifisch zu isolieren (Abb.4C), liegt *Sue* assoziiert an *Sue*-His<sub>12</sub> innerhalb des ATP Synthase-Dimeren vor.

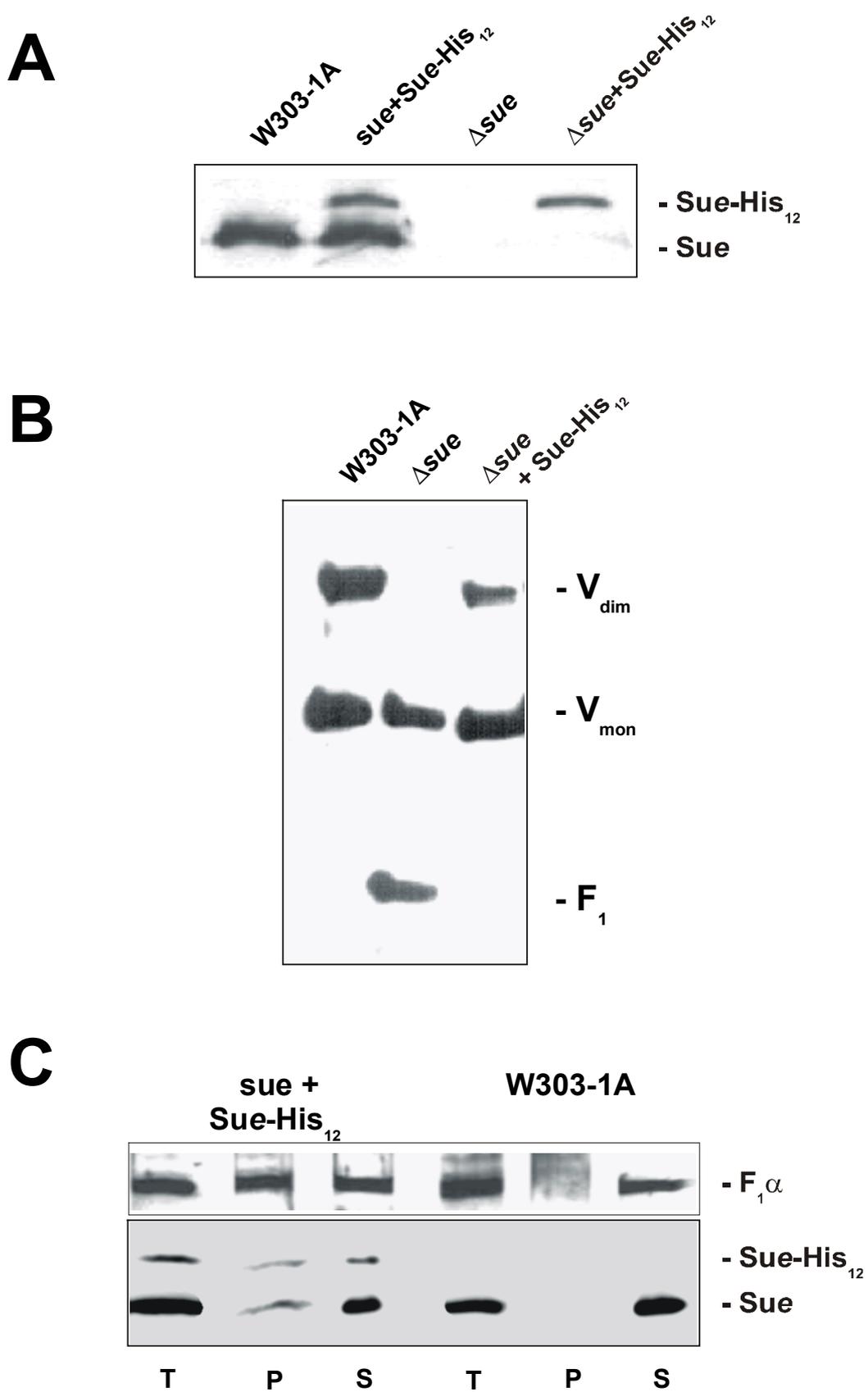


Abb.4

**Abb.4: Isolation des Dimeren der  $F_1F_0$ -ATP Synthase mittels Sue-His<sub>12</sub>**

(A) Nachweis der Transformation von Yep51-Sue-His<sub>12</sub>: Mitochondrien-Schnellpräparationen (siehe Material und Methoden) der Stämme W303-1A,  $\Delta$ sue,  $\Delta$ sue+Sue-His<sub>12</sub> und sue+Sue-His<sub>12</sub> wurden durch SDS-PAGE (16 % Acrylamid, 0,6 % Bisacrylamid) und Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Sue und Sue-His<sub>12</sub> untersucht. Der Nachweis der Proteine erfolgte durch Dekoration mit einem Antiserum, das spezifisch die C-terminale Region von Sue erkennt.

(B) Isolierte Mitochondrien (200  $\mu$ g) des Wildtyp-Stammes W303-1A (WT), sowie der Stämme  $\Delta$ sue und  $\Delta$ sue+Sue-His<sub>12</sub> wurden in 40  $\mu$ l Solubilisierungspuffer (50 mM KOAc, pH 7,4; 30 mM HEPES/KOH, pH 7,4; 10% Glycerin; 1 mM PMSF) mit 1% (w/v) Digitonin für 30 min auf Eis solubilisiert und anschließend zentrifugiert (30 min, 45000 UpM, TLA45-Rotor, Beckman). Die Detergenzextrakte wurden mit 4  $\mu$ l Coomassie Blue<sup>TM</sup> versehen und einer blauen Nativgelelektrophorese (linearer Gradient von 5-10% Acrylamid) unterzogen. Der  $F_1F_0$ -ATP Synthase -Komplex wurde durch Transfer auf Nitrozellulose und Immundekoration mit einem für  $F_1\alpha$  spezifischen Antikörper nachgewiesen.  $V_{dim}$  = dimere Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase;  $V_{mon}$  = monomere Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase;  $F_1$  = freie  $F_1$ -Domäne der  $F_1F_0$ -ATP Synthase

(C) Die Detergenzextrakte wurden wie oben beschrieben gewonnen und mit einer Ni-NTA-Agarose der Firma QUIAGEN nach der in Material und Methoden beschriebenen Vorgehensweise inkubiert. Anschließend wurde die Ni-NTA-Agarose durch einen Zentrifugationsschritt abgetrennt und die nicht gebundenen Proteine im Überstand mit TCA gefällt. Gebundene Proteine wurden nach mehreren Waschschritten mit SDS-enthaltendem Auftragspuffer von der Ni-NTA-Agarose eluiert. Alle Proben wurden einer SDS-PAGE (16 % Acrylamid, 0,6 % Bisacrylamid) unterzogen und mittels Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran und darauffolgende Immundekoration mit Antiseren, die spezifisch das C-terminale Ende von Sue beziehungsweise  $F_1\alpha$  erkennen, analysiert; **T** = Lysat (Total), **P** = Eluat der Ni-NTA-Fraktion (Pellet), **S** = Überstand der Ni-NTA-Fraktion (Supernatant)

**3.1.1.2 Sue existiert als ein Dimeres**

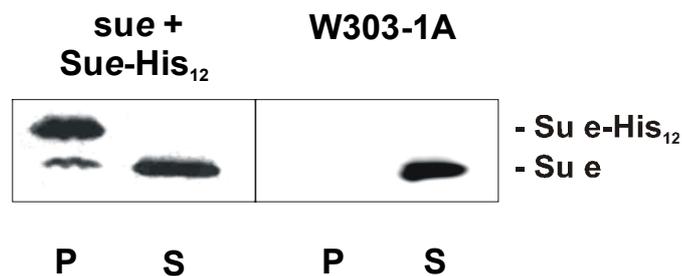
Das Potential von Sue, eine „coiled-coil“-Struktur auszubilden (Arnold *et al.*, 1997), weist auf die Fähigkeit des Proteins zu dimerisieren hin.

Die Beobachtung, dass unter milden Solubilisierungsbedingungen Sue durch Sue-His<sub>12</sub> isoliert werden kann, deutet auf die Anwesenheit beider Proteine in demselben Proteinkomplex hin, beweist jedoch keine direkte Interaktion der Moleküle. Diese sollte unter stringenteren, also denaturierenden, Bedingungen gezeigt werden. Die Stabilisierung eines potentiellen Sue-Heterodimeren unter denaturierenden Bedingungen wurde durch eine der Solubilisierung vorhergehende chemische Quervernetzung mit dem im reduzierenden Milieu spaltbaren chemischen Quervernetzer DTNB (5,5'-Dithiobis-(2-

nitrobenzoesäure)) gewährleistet. *Sue*-His<sub>12</sub> und mit *Sue*-His<sub>12</sub> quervernetzte Proteine wurden nach Inkubation mit Ni-NTA-Agarose mit einem Auftragspuffer, der das Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt, eluiert. Unter diesen Bedingungen wurde die Quervernetzung zerstört. Die einzelnen ursprünglich an *Sue*-His<sub>12</sub> gebundenen Proteine konnten nun mittels SDS-PAGE analysiert werden.

Im Eluat der Ni-NTA-Fraktion befanden sich sowohl *Sue* als auch *Sue*-His<sub>12</sub> (Abb.5). Wie auch im vorangegangenen Versuch erfolgte die Isolierung von *Sue* durch Ni-NTA-Agarose aufgrund einer spezifischen Bindung von *Sue*-His<sub>12</sub>. Im Kontrollversuch mit Mitochondrien des Wildtyp-Stammes, die nur *Sue* enthielten, ließ sich kein *Sue* mittels Ni-NTA-Agarose isolieren.

*Sue* ist demnach in der Lage zu dimerisieren. Wenn die Wildtyp-Form von *Sue* gemeinsam mit *Sue*-His<sub>12</sub> exprimiert wird, liegen beide Moleküle physikalisch assoziiert vor. Nach chemischer Quervernetzung und Lyse der Mitochondrien unter stringenten (denaturierenden) Bedingungen können sie gemeinsam isoliert werden.



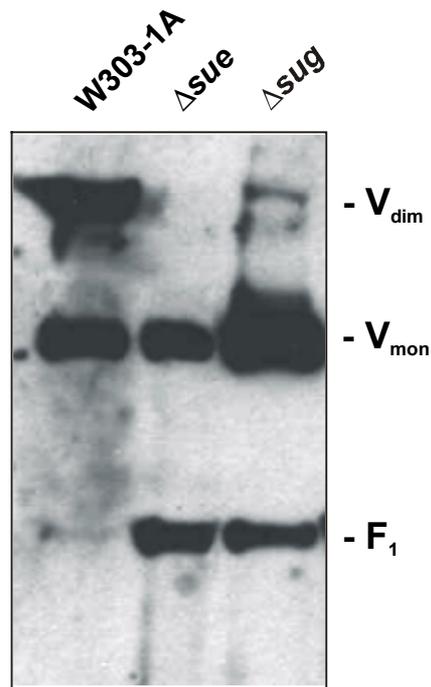
**Abb.5: Nachweis der dimeren Form von *Sue* nach Quervernetzung**

Mitochondrien des Hefestammes *sue*+*Sue*-His<sub>12</sub> sowie des isogenen Wildtypstammes wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit dem chemischen Quervernetzer DTNB behandelt. Nach Abbruch der Quervernetzungsreaktion und darauffolgender Lyse unter denaturierenden Bedingungen (0,5 % SDS, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4, 1mM PMSF) wurde nicht-solubilisierendes Material abzentrifugiert. Der Detergenzextrakt wurde wie in Material und Methoden beschrieben mit Ni-NTA-Agarose inkubiert um die Bindung von *Sue*-His<sub>12</sub> zu ermöglichen. Gebundene und nicht gebundene Proteine wurden nach Spaltung der Quervernetzung mit dem Reduktionsmittel  $\beta$ -Mercaptoethanol einer SDS-PAGE unterzogen. Die Analyse der Proteine erfolgte durch Übertragung auf eine Nitrozellulose-Membran und darauffolgende Immundekoration mit einem Antiserum gegen *Sue*; **P** = an Ni-NTA gebundenes Material (Pellet); **S** = nicht gebundenes Material (Überstand).

### 3.1.1.3 Nur in *Sue* Disruptionsstämmen kommt die $F_1F_0$ -ATP Synthase gänzlich in monomerer Form vor

Die bisher beschriebenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass *Sue* eine wichtige Rolle bei der Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase spielen könnte. Es war nun von Interesse zu untersuchen, inwieweit *Sug* für eine Dimerisierung des Enzym essentiell ist. Laut Arnold *et al.* (1998) und eigenen Ergebnissen (siehe unten) sind sowohl die Untereinheit e als auch die Untereinheit g notwendig für die Bildung einer dimeren Form der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase der Hefe. In ihrem Artikel beschreiben die Autoren jedoch, dass im Stamm  $\Delta sug$  das Protein *Sue* zwar im Vergleich zum Wildtyp-Stamm signifikant reduziert, aber doch deutlich erkennbar vorhanden ist. Hängt die Dimerisierung der ATP Synthase in erster Linie von *Sue* ab und weniger von *Sug*, dann müsste im Stamm  $\Delta sug$  noch eine geringe Menge an dimerer  $F_1F_0$ -ATP Synthase nachgewiesen werden können.

Es wurden deshalb aus den Null-Mutanten von *Sue* und *Sug* sowie des korrespondierenden Wildtyp-Stammes W303-1A Mitochondrien isoliert. Sie wurden wie in Material und Methoden beschrieben unter nativen Bedingungen mit 1% Digitonin solubilisiert und der gewonnene Proteinextrakt mittels blauer Nativgelelektrophorese analysiert. Im Gegensatz zu Arnold *et al.* wurden die Proteine entsprechend der in Material und Methoden beschriebenen Vorgehensweise auf eine Nitrozellulosemembran (und nicht auf eine PVDF-Membran) transferiert. Dieses Verfahren führte zu einem genaueren Nachweis der zu untersuchenden Proteine. Der Nachweis der ATP Synthase erfolgte wie in Abb. 6 beschrieben. Im Stamm  $\Delta sug$  konnte tatsächlich ein geringer aber signifikanter Anteil an dimerer ATP Synthase nachgewiesen werden. Die geringe Menge an *Sue* in  $\Delta sug$  scheint eine Dimerisierung einer entsprechend geringen Menge an  $F_1F_0$ -ATP Synthase zu ermöglichen. *Sug* hingegen scheint nicht essentiell für die Bildung eines ATP Synthase-Dimeren zu sein, da trotz der Abwesenheit des Proteins in  $\Delta sug$  ein Dimeres dieses Enzyms nachgewiesen werden kann. Die signifikante Reduktion der dimeren Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase im Stamm  $\Delta sug$  ist daher wahrscheinlich eine indirekte Folge der geringen Expression von *Sue* und nicht der Deletion des Gens von *Sug*.



**Abb.6 :** Es existiert ein geringer Anteil dimerer Form der ATP Synthase in Mitochondrien des Hefestammes  $\Delta sug$

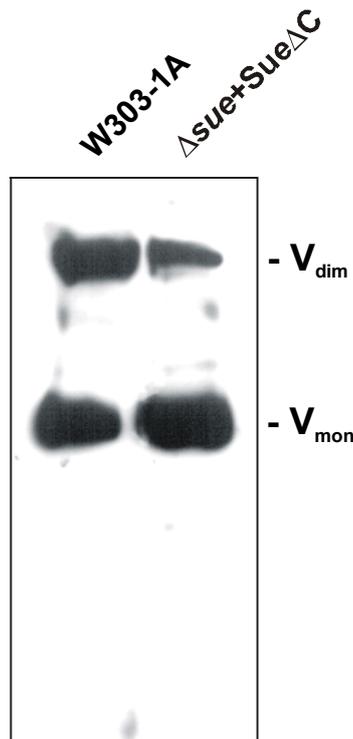
Jeweils 200  $\mu$ g isolierter Mitochondrien des Wildtyp-Stammes W303-1A (WT), sowie der Stämme  $\Delta sug$  und  $\Delta sue$  wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit Digitonin lysiert und mittels BN-PAGE analysiert. Die  $F_1F_0$ -ATP Synthase wurde durch Transfer auf Nitrozellulose und Immundekoration mit einem für  $F_1\alpha$  spezifischen Antikörper und Exposition des markierten Antikörpers auf einem Röntgenfilm der Dauer von 30 min nachgewiesen.  $V_{dim}$  = dimere Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase;  $V_{mon}$  = monomere Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase;  $F_1$  = freie  $F_1$ -Domäne der  $F_1F_0$ -ATP Synthase .

#### 3.1.1.4 Für die Dimerisierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase wird die C-terminale Region von Sue nicht benötigt

Eine Datenbanksuche, bei der die vollständige Aminosäuresequenz der Untereinheit e der  $F_1F_0$ -ATP Synthase eingegeben worden war, ergab eine sich über den gesamten Sequenzbereich mit Ausnahme der C-terminalen Region erstreckende signifikante Ähnlichkeit zu anderen Untereinheiten e der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase aus Säugerorganismen. Die C-terminale Region der Untereinheit e aus Hefe ist gegenüber ihren homologen Proteinen allerdings um 30 Aminosäuren länger (Arnold *et al.*, 1997). Es war von Interesse zu prüfen, ob der verlängerte C-Terminus eine Rolle bei der Dimerisierung der ATP Synthase spielt. Um die Auswirkung der allein in Hefe vorkommenden C-terminalen Region von Sue auf die Dimerisierung der ATP Synthase zu untersuchen, wurde im Hefestamm  $\Delta sue$  eine C-terminal verkürzte Form von Sue exprimiert. Das resultierende Derivat  $\Delta sue+Sue\Delta C$  enthielt das um die 36 C-terminalen Aminosäuren verkürzte Protein Sue $\Delta C$ . Die Expression in Hefe erfolgte über den Vektor Yep51.

Mitochondrien des Stammes  $\Delta sue+Sue\Delta C$  wurden isoliert und mit Digitonin solubilisiert. Mit dem Proteinextrakt wurde eine blaue Nativgelelektrophorese durchgeführt. Proteinkomplexe die  $F_1\alpha$  enthielten, wurden auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert und anschließend mit einem für  $F_1\alpha$  spezifischen Antiserum dekoriert. Parallel dazu wurden als Kontrolle Mitochondrien des Wildtyp-Stammes W303-1A analysiert.

Im Stamm  $\Delta sue+Sue\Delta C$  konnte ebenso wie im Stamm W303-1A dimere ATP Synthase nachgewiesen werden. Allerdings scheint im Gegensatz zum Wildtyp eine geringere Menge an dimerer Form der ATP Synthase im Vergleich zur monomeren gebildet worden zu sein. Die zusätzlich vorhandene C-terminale Region der Untereinheit e der Hefe ist somit nicht essentiell für die Dimerisierung der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase. Möglicherweise hat sie aber einen Einfluß auf die Assemblierung beziehungsweise Stabilisierung der dimeren Form des Enzyms.



**Abb.7: Der C-terminale Bereich von *Sue* ist für die Ausbildung der dimeren Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht essentiell**

Isolierte Mitochondrien der Hefestämme W303-1A und  $\Delta sue+Sue\Delta C$  wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit Digitonin lysiert und mittels blauer Nativgelelektrophorese analysiert. Der Nachweis der ATPase erfolgte durch Dekoration mit einem für  $F_1\alpha$  spezifischen Antikörper.  $V_{dim}$  = dimere Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase;  $V_{mon}$  = monomere Form.

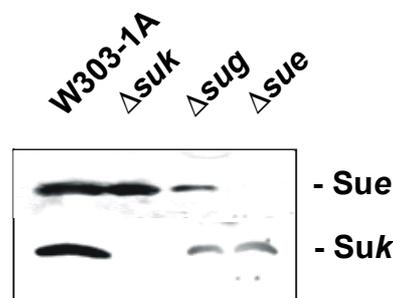
### 3.1.2 Die Untereinheit e der $F_1F_0$ -ATP Synthase steht mit der Untereinheit k in enger Beziehung

#### 3.1.2.1 In *Sue* Disruptionsstämmen ist die Expression von *Suk* signifikant reduziert

Für die Untersuchung der Funktion der Untereinheit e der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase sollten Erkenntnisse über Lage und mögliche Interaktionspartner dieses Proteins innerhalb der ATPase gewonnen werden. Kürzlich erhaltene Ergebnisse erbrachten den Hinweis, dass es einen Zusammenhang zwischen der Stabilität der Untereinheit k der ATPase (*Suk*) und dem Einbau

der Untereinheit e in das Enzym gibt (Arnold *et al.*, 1998). *Suk* ist wahrscheinlich eine Untereinheit des  $F_0$ -Sektors, die peripher auf der Seite des Intermembranraumes mit dem Enzym assoziiert vorliegt. Eine Analyse auf Anwesenheit von *Suk* ergab, dass in den Stämmen  $\Delta sue$  sowie  $\Delta sug$ , in denen keine dimere Form der ATPase nachweisbar ist, die Untereinheit k nicht stabil exprimiert wird (Arnold *et al.*, 1998). Allerdings wurde ein Antiserum mit relativ niedrigem Titer benutzt. Es ist möglich, dass deshalb geringe Mengen an *Suk* nicht nachgewiesen werden konnten.

Das Experiment sollte deshalb mit Seren mit höherem Titer an Antikörpern aus späteren Blutungen wiederholt werden. Die größere Konzentration an spezifisch *Suk* erkennendem Antikörper ermöglichte einen empfindlicheren Nachweis des Proteins. Mitochondrien, die aus den Null-Mutanten  $\Delta suk$ -,  $\Delta sug$ -,  $\Delta sue$  und dem isogenen Wildtyp-Stamm isoliert worden waren, wurden durch Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit der von Arnold *et al.* (1998) als dimerspezifisch postulierten Untereinheiten e und k des  $F_0$ -Sektors der  $F_1F_0$ -ATP Synthase untersucht. Sowohl im  $\Delta sue$  Stamm, als auch im  $\Delta sug$  Stamm konnte *Suk* nachgewiesen werden (Abb.8). Die Menge von *Suk* war allerdings gegenüber dem Wildtyp deutlich reduziert. *Sue* und *Sug* sind also nicht essentiell für die Assemblierung von *Suk*, spielen aber scheinbar eine bedeutende Rolle bezüglich der Expression des Proteins.



**Abb.8: Die Stabilität der Untereinheiten e und k des  $F_0$ -Sektors der  $F_1F_0$ -ATP Synthase in Abwesenheit von als dimerspezifisch postulierten Untereinheiten**

Mitochondrien (50  $\mu$ g Protein) der Hefestämme  $\Delta sue$ ,  $\Delta sug$ ,  $\Delta suk$  und des isogenen Wildtyp-Stammes W303-1A wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf die Stabilität der Untereinheiten e und k der  $F_1F_0$ -ATP Synthase untersucht. Die Immundekoration erfolgte mit neu gewonnenen Antiseren mit höherem Titer, die spezifisch *Suk* beziehungsweise *Sue* erkennen.

### 3.1.2.2 C-terminale Modifikationen von *Sue* beeinträchtigen die Expression von *Suk* nicht

Es stellte sich nun die Frage, ob die Modifizierung von *Sue* am C-Terminus durch das Anfügen von 12 Histidinresten einen Einfluss auf die Integration von *Suk* in die  $F_1F_0$ -ATP Synthase hat und ob das C-terminale Ende möglicherweise essentiell für die stabile Assemblierung von *Suk* in das Enzym ist. Zur Beantwortung der Fragestellung wurden neben Mitochondrien des Wildtypstammes W303-1A diejenigen der isogenen Stämme  $\Delta sue + Sue-His_{12}$  und  $\Delta sue + Sue\Delta C$  herangezogen und mittels Western-Blot-Analyse und Dekoration der Nitrozellulosemembran mit einem Antiserum, das spezifisch die Untereinheit k der ATPase erkennt, auf deren Anwesenheit untersucht. Die Expression von *Suk* entsprach in beiden untersuchten Mutanten der des Wildtyps (Abb.9). Das bedeutet, dass die Modifizierung von *Sue* im Bereich des C-Terminus die Integration von *Suk* in den ATPase-Komplex nicht beeinträchtigt. Ebenso wenig führt eine Deletion der C-terminalen Region von *Sue* zu einer geringeren Stabilität des Proteins *Suk*. Der um etwa 30 Basenpaare gegenüber den Untereinheiten e anderer Organismen verlängerte C-Terminus der Untereinheit e der Hefe ist also nicht essentiell für die Stabilisierung der Untereinheit k.



**Abb.9: Die Stabilität der Untereinheit k der  $F_1F_0$ -ATP Synthase in Mutanten mit C-terminal modifizierter Untereinheit e**

Mitochondrien (50  $\mu$ g Protein) der Hefestämme  $\Delta sue$ ,  $\Delta sue + Sue-His_{12}$ ,  $\Delta sue + Sue\Delta C$  und des isogenen Wildtyp-Stammes W303-1A wurden durch SDS-PAGE, Western-Blot-Analyse und Dekoration mit einem Antiserum mit hohem Titer auf die Stabilität der Untereinheit k der  $F_1F_0$ -ATP Synthase untersucht.

### 3.1.2.3 Sue und Suk sind räumlich eng benachbart

Die Abhängigkeit der Stabilität von *Suk* von der Anwesenheit von *Sue* könnte auf eine physikalische Interaktion der Moleküle hindeuten. Es sollte unter Anwendung von Quervernetzungsexperimenten geklärt werden, ob sich zwischen *Sue* und *Suk* eine räumlich enge Beziehung nachweisen lässt. Zunächst wurden isolierte Mitochondrien des Wildtyp-Stammes W303-1A und der *Suk*-Deletionsmutante  $\Delta suk$  wie in Material und Methoden beschrieben einer Behandlung mit den chemischen Quervernetzern DSG beziehungsweise MBS unterzogen. DSG ist ein homo-bifunktionales, für Aminogruppen spezifisches Reagenz, das die chemische Vernetzung benachbarter Proteine erlaubt. MBS hingegen ist hetero-bifunktional und reagiert spezifisch sowohl mit Amino- als auch mit Sulfhydrylgruppen von Aminosäuren. Quervernetzungsprodukte mit *Sue* wurden nach SDS-PAGE des Proteinextraktes und Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran mit Hilfe eines *Sue* spezifisch erkennenden Antikörpers identifiziert.

In Anwesenheit von MBS wurden drei Quervernetzungsprodukte mit *Sue* beobachtet, die eine Molekularmasse von etwa 19, 23 und 42 kDa hatten. Ein Quervernetzungsprodukt der Molekularmasse von 19 kDa, das von *Sue* (11 kDa) und einem Protein mit einer Molekularmasse von etwa 8 kDa gebildet wurde, erschien auch nach chemischer Quervernetzung mit DSG. Da die Molekularmasse von *Sue* 10,7 kDa beträgt, das von *Suk* 7,5 kDa könnten die Resultate der Quervernetzung bei etwa 19 kDa aus einer Vernetzung von *Sue* und *Suk* herrühren. Zudem fehlten die Quervernetzungsprodukte, wenn die Quervernetzung bei Mitochondrien der Null-Mutante von *Suk*,  $\Delta suk$ , durchgeführt wurde (Abb.10A). Dieses Ergebnis unterstützte die Annahme einer engen räumlichen Beziehung zwischen *Sue* und *Suk*.

Durch Immunpräzipitation des Quervernetzungsproduktes ließ sich der Hinweis auf eine Verbindung von *Sue* und *Suk* durch den Quervernetzer DSG bestätigen. Dazu wurden Mitochondrien des Wildtyp-Stammes W303-1A mit dem chemischen Quervernetzer DSG inkubiert und anschließend unter denaturierenden Bedingungen mit 0,5% SDS lysiert. Nach Verdünnung des Lysates wurde *Sue* zusammen mit seinen Quervernetzungspartnern mit Antikörpern spezifisch für die Untereinheit e der  $F_1F_0$ -ATP Synthase immunpräzipitiert. Eine Negativkontrolle mit Präimmenserum, das *Sue* nicht spezifisch erkennt, wurde parallel durchgeführt. Mit dem *Sue* spezifisch erkennenden Antiserum konnte *Sue* sowie das Quervernetzungsprodukt von 19 kDa immunpräzipitiert werden, wie die Western-Blot-Analyse des Polyacrylamidgels

und nachfolgende Immundekoration zeigte. Das Quervernetzungsprodukt bei 19 kDa konnte ebenso durch ein *Suk* spezifisch erkennendes Antiserum nachgewiesen werden (Abb.10B). Wurde mit Präimmunserum gearbeitet, erfolgte keine Präzipitation. Die Immunfällung war demnach spezifisch. Die geringere Menge an Quervernetzungsprodukt, die von Antikörpern gegen *Suk* erkannt wurde, könnte darauf zurückzuführen sein, dass nach der chemischen Verkoppelung *Suk* nicht mehr so gut detektierbar war.

Es ergaben sich somit fundierte Hinweise darauf, dass das Quervernetzungsprodukt von 19 kDa aus der chemischen Vernetzung der Untereinheit e mit der Untereinheit k durch DSG herrührt. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, dass *Sue* und *Suk* sich in sehr enger Nachbarschaft innerhalb des  $F_0$ -Sektors der  $F_1F_0$ -ATP Synthase befinden müssen.

---

**Abb.10: Die Untereinheiten e und k der  $F_1F_0$ -ATP Synthase sind nahe benachbart in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert**

(A) Isolierte Mitochondrien (150  $\mu$ g) der Hefestämme W303-1A (Wildtyp) und  $\Delta$ *suk* wurden mit DMSO (Kontrolle) beziehungsweise den chemischen Quervernetzern DSG (0,2 mM) beziehungsweise MBS (0,2 mM) für 30 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden sie präzipitiert und durch 10 min Schütteln bei 4°C in 30  $\mu$ l Laemmli-Puffer lysiert. Das Lysat wurde durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Quervernetzungsprodukten mit *Sue* untersucht.

(B) Immunpräzipitation des Quervernetzungsproduktes bei 19 kDa mit einem Antikörper gegen *Sue* nach Quervernetzung mit DSG. Isolierte Mitochondrien des Wildtyp-Stammes W303-1A (16 Ansätze à 150  $\mu$ g) wurden 30 min mit dem Quervernetzungsreagenz DSG bei 0°C inkubiert. Nach Abbruch der Reaktion wurden sie pelletiert, in SH-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7,4) resuspendiert, zu 8 Ansätzen à 300  $\mu$ g zusammengefasst und erneut präzipitiert. Die Präzipitate wurden in Solubilisierungspuffer (0,5% SDS, 0,1 M Tris/HCl, pH 7,4, 2mM PMSF) 10 min bei 4°C solubilisiert und anschließend 3 min bei 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation der Detergenzextraktes (15 min, 20 000 Upm, Sigma, Rotor 12154, 4°C) wurde der Überstand von jeweils zwei Ansätzen zusammengefasst und in einem Parallelansatz eine Immunfällung mit Präimmunserum (**PI**) beziehungsweise Antikörper gegen *Sue* ( **$\alpha$ -Sue**), die an Protein A-Sepharose gekoppelt waren, durchgeführt. Die adsorbierten Proteine wurden durch 15 min Schütteln bei 4°C in 30  $\mu$ l Laemmli-Puffer solubilisiert. Danach erfolgte eine Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE, Transfer auf Nitrozellulose und Immundekoration mit Antiseren gegen *Sue* beziehungsweise *Suk*. Das aus einer chemischen Quervernetzung von *Sue* mit *Suk* entstandene Produkt wurde durch einen Pfeil hervorgehoben.

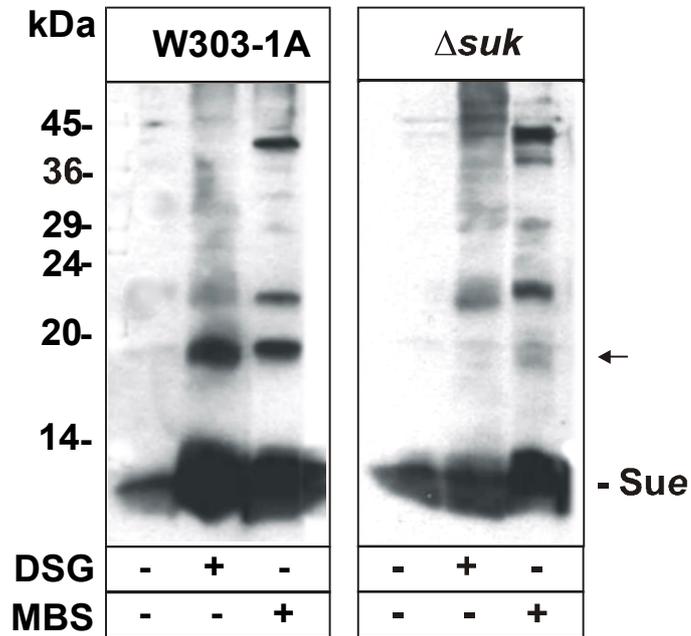
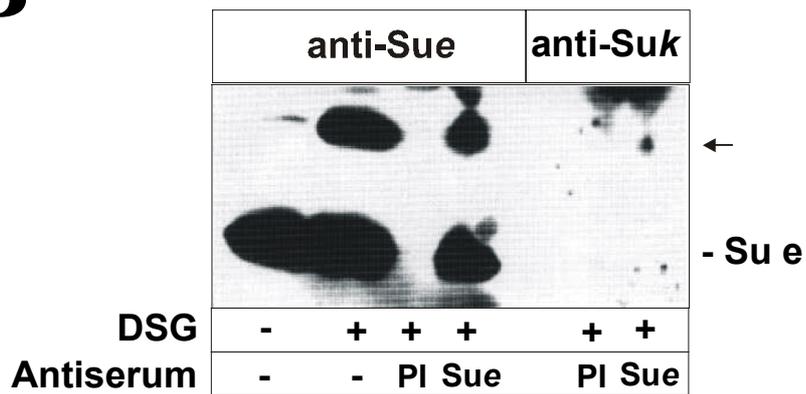
**A****B**

Abb.10

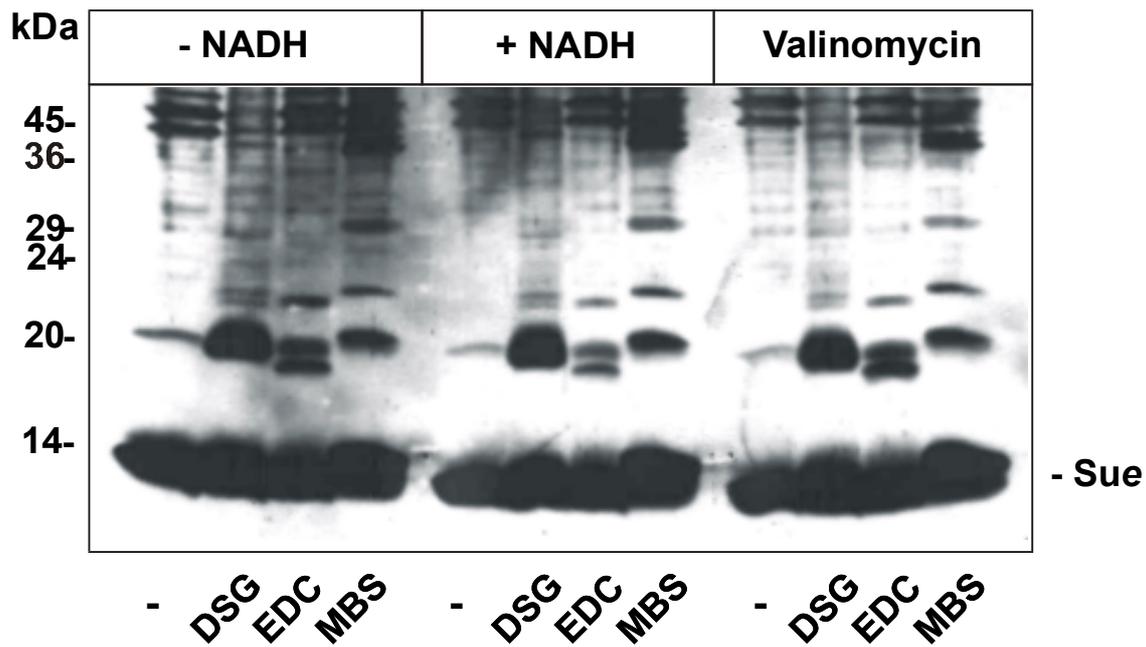
### 3.1.2.4 Die Interaktion von *Sue* mit anderen Proteinen wird nicht durch eine Veränderung des Membranpotentials beeinflusst

Ist die Interaktion von *Sue* mit seinen Partnerproteinen, von denen bis jetzt nur *Suk* und wahrscheinlich *Cox2* (siehe Kapitel 3.3.8) bekannt sind, dynamisch und von einer Veränderung der Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase betroffen? Die Funktion des Enzyms als ATP Synthase beziehungsweise als ATPase ist abhängig vom Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran. Die ATP Synthase stellt unter Ausnutzung eines Protonengradienten über die innere mitochondriale Membran ATP her. Fungiert das Enzym als ATPase, wird ATP hydrolysiert. Zur Untersuchung der Auswirkungen einer Veränderung des Membranpotentials auf die molekulare Umgebung von *Sue* wurden intakte Mitochondrien des Wildtyp-Stammes W303-1A vor Durchführung der chemischen Quervernetzung durch DSG, EDC (vernetzt Lysin- und Carboxylreste von Aminosäuren miteinander) und MBS einer Behandlung mit Valinomycin unterzogen. Valinomycin zerstört das Membranpotential. Zur Erhöhung des Membranpotentials vor der Quervernetzung wurden Parallelansätze mit 2mM NADH inkubiert. Nach der Quervernetzung wurden die mitochondrialen Proteine durch Western-Blot-Analyse auf Quervernetzungsprodukte mit *Sue* untersucht. Das Muster der Quervernetzungsprodukte mit *Sue* verändert sich weder nach Aufhebung, noch nach Erhöhung des Membranpotentials (Abb.11). Somit scheint eine Veränderung des Membranpotentials und die resultierende Veränderung der ATP Synthase-Aktivität keinen Einfluss auf die Interaktion von *Sue* mit durch DSG, EDC oder MBS gebundenen Proteinen zu haben.

---

**Abb.11: Die Interaktion von *Sue* mit seiner Umgebung ist vom Membranpotential unabhängig**

Isolierte Mitochondrien (150  $\mu$ g Protein) des Hefestammes W303-1A wurden nach Inkubation mit NADH (2mM) beziehungsweise Valinomycin (1 $\mu$ M) (2min bei 25°C) für 30 Minuten mit den Quervernetzern DSG, EDC und MBS behandelt. Anschließend wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Die Umgebung von *Sue* wurde mittels Western-Blot-Analyse und Dekoration der Nitrozellulosemembran mit einem Antikörper, der spezifisch den C-Terminus von *Sue* erkennt, analysiert



**Abb.11**

### 3.2 Gibt es ein dem Suk verwandtes Protein?

Untersuchungen zur Identifikation von Komponenten der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase des Organismus *Saccharomyces cerevisiae* mittels zweidimensionaler Gelelektrophorese wiesen auf die Existenz bisher unbekannter kleinerer Untereinheiten, die im  $F_0$ -Sektor lokalisiert sind, hin (Arnold *et al.*, 1998). Als eine dieser Untereinheiten stellt die Untereinheit k wahrscheinlich ein peripher im Intermembranraum an den  $F_0$ -Sektor der ATPase assoziiert vorliegendes Protein dar (Arnold *et al.*, 1998), dessen Funktion allerdings noch nicht geklärt ist. Da möglicherweise die Funktion homologer Proteine bekannt ist, wurde von uns deshalb eine Datenbanksuche mit der vollständigen Sequenz der Aminosäuren dieser Untereinheit durchgeführt. Durch Identifizierung möglicher Verwandter der Untereinheit k der  $F_1F_0$ -ATP Synthase sollten so Informationen über die Funktion dieses Proteins (unter dem Aspekt, dass es möglicherweise mit Sue reagiert) gewonnen werden. Die Datenbanksuche ergab Hinweise auf die mögliche Existenz eines weiteren, bislang noch nicht beschriebenen Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dieses hypothetische Protein wurde  $Suk^{hom}$  genannt.

### 3.2.1 Es existiert im Genom von *Saccharomyces cerevisiae* eine Sequenz, die für ein dem *Suk* verwandtes Protein kodieren könnte

*Suk* ist weder essentiell für die enzymatische Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase, noch für deren Dimerisierung. Der Phänotyp der *Suk*-Disruptante entspricht dem des isogenen Wildtyps. Hinweise auf die mögliche Funktion von *Suk* sollte deshalb eine Datenbankrecherche geben. Hierbei wurde die Aminosäuresequenz von *Suk* mit der DNS-Sequenz der Hefe verglichen, um offene Leserahmen, die für ein der Untereinheit *k* homologes Protein codierten, aufzuspüren. Es wurde das Programm rBlast N benutzt. Interessanterweise wies das Ergebnis der Recherche auf das Vorhandensein eines hypothetischen und bisher unbekanntes Homologen von *Suk*, das wir  $Suk^{hom}$  genannt haben, in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hin (Abb. 12A). Die signifikante Homologie zu der Sequenz von *Suk*, die für 68 Aminosäuren kodiert, erstreckt sich auf 61 Aminosäuren, beginnend mit dem N-Terminus. In diesem Bereich beträgt sie etwa 45%. Lokalisiert ist die für das hypothetische Protein kodierende Sequenz ebenso wie die von *Suk* auf dem Chromosom 15 des Hefegenoms. Sie befindet sich zwischen dem Gen, das für das Protein Hsp10 kodiert (YOR020C) und dem offenen Leserahmen YOR021C. Sie birgt die Information für ein potentiell Protein, das sich aus insgesamt 90 Aminosäuren zusammensetzt. Dieser hypothetische offene Leserahmen war im „Hefegenom-Sequenzierungsprojekt“ übersehen worden, da nur offene Leserahmen klassifiziert wurden, die für hypothetische Proteine codierten, die aus mindestens 100 Aminosäuren zusammengesetzt sind. Das Resultat eines Hydrophobizitätsprofils der Sequenz von  $Suk^{hom}$  ergab für den homologen Bereich ebenfalls eine signifikante Ähnlichkeit mit dem von *Suk* (Abb.12B).

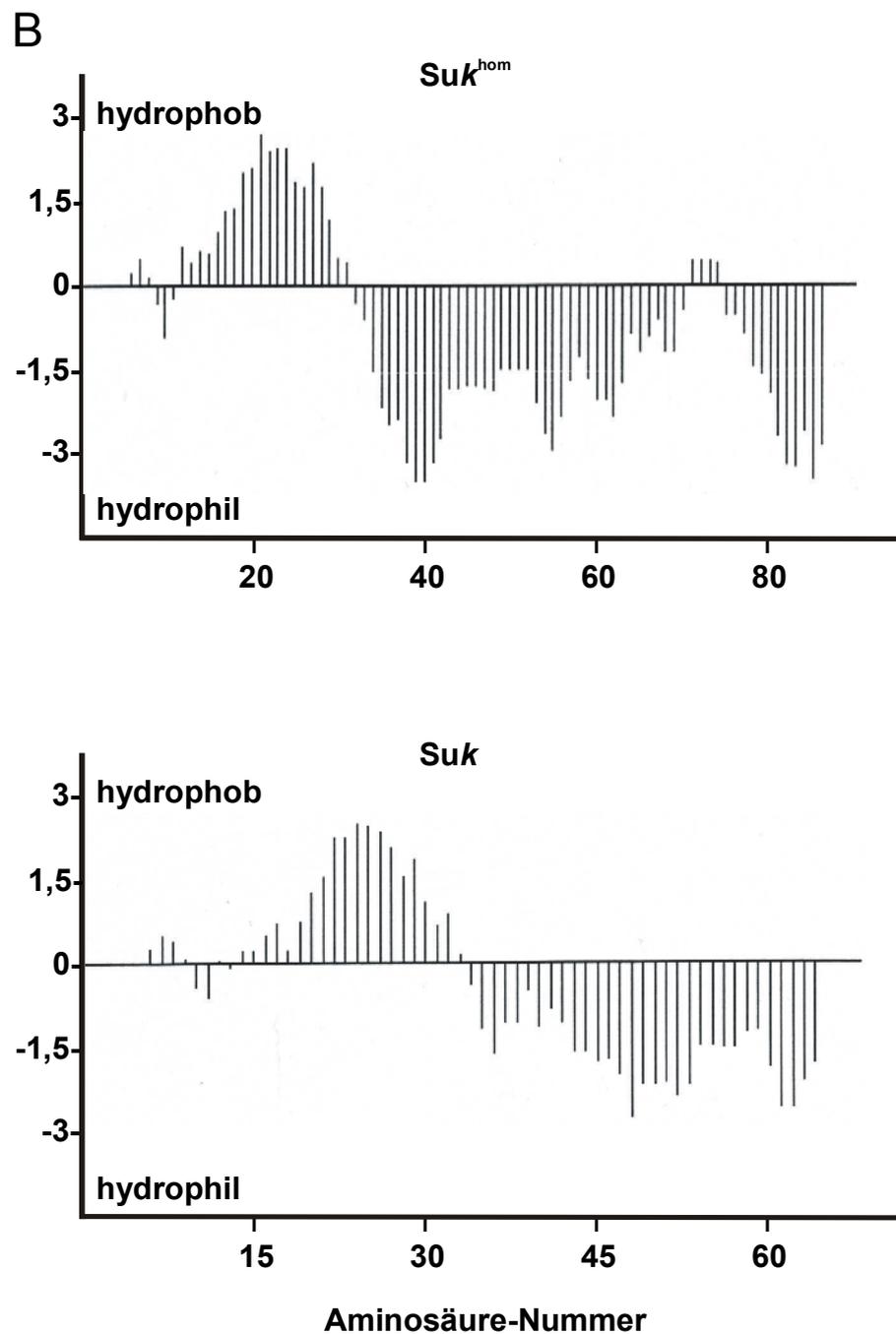
Es stellte sich die Frage, ob dieses hypothetische Protein tatsächlich ein Homologes von *Suk* darstellt. Es könnte möglich sein, dass  $Suk^{hom}$  ebenso wie *Suk* eine Untereinheit des  $F_0$ -Sektors der  $F_1F_0$ -ATP Synthase bildet. Obwohl eine detaillierte Analyse der ATP Synthase nach Solubilisierung in Triton X-100 (0,6 g/g Protein) keinerlei Hinweis auf die Anwesenheit einer weiteren Untereinheit, die  $Suk^{hom}$  entsprechen könnte, lieferte, kann man nicht ausschließen, dass  $Suk^{hom}$  während der Solubilisierung aus dem Komplex gelöst und daher nicht zusammen mit ihm isoliert worden war. Möglicherweise wird  $Suk^{hom}$  auch nur unter besonderen Wachstumsbedingungen exprimiert.

Zur Untersuchung der möglichen Funktion von  $Suk^{hom}$  und seiner Beziehung zu *Suk* sollte das Gen des hypothetischen Proteins sowohl im Wildtyp als auch in der *Suk*- Nullmutante disruptiert werden.

Zur Überprüfung einer möglichen Lokalisation in den Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* sollte außerdem ein spezifischer Antikörper gewonnen werden.

## A

<u>Suk</u>	MGAAYHFMGKAIPPHQLAIGTLGLLGLLVVPNPFKSAKPKTVDIKTDN	48
	MGAAY GK + PH LAI T + V + F + KPKT K +	
<u>Suk<sup>hom</sup></u>	MGAAYKVFgKTVQPHVLAISTF--IATAAVASYF-TTKPKT---KNEG	42
<u>Suk</u>	KDEEKFIENYLKKHSEKQDA	68
	K+ + S DA	
<u>Suk<sup>hom</sup></u>	KNSSA-LSQQKSGESSNSDAMGKDDDVVKSIEGFLNDLEKDTRQDTKAN	90

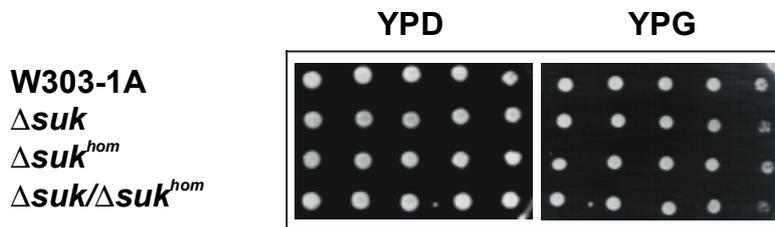


**Abb.12: Vergleich der Aminosäuresequenzen von *Suk* und *Suk<sup>hom</sup>* sowie das Hydrophobizitätsprofil beider Proteine**

(A) Die identischen beziehungsweise ähnlichen Aminosäurereste von *Suk* und *Suk<sup>hom</sup>* sind zwischen beiden Sequenzen gesondert hervorgehoben.  
(B) Mittels Computerprogrammen errechnete Hydrophobizitätsprofile beider Proteine.

### 3.2.2 $Suk^{hom}$ ist für die Funktion der Atmungskette nicht erforderlich

Zur Untersuchung der Funktion von  $Suk^{hom}$  wurde zunächst das Gen dieses hypothetischen Proteins im Stamm  $\Delta suk$  disruptiert, um Hinweise auf eine überlappende Funktion von  $Suk$  und  $Suk^{hom}$  zu erhalten. Der Hefestamm  $\Delta suk^{hom}$  wurde durch Ersetzen der genetischen Information für  $Suk^{hom}$  durch die Information für eine Histidin-Auxotrophie gewonnen. Dabei wurde die in Material und Methoden beschriebene Vorgehensweise befolgt. Zur Konstruktion der Doppeldisruptante  $\Delta suk/\Delta suk^{hom}$  wurde im Stamm  $\Delta suk$ , der bereits eine Histidin-Auxotrophie besitzt, das Gen für  $Suk^{hom}$  kodiert durch ein Kanamycin-Resistenzgen ersetzt. Zunächst wurde untersucht, ob das Fehlen von  $Suk^{hom}$ , beziehungsweise der beiden Homologen  $Suk$  und  $Suk^{hom}$  gleichzeitig, eine Auswirkung auf die Funktion der Atmungskette hat. Die Untersuchung des Atmungskettenphänotyps erfolgte durch Übertragung der Hefezellen auf Agarplatten mit Glucose als Kohlenstoffquelle (YPD), beziehungsweise auf Platten mit dem nichtfermentierbaren Substrat Glyzerin (YPG), auf dem Stämme mit defekter Atmungskette nicht wachsen. Wie auch im Stamm  $\Delta suk$  zeigte sich sowohl im Stamm  $\Delta suk^{hom}$  als auch in der Doppeldisruptante keine Beeinträchtigung der Funktion der Atmungskette (Abb.13). Das Wachstum der untersuchten Hefestämme auf YPG-Platten entsprach dem des Wildtyps. Ein Fehlen des hypothetischen Proteins  $Suk^{hom}$  hat somit unter den gewählten Wachstumsbedingungen keinerlei Auswirkungen auf die Aktivität der Atmungskettenenzyme.  $Suk^{hom}$  ist demnach für die Funktion der einzelnen Bestandteile der Atmungskette beziehungsweise der  $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht essentiell. Ebenso wenig scheint eine Überlappung der Funktion beider Proteine vorzuliegen, da auch das Fehlen beider Proteine keinerlei Auswirkungen auf die Aktivität der Atmungskettenenzyme hat.

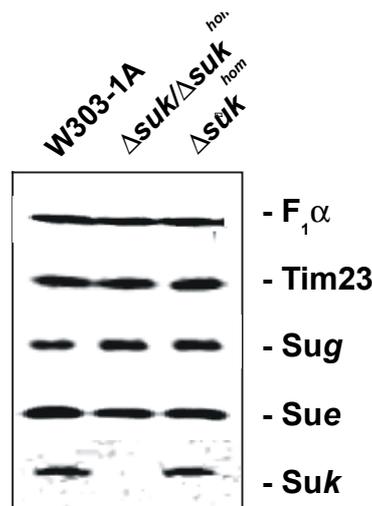


**Abb.13: Wachstumsphänotyp von Disruptanten des vermuteten Proteins  $Suk^{hom}$**

Zellen von  $\Delta suk^{hom}$ ,  $\Delta suk/\Delta suk^{hom}$  und des isogenen Wildtypstammes W303-1A wurden auf SD-Agarplatten ausgestrichen und zwei Tage bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Zellen wie in Material und Methoden beschrieben in einer Verdünnungsreihe auf YPD- beziehungsweise YPG-Platten aufgetragen und zwei Tage bei 30°C inkubiert.

### 3.2.3. Die Disruption von $Suk^{hom}$ beeinflusst die Expressionsrate verschiedener kleiner Untereinheiten der $F_0$ -Domäne der $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob  $Suk^{hom}$  alleine oder gemeinsam mit  $Suk$  eine Auswirkung auf die Anwesenheit einzelner Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase hat. Aus den Hefestämmen  $\Delta suk^{hom}$ ,  $\Delta suk/\Delta suk^{hom}$  und des isogenen Wildtyp-Stammes W303-1A, die auf YP-Medium mit 2% Galaktose herangezogen worden waren, wurden Mitochondrien isoliert. Galaktose wird normalerweise als Kohlenstoffquelle der Glucose vorgezogen, wenn mitochondriale Proteine analysiert werden sollen. Durch Glucose wird die Expression vieler mitochondrialer Proteine gehemmt. Mittels Western-Blot-Analyse wurden die Hefestämme auf die Anwesenheit verschiedener Untereinheiten der ATP Synthase untersucht. Sowohl im Stamm  $\Delta Suk^{hom}$ , als auch in der Doppeldisruptante  $\Delta suk/\Delta Suk^{hom}$  entsprach die Menge an  $F_1\alpha$ , Sug,  $Suk$  (das natürlich in der Doppeldisruptante fehlte), Sue und  $Suj$  genau der des Wildtyps (Abb.14). Die Disruption von  $Suk^{hom}$  beziehungsweise  $Suk$  und  $Suk^{hom}$  gleichzeitig hat somit keine Auswirkung auf die Anwesenheit dieser Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase.



**Abb.14: Einfluss der Disruption des hypothetischen Proteins  $Suk^{hom}$  auf die Anwesenheit verschiedener Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase**

Mitochondrien (50  $\mu$ g Protein) der Hefestämme W303-1A,  $\Delta suk/\Delta Suk^{hom}$  und  $\Delta Suk^{hom}$  wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase untersucht. Als Kontrolle der Vergleichbarkeit der Ergebnisse diente Tim23.

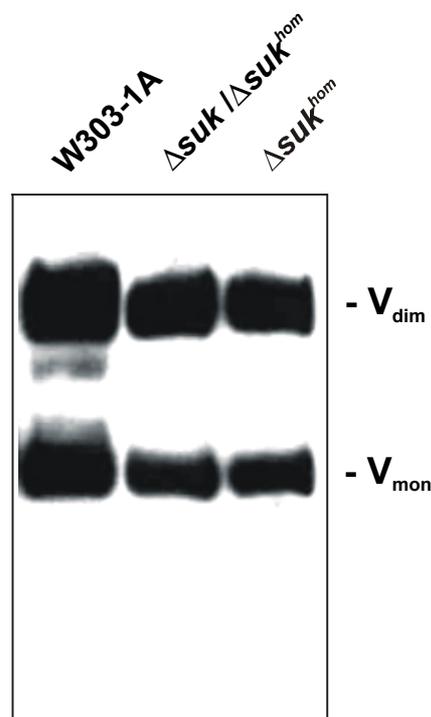
### 3.2.4 $Suk^{hom}$ ist für die Dimerisierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht essentiell

Weiterhin stellte sich die Frage, ob das hypothetische Protein  $Suk^{hom}$  einen Einfluss auf die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase ausübt. Die Dimerisierung der ATP Synthase hat zwar keinen Auswirkung auf ihre eigene Aktivität, aber es ist möglich, dass sie die Aktivitäten anderer Komponenten der Atmungskette, wie des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes oder der Cytochrom  $c$ -Oxidase, beeinflusst und über die Aktivität dieser Komplexe indirekt die Produktion von ATP durch die ATP Synthase gesteuert wird.

Zur Untersuchung der Dimerisierung der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase in  $Suk^{hom}$ -Disruptanten wurden Mitochondrien aus den Stämmen W303-1A,  $\Delta Suk^{hom}$  und  $\Delta suk/\Delta Suk^{hom}$  isoliert, unter nativen Bedingungen (1% Digitonin) solubilisiert und eine blaue Nativgelelektrophorese durchgeführt. Der Nachweis der  $F_1F_0$ -ATP Synthase erfolgte durch Western-Blot-Analyse und Dekoration der Nitrozellulosemembran mit einem für  $F_1\alpha$  spezifischen Antikörper. Das Verhältnis von monomerer zu dimerer  $F_1F_0$ -ATP Synthase war in allen untersuchten Stämmen ähnlich (Abb.15), es bestand also kein signifikanter Unterschied zum Wildtyp. Eine Beeinflussung der Dimerisierung der

F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase durch das hypothetische Protein  $Suk^{hom}$  konnte mittels der oben beschriebenen Methodik nicht nachgewiesen werden.

Die bezogen auf das hypothetische Protein  $Suk^{hom}$  durchgeführten Experimente gaben keinerlei Hinweis darauf, dass es in die oxidative Phosphorylierung involviert oder für die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase von Belang ist. Da es auch nicht gelang, nach der in „Material und Methoden“ beschriebenen Vorgehensweise einen Antikörper gegen ein in Mitochondrien oder Cytosol befindliches Protein  $Suk^{hom}$  zu gewinnen, bleibt seine Existenz in der Hefe beziehungsweise als mitochondriales Protein weiterhin spekulativ.



**Abb.15: Das hypothetische Protein  $Suk^{hom}$  hat keinerlei Einfluss auf die Dimerisierung der mitochondrialen F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase**

Isolierte Mitochondrien der Hefestämme W303-1A,  $\Delta Suk^{hom}$  und  $\Delta suk / \Delta Suk^{hom}$  wurden entsprechend der in Material und Methoden beschriebenen Vorgehensweise mit Digitonin solubilisiert. Mit den Detergenzextrakten wurde eine blaue Nativgelelektrophorese (linearer Gradient von 5-13% Acrylamid) durchgeführt. Die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase wurde durch Transfer der aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose und Immundekoration mit einem für F<sub>1</sub> $\alpha$  spezifischen Antikörper nachgewiesen. V<sub>dim</sub> = dimere Form der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase; V<sub>mon</sub> = monomere Form der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase.

### 3.3 Untersuchungen zu einer möglichen Interaktion zwischen dem Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplex und der $F_1F_0$ -ATP Synthase

Die mitochondriale Atmungskette der Hefe besteht aus drei NADH-Dehydrogenasen anstelle einer NADH-Ubichinol-Oxidoreduktase wie sie in Säugerorganismen zu finden ist (de Vries und Marres, 1987) und drei weiteren membrangebundenen Enzymkomplexen, der Succinat-Ubichinol-Oxidoreduktase, dem Cytochrom  $bc_1$ -Komplex sowie dem Cytochrom  $c$ -Oxidase-Komplex. Die beim Fluss von Elektronen zwischen diesen Komplexen freiwerdende Energie frei wird in einen Protonengradienten über die Innenmembran transduziert welcher dann von der  $F_1F_0$ -ATP Synthase genutzt wird, um ATP zu synthetisieren.

Es konnte nachgewiesen werden, dass der Cytochrom  $bc_1$  -Komplex (Komplex III der mitochondrialen Atmungskette) mit dem Cytochrom  $c$ -Oxidase-Komplex (Komplex IV der mitochondrialen Atmungskette) einen Suprakomplex bildet (Cruciat *et al.*, 2000) und die beiden Komplexe wahrscheinlich nicht, wie zuvor häufig angenommen, frei und unabhängig voneinander in der inneren Membran der Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* diffundieren. Neuere Untersuchungen der Atmungsketten von Säugerorganismen ergaben, dass die Komplexe I, III und IV eine makromolekulare Netzstruktur bilden, die als „Respirasom“ bezeichnet wurde (Schägger und Pfeiffer, 2000, 2001). Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob auch die mitochondriale  $F_1F_0$ -ATP Synthase von *Saccharomyces cerevisiae* in den Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplex integriert vorliegt.

#### 3.3.1 Die Assemblierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase wird für die optimale Aktivität des Cytochrom $c$ -Oxidase- und des Cytochrom $bc_1$ -Komplexes benötigt

Obwohl die  $F_1F_0$ -ATP Synthase auch in ihrer monomeren Form vollständig aktiv ist, läßt sich eine dimere Form des Enzyms nachweisen. Allerdings ist in den Stämmen  $\Delta sue$  und  $\Delta sug$ , in denen die  $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht dimerisiert, die Aktivität der Cytochrom  $c$ -Oxidase um etwa 40% reduziert (Tokatlidis *et al.*, 1996; Boyle *et al.*, 1999). Im folgenden Experiment sollte entsprechend die Auswirkung der Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase auf die Aktivität der Cytochrom  $c$ -Oxidase untersucht werden.

Es wurden die Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivitäten von Stämmen, bei denen jeweils die Gene für die als dimer-spezifisch beschriebenen Untereinheiten *Suk* beziehungsweise *Sug* und *Sue* der  $F_1F_0$ -ATP Synthase disruptiert worden waren, mit der Aktivität des Wildtyp-Stammes W303-1A verglichen. Als Kontrolle wurde die Aktivität von  $\Delta\textit{cox4}$ , in dem die Cytochrom *c*-Oxidase nicht assembliert und somit nicht funktionsfähig ist, gemessen.

Im Stamm  $\Delta\textit{suk}$ , in dem die Assemblierung der ATPase nach derzeitigem Kenntnisstand nicht betroffen ist, ist die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase nur geringfügig auf 85% der Wildtyp-Aktivität reduziert. Eine signifikante Reduktion der Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase konnte man in den Stämmen  $\Delta\textit{sug}$  (auf 47% der Aktivität des Wildtyps) und  $\Delta\textit{sue}$  (auf 23% des Wildtyps) beobachten. Die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase in  $\Delta\textit{core1}$  (der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex ist nicht assembliert und nicht funktionell) betrug 101% der Wildtyp-Aktivität (Tabelle 4).

Des Weiteren wurde in den oben beschriebenen Stämmen die Aktivität des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes untersucht. Als Kontrolle diente die Aktivität von  $\Delta\textit{core1}$ , einer nicht-funktionellen Mutante des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes.

Die Aktivität dieses Komplexes in den Mutanten entsprach weitgehend derjenigen der Cytochrom *c*-Oxidase. In  $\Delta\textit{suk}$  war die Aktivität auf 83% des Wildtyps reduziert, in  $\Delta\textit{sug}$  auf 53% und in  $\Delta\textit{sue}$  auf 23%. Im Stamm  $\Delta\textit{cox4}$  (die Cytochrom *c*-Oxidase ist nicht assembliert und nicht funktionsfähig) konnte eine Aktivität des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes von 97% des Wildtyps gemessen werden (Tabelle 5).

Die Assemblierung und Funktionalität der Cytochrom *c*-Oxidase hat offensichtlich keinen Einfluss auf die Funktionsfähigkeit des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes (Cruciat *et al.* 2000 und eigene Ergebnisse) und umgekehrt. Die Beeinträchtigung der Funktionalität sowohl des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes als auch der Cytochrom *c*-Oxidase dürften somit eine direkte Folge des Assemblierungszustandes der  $F_1F_0$ -ATP Synthase sein.

**Tabelle 4: Auswirkung der Disruption von Untereinheiten der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase auf die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase**

<i>Mitochondrienstamm</i>	Aktivität (µmol/min/mg)	% der Aktivität des Wildtyps
W303-1A (Wildtyp)	1,42	100
$\Delta suk$	1,21	85
$\Delta sug$	0,67	47
$\Delta sue$	0,33	23
$\Delta core1$	1,44	101
$\Delta cox4$	0,004	0

Die Aktivität der Wildtyp-Mitochondrien sowie der Disruptanten bezieht sich auf µmol Cytochrom *c* (oxidierte Form) pro Minute pro mg an mitochondrialem Protein. Die Messungen der Aktivitäten erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, mit intakten Mitochondrien.

**Tabelle 5: Auswirkung der Disruption von Untereinheiten der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase auf die Aktivität der NADH-Cytochrom *c*-Reduktase**

<i>Mitochondrienstamm</i>	Aktivität (µmol/min/mg)	% der Aktivität des Wildtyps
W303-1A (Wildtyp)	1,89	100
$\Delta suk$	1,56	83
$\Delta sug$	1,00	53
$\Delta sue$	0,44	23
$\Delta cox4$	1,81	97
$\Delta core1$	0,18	9

Die Aktivität der Wildtyp-Mitochondrien sowie der Disruptanten bezieht sich auf µmol Cytochrom *c* (reduzierte Form) pro Minute pro mg an mitochondrialem Protein. Die Messungen der Aktivitäten erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, mit intakten Mitochondrien.

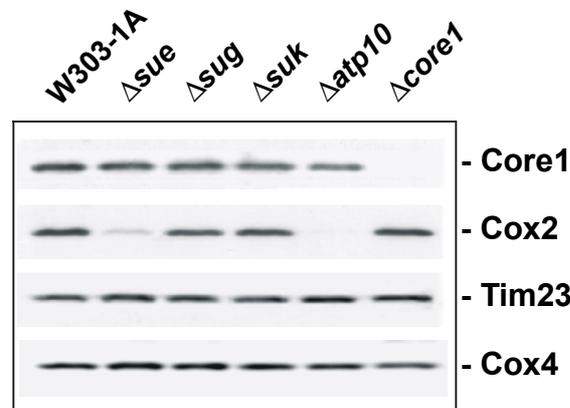
### 3.3.2 In Abwesenheit von Sue ist die Expression der Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase reduziert

Hinweise auf eine Interaktion zweier Enzyme lassen sich auch durch Untersuchung der Stabilität der Untereinheiten des einen Enzyms in Abhängigkeit von der Expression verschiedener Untereinheiten des anderen Enzyms gewinnen. Die Ergebnisse aus der Messung der Aktivitäten der Cytochrom *c*-Oxidase beziehungsweise des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes erlauben den Schluss, dass sich der Assemblierungszustand der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase auf die Aktivität der beiden Komponenten des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplexes auswirkt. Deshalb sollte im Folgenden untersucht werden, ob in Stämmen, in denen Dimer-spezifische Untereinheiten der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase deletiert worden waren, die Expression von Untereinheiten des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes beziehungsweise der Cytochrom *c*-Oxidase betroffen ist. Dazu wurden die Stämme  $\Delta sue$ ,  $\Delta sug$ ,  $\Delta suk$  und als Kontrollen  $\Delta atp10$  und  $\Delta core1$  verwendet.

Isolierte Mitochondrien der oben genannten Stämme und des isogenen Wildtyp-Stammes wurden durch Western-Blot-Analyse mit den Antiseren gegen Core1 (eine Untereinheit des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes) sowie gegen Cox2 und Cox4 (Untereinheiten der Cytochrom *c*-Oxidase) und als Kontrolle mit dem Antiserum gegen Tim23, dessen Stabilität nicht von dem Assemblierungszustand des ATPase-Komplexes betroffen ist, untersucht. Es zeigte sich, dass die Expression von Core1 nur in  $\Delta atp10$ , einem Stamm der keinen vollständig assemblierten F<sub>0</sub>-Sektor enthält und in dem kein Sue in den ATPase-Komplex eingebaut wird, leicht reduziert ist. Die Expression von Cox2 jedoch wird in  $\Delta sue$  und in  $\Delta atp10$  signifikant herunterreguliert, während die Menge an Cox2 in  $\Delta sug$  (in dem nur ein sehr geringer Teil der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase als Dimeres vorliegt) der des Wildtyps entspricht. In *Suk*-Disruptanten, in denen die F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase normal assembliert, wird Cox2 normal exprimiert. Die Menge an Cox4 ist in keiner der Mutanten gegenüber dem Wildtyp verändert (Abb.16).

Die Anwesenheit von Cox2 scheint besonders von der Expression von Sue abhängig zu sein. In  $\Delta sug$ , in dem eine geringe Menge an Sue und dimerer ATP Synthase vorliegt, ist Cox2 nur leicht herunterreguliert. Der Einfluss der Anwesenheit von Sue wirkt sich jedoch nicht auf alle Untereinheiten der Cytochrom *c*-Oxidase aus, wie an der dem Wildtyp entsprechend Expression von Cox4 zu sehen ist.

Obwohl in  $\Delta sue$  und  $\Delta sug$  die Aktivität des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes reduziert ist, hat die Abwesenheit der entsprechenden Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase keine Auswirkungen auf Core1.



**Abb.16: Stabilität der Untereinheiten des Cytochrom  $bc_1$ - und des Cytochrom  $c$ -Oxidase- Komplexes in Abwesenheit der dimeren Form der  $F_1F_0$ -ATP Synthase**

Mitochondrien (50  $\mu$ g Protein) der Hefestämme W303-1A,  $\Delta sue$ ,  $\Delta sug$ ,  $\Delta suk$ ,  $\Delta atp10$  und  $\Delta core1$  wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Komponenten des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes und der Cytochrom  $c$ -Oxidase untersucht. Als Kontrolle für die Vergleichbarkeit der aufgetragenen Mengen an mitochondrialem Protein diene Tim23, ein von den durchgeführten Deletionen nicht betroffenes Protein.

### 3.3.3 Defekte in der Assemblierung des Cytochrom $c$ -Oxidase- sowie des Cytochrom $bc_1$ -Komplexes haben keine signifikanten Auswirkungen auf die Stabilität von Untereinheiten des $F_0$ -Sektors der $F_1F_0$ -ATP Synthase

Falls der Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplex mit der  $F_1F_0$ -ATP Synthase einen weiteren, größeren Suprakomplex bildet, ist es möglich, dass umgekehrt die Stabilität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase von der Assemblierung der Cytochrom  $c$ -Oxidase beziehungsweise des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes abhängt.

Zur Untersuchung der Auswirkungen des Assemblierungszustandes der Cytochrom  $c$ -Oxidase auf Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase wurden neben dem Wildtyp-Stamm W303-1A die Stämme  $\Delta impl$ ,  $\Delta cox4$ ,  $\Delta cox8$  und

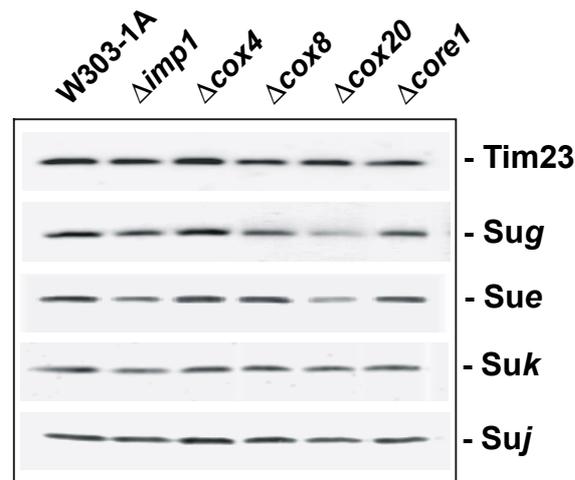
$\Delta\text{cox20}$  verwendet. Im Stamm  $\Delta\text{imp1}$  wird Cox2 nicht zu einem reifen Protein prozessiert und liegt außerdem im Vergleich zum Wildtyp in sehr geringen Mengen vor (Behrens *et al.*, 1991; Schneider *et al.*, 1991; Nunnari *et al.*, 1993). Deshalb assembliert der Cytochrom *c*-Oxidase-Komplex nicht zu einem aktiven Enzym. Auch im Stamm  $\Delta\text{cox20}$  erfolgt keine Reifung von Cox2 (Hell *et al.*, 2000). Die  $\Delta\text{cox4}$ -Nullmutante besitzt ebenfalls einen petite-Phänotyp, der darauf zurückgeführt werden kann, dass die Cytochrom *c*-Oxidase nicht assembliert (Glerum und Tzagoloff, 1998). Cox8 wird für die optimale Funktion der Respiration benötigt (Patterson *et al.*, 1986). Im Stamm  $\Delta\text{cox8}$  ist die Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase jedoch nicht nachweisbar beeinträchtigt. Isolierte Mitochondrien dieser Stämme wurden durch Western-Blot-Analyse mit den Antiseren gegen die Untereinheiten g, e, k und j der  $F_1F_0$ -ATP Synthase und als Kontrolle der Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit dem Antiserum gegen Tim23 analysiert. In allen untersuchten Stämmen wurden die Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase stabil exprimiert (Abb.17). Allerdings scheint die Expression von Sug und vor allem Sue in  $\Delta\text{imp1}$  und  $\Delta\text{cox20}$ , also in Mutanten in denen die Biogenese von Cox2 beeinträchtigt ist, leicht aber nicht sehr deutlich reduziert zu sein. Der Assemblierungszustand der Cytochrom *c*-Oxidase hat demnach keine signifikanten Auswirkungen auf die Anwesenheit der untersuchten Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase.

Im Stamm  $\Delta\text{core1}$  ist der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex nicht assembliert und nicht funktionell. Auch hier entspricht die Menge der untersuchten Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase der des Wildtyps (Abb.17). Ihre Expression ist also nicht abhängig vom Assemblierungszustand des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes.

---

**Abb.17: Die Anwesenheit einiger Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase in Deletionsmutanten des Cytochrom  $bc_1$ - beziehungsweise des Cytochrom *c*-Oxidase-Komplexes**

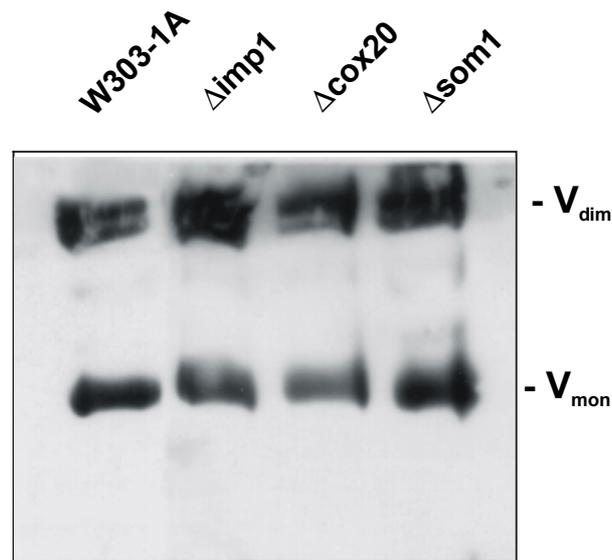
Mitochondrien (50  $\mu\text{g}$  Protein) der Hefestämme W303-1A,  $\Delta\text{imp1}$ ,  $\Delta\text{cox4}$ ,  $\Delta\text{cox8}$ ,  $\Delta\text{cox20}$  und  $\Delta\text{core1}$  wurden durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit von Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase untersucht. Als Kontrolle diente Tim23.



### 3.3.4 Der Assemblierungszustand des Cytochrom *c*-Oxidase-Komplexes hat keine Auswirkungen auf die Assemblierung der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase

Der Assemblierungszustand der Cytochrom *c*-Oxidase hatte keinerlei signifikante Auswirkungen bezüglich der Expression der Untereinheiten k und j der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase. Scheinbar sind jedoch ihre Untereinheiten e und g in den Stämmen  $\Delta imp1$  und  $\Delta cox20$  in denen die Cytochrom *c*-Oxidase nicht assembliert, leicht betroffen. In Stämmen, in denen Sue oder Sug fehlen, liegt die ATP Synthase in monomerer Form vor. Ist somit auch die Assemblierung der ATP Synthase in den Hefestämmen  $\Delta imp1$  und  $\Delta cox20$  beeinträchtigt?

Mitochondrien des Wildtyps W303-1A sowie der Disruptionsstämmen  $\Delta imp1$ ,  $\Delta cox20$  und  $\Delta som1$  wurden mit Digitonin solubilisiert und mittels einer blauen Nativgelelektrophorese analysiert. Som1 wird für die Funktion der Imp1 Peptidase benötigt (Esser *et al.*, 1996). Im Stamm  $\Delta som1$  ist diese nicht funktionsfähig, es liegt somit ebenfalls keine assemblierte und funktionsfähige Cytochrom *c*-Oxidase vor. Proteinkomplexe, die die Untereinheit F<sub>1</sub> $\alpha$  der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase enthielten, wurden durch Western-Blot Analyse des Nativgels und nachfolgende Immundekoration mit einem für F<sub>1</sub> $\alpha$  spezifischen Antikörper identifiziert (Abb.18). In Abwesenheit einer assemblierten Cytochrom *c*-Oxidase ist im Vergleich zum Wildtyp das Verhältnis zwischen monomerer und dimerer Form der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase nicht signifikant verändert. Ist der Cytochrom *c*-Oxidase-Komplex nicht assembliert, scheint dies also keinen Einfluss auf die Assemblierung beziehungsweise die Stabilität des Dimers der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase zu haben.



**Abb.18: Die Assemblierung der Cytochrom *c*-Oxidase hat keinen nachweisbaren Einfluss auf die Assemblierung beziehungsweise die Stabilität der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase**

Isolierte Mitochondrien der Hefe-Stämme W303-1A,  $\Delta imp1$ ,  $\Delta cox20$  und  $\Delta som1$  wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit Digitonin solubilisiert. Mit den Proteinextrakten wurde eine blaue Nativgelelektrophorese (linearer Gradient von 5-10% Acrylamid) durchgeführt. Der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase-Komplex wurde durch Transfer auf Nitrozellulose und Immundekoration mit einem für F<sub>1</sub> $\alpha$  spezifischen Antikörper nachgewiesen. V<sub>dim</sub> = dimere Form der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase; V<sub>mon</sub> = monomere Form der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase.

### 3.3.5 Die Assemblierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase beeinflusst die Assemblierung des Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplexes

Der Assemblierungszustand der  $F_1F_0$ -ATP Synthase wird durch denjenigen der Cytochrom  $c$ -Oxidase offenbar nicht beeinflusst. Welche Folgen hat nun eine mangelhafte Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase? Die Aktivitäten der Cytochrom  $c$ -Oxidase und des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes sind in Stämmen, in denen die ATPase nicht vollständig zu einem Dimeren assembliert, beeinträchtigt. Beeinflusst der Assemblierungszustand der  $F_1F_0$ -ATP Synthase möglicherweise die Assemblierung der Cytochrom  $c$ -Oxidase oder des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes und damit deren Funktionalität?

Um eine Antwort auf diese Fragen zu erhalten, wurde die Auswirkung der Disruption von Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase auf den Assemblierungszustand des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes untersucht. Dazu wurden folgende Stämme gewählt: der Wildtyp-Stamm W303-1A,  $\Delta sue$  (die Disruption führt dazu, dass keinerlei ATPase-Dimeres mehr nachweisbar ist),  $\Delta sug$  (nur sehr geringe Mengen an dimerer ATPase sind vorhanden),  $\Delta suk$  (die Disruption hat keine nachweisbaren Auswirkungen auf die Assemblierung der ATPase),  $\Delta ATP10$  (nur ein geringer Teil der ATPase-Untereinheiten assembliert zu einer nicht voll funktionsfähigen ATPase) und als Vergleichsstamm  $\Delta impl$  in dem die Cytochrom  $c$ -Oxidase nicht zu einem funktionsfähigen Komplex assembliert.

Isolierte Mitochondrien der oben genannten Stämme wurden mit Digitonin solubilisiert. Mit dem Solubilisat wurde eine blaue Nativgelelektrophorese durchgeführt. Proteinkomplexe, die die Cytochrom  $c$ -Oxidase beziehungsweise den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex enthielten, wurden durch Western-Blot-Analyse und Immundekoration mit einem Antiserum gegen eine ihrer Untereinheiten nachgewiesen (Abb. 19A und B).

Im Wildtyp-Stamm liefen der Cytochrom  $c$ -Oxidase-Komplex und der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex auf der gleichen Höhe, was darauf hinweist, dass beide Komplexe miteinander assoziiert vorliegen und einen Suprakomplex bilden (Cruciat *et al.*, 2000). Unter Lysebedingungen dieses Experiments konnte man in Mitochondrien des Wildtyp-Stammes zwei Formen des Suprakomplexes beobachten. Dabei entspricht vermutlich die kleinere Form mit einer Molekularmasse von etwa 1000 kDa dem Suprakomplex, der aus einem Dimeren der Cytochrom  $c$ -Oxidase und einem Dimeren des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes zusammengesetzt ist (Cruciat, persönliche Mitteilung). Die Zusammensetzung der größeren Form ist noch nicht bekannt. Diese größere

Form war im Stamm  $\Delta sue$  nicht mehr nachweisbar. Ausserdem scheint die Assemblierung des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes teilweise beeinträchtigt zu sein. Neben der Bande bei etwa 1000 kDa, die der Molekularmasse des intakten Suprakomplexes entspricht, deutete das Auftreten einer etwas kleineren Bande bei einem  $s$  von etwa 800 kDa darauf hin. Diese trat nach Immundekoration mit Antiseren auf, die spezifisch die Untereinheit Cox5a der Cytochrom  $c$ -Oxidase (Abb.19A) beziehungsweise das Rieske FeS-Protein des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes (Abb.19B) erkennen. Nach Immundekoration mit dem Antiserum gegen das Rieske FeS-Protein konnte eine weitere Bande bei etwa 670 kDa beobachtet werden. Diese Bande entspricht in ihrer Größe der Größe der einzigen aufgetretenen Bande in Stamm  $\Delta impl$ . Im Stamm  $\Delta sug$  blieb die Bande mit der größten Molekularmasse erhalten. Gleiches wurde bei dem Stamm  $\Delta sue$  beobachtet. Die Proteinkomplexe im Stamm  $\Delta suk$  waren dieselben wie im Wildtyp. Hier blieb der Suprakomplex anscheinend vollständig assembliert. Im Stamm  $\Delta atp10$  konnte man weder die Untereinheit Cox5a noch das Rieske FeS-Protein nachweisen. Der Grad der Assemblierung (wie möglicherweise auch der Grad der Aktivität, siehe Tabellen 4 und 5) des Suprakomplexes ist demnach mit dem Grad der Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase korreliert.

---

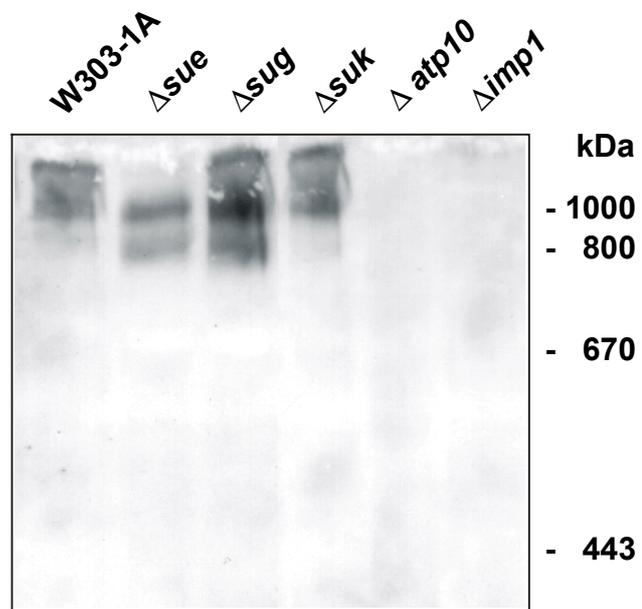
**Abb.19: Die Assemblierung des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes ist beeinträchtigt, wenn die  $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht vollständig assembliert**

Je 200  $\mu$ g isolierter Mitochondrien der Hefe-Stämme W303-1A,  $\Delta sue$ ,  $\Delta sug$ ,  $\Delta suk$ ,  $\Delta atp10$  und  $\Delta impl$  wurden unter nativen Bedingungen mit Digitonin solubilisiert und mittels blauer Nativgelelektrophorese (linearer Gradient von 5-10% Acrylamid) analysiert. Die Proteine wurden auf Nitrozellulose transferiert.

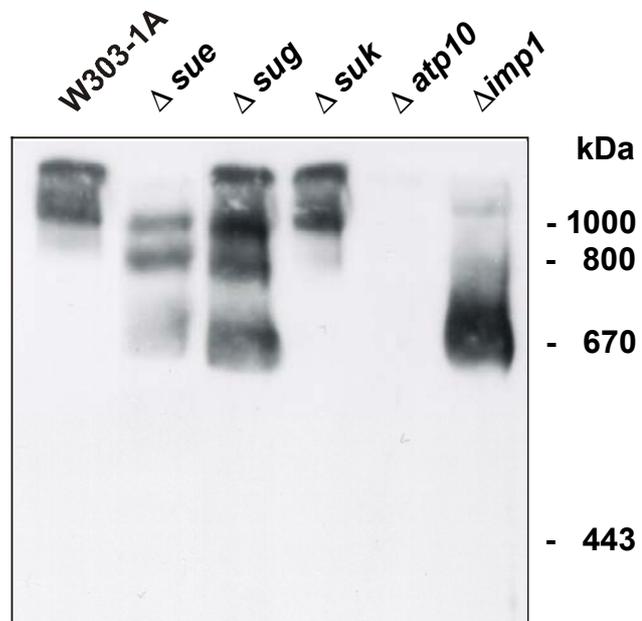
**(A)** Immundekoration mit einem spezifisch Cox5a, eine Untereinheit der Cytochrom  $c$ -Oxidase erkennenden Antikörper.

**(B)** Immundekoration mit einem das Rieske FeS-Proteins des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes spezifisch erkennenden Antikörper.

Als Markerproteine dienten Rinderthyreoglobulin (670 kDa) und Pferdemiczapoferritin (443 kDa).

**A**

anti-Cox5a

**B**

anti-FeS

Abb.19

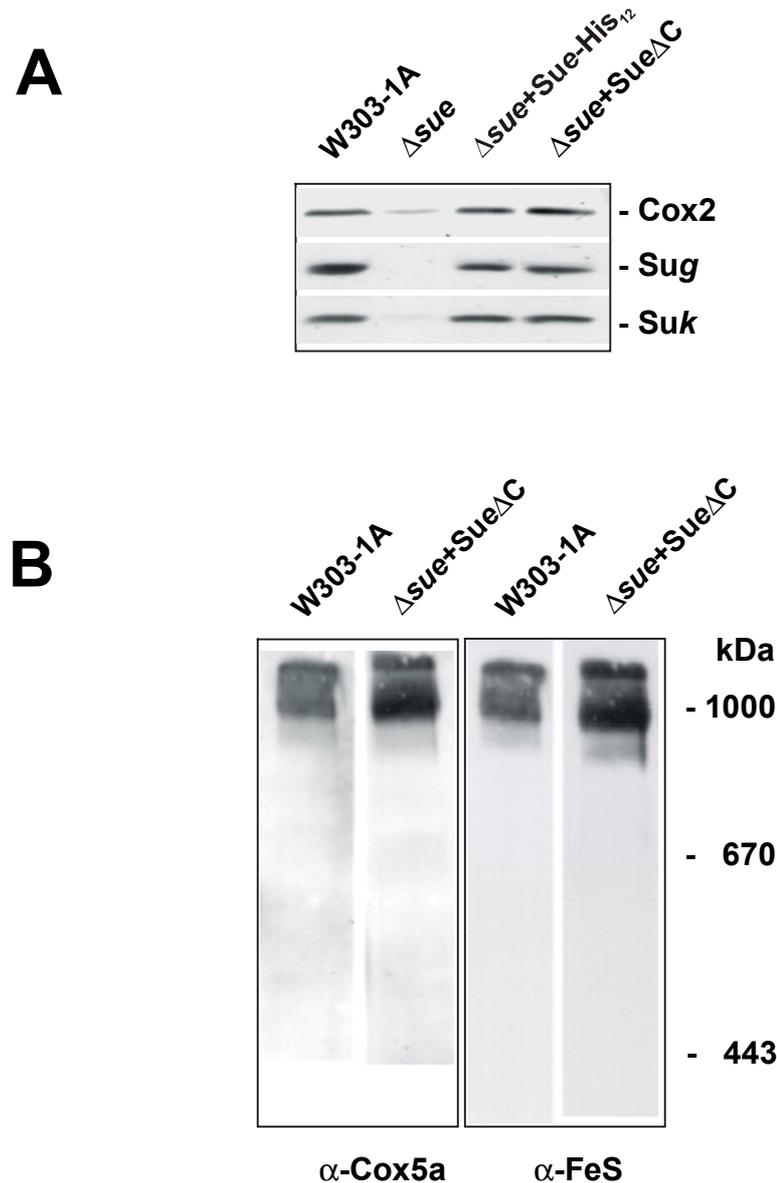
### 3.3.6 In Stämmen mit C-terminal modifizierter Sue liegt der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplex vollständig assembliert vor

Die Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase liegt in Abwesenheit der Untereinheit e der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase in signifikant reduzierten Konzentrationen vor, wie bereits dargestellt. Zudem wurde beobachtet, dass in Abwesenheit der Untereinheit e der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplex nicht vollständig assembliert.

Um zu untersuchen, ob die Reduktion von Cox2 direkt auf den Verlust von Sue zurückgeführt werden kann, wurden Hefestämme mit C-terminal modifizierten Derivaten von Sue auf die Anwesenheit von Cox2 überprüft. Dazu wurden isolierte Mitochondrien der Stämme W303-1A (Wildtyp),  $\Delta$ sue,  $\Delta$ sue+Sue-His<sub>12</sub> und  $\Delta$ sue+Sue $\Delta$ C durch Western-Blot-Analyse mit den Antisera gegen die Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase sowie als Kontrolle gegen die Untereinheiten g und k der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase analysiert.

In den Stämmen  $\Delta$ sue+Sue-His<sub>12</sub> und  $\Delta$ sue+Sue $\Delta$ C entspricht die Menge an Cox2 der des isogenen Wildtyp-Stammes (Abb.20A). Durch Einführung C-terminal modifizierter Derivate von Sue in die Nullmutante kann also bezüglich der Anwesenheit von Cox2 der Phänotyp von  $\Delta$ sue rekonstituiert werden. Die Assemblierung des Suprakomplexes in Anwesenheit eines Derivates von Sue wurde im Stamm  $\Delta$ sue+Sue $\Delta$ C im Vergleich zum isogenen Wildtyp W303-1A untersucht. Die Analyse der Proteinkomplexe mittels blauer Nativgelelektrophorese erfolgte wie in Abb.20B beschrieben. Während in der Sue-Disruptante der Suprakomplex wie bereits beschrieben nicht korrekt assembliert vorliegt, entspricht seine Assemblierung in Mitochondrien des Typs  $\Delta$ sue+Sue- $\Delta$ C der des Wildtyps (Abb.20B). Die C-terminal modifizierte Sue kann demnach nicht nur die Dimerisierung der ATP Synthase bewirken, sondern auch eine normale Expression von Cox2 und die Assemblierung des Suprakomplexes.

Es scheint, als ob es einen direkten Zusammenhang zwischen der Dimerisierung der ATP Synthase und der Assemblierung des Suprakomplexes gibt.



**Abb.20:** Der Defekt der *Sue* Disruptante in der Assemblierung des Suprakomplexes kann durch die Expression von C-terminal verkürzter *Sue* komplementiert werden.

(A) Mitochondrien (50 µg Protein) der Hefestämme W303-1A,  $\Delta$ *sue*,  $\Delta$ *sue*+*Sue*-His<sub>12</sub> sowie *sue*+*Sue*ΔC wurden mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit der Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase beziehungsweise der Untereinheiten g und k der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase untersucht.

(B) In isolierten Mitochondrien (200 µg pro Gelspur) der Stämme W303-1A und *sue*+*Sue*ΔC wurde die Assemblierung des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplexes mittels blauer Nativgelelektrophorese untersucht. Nach Übertragung der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurde mit einem Antiserum, das spezifisch Cox5a erkennt beziehungsweise mit einem Antiserum spezifisch für das Rieske FeS-Proteins des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes immundekoriert. Als Markerproteine dienten Rinderthyreoglobulin (670 kDa) und Pferd milzapoferritin (443 kDa) (B).

### 3.3.7 Die Umgebung von Sue der ATP Synthase ändert sich, sobald der Cytochrom *c*-Oxidase- oder der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex nicht korrekt assembliert ist

Die Reduzierung des Cox2-Spiegels sowie die Beeinträchtigung der Assemblierung des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplexes in Abwesenheit von Sue weisen auf eine direkte Interaktion der Untereinheit e der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase mit Untereinheiten der Cytochrom *c*-Oxidase hin. Zur Überprüfung einer möglichen Interaktion sollte die molekulare Umgebung von Sue in Hefestämmen untersucht werden, in denen entweder die Cytochrom *c*-Oxidase oder der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex unvollständig assembliert vorliegen. Dazu wurden Quervernetzungsexperimente mit den chemischen Quervernetzern DTNB und MBS durchgeführt.

Zunächst wurde die Umgebung der Untereinheit e im Stamm  $\Delta imp1$ , in dem kein reifes Cox2 existiert und die Cytochrom *c*-Oxidase nicht assembliert, mit ihrer Umgebung im Wildtyp-Stamm W303-1A verglichen. Nach chemischer Quervernetzung mit dem homo-bifunktionellen, Sulfhydryl-spezifischen Quervernetzungsreagenz DTNB wurden die mitochondrialen Proteine mittels SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse isoliert. Sue und seine Quervernetzungsprodukte wurden durch Immundekoration der resultierenden Nitrozellulosemembran mit einem Sue spezifisch erkennenden Antiserum nachgewiesen (Abb.21A). Nach chemischer Quervernetzung in isolierten Wildtyp-Mitochondrien treten besonders signifikante Quervernetzungsprodukte mit einer Molekularmasse von etwa 17, 19, und 42 kDa auf. Diese Quervernetzungsprodukte sind in Mitochondrien des Stammes  $\Delta imp1$  nicht nachweisbar. Allerdings tritt dort ein neues Quervernetzungsprodukt mit einer Molekularmasse von etwa 20 kDa auf.

Weiterhin wurde das Ergebnis der Quervernetzung durch DTNB in Mitochondrien anderer Hefestämme untersucht, die entweder keine assemblierte Cytochrom *c*-Oxidase und nur geringe Mengen an Cox2 ( $\Delta cox20$ ,  $\Delta imp$ ,  $\Delta cox4$ ) oder keinen assemblierten Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex ( $\Delta core1$ ) besaßen. Verglichen wurden die Ergebnisse mit Quervernetzungsprodukten in isolierten Mitochondrien des Wildtyp-Stammes W303-1A und des Hefestammes  $\Delta cox12$ , in dem Cox2 normal exprimiert wird und die Cytochrom *c*-Oxidase assembliert vorliegt. In allen Stämmen, in denen die Menge an Cox2p reduziert ist und die Cytochrom *c*-Oxidase nicht korrekt assembliert ( $\Delta cox20$ ,  $\Delta imp$ ,  $\Delta cox4$ ), konnte ein großer Teil der Quervernetzungsprodukte nicht nachgewiesen werden. Insbesondere fehlten die Quervernetzungsprodukte der

Größe von 17, 19 und 42 kDa. Ähnliches konnte nach Quervernetzung im Stamm  $\Delta core1$ , in welchem der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex nicht assembliert, beobachtet werden. In Mitochondrien des Stammes  $\Delta cox12$ , einer Disruptante in der zwar eine Untereinheit der Cytochrom  $c$ -Oxidase fehlt, ihre Assemblierung von dieser Disruption aber nicht betroffen ist, entsprach das Muster der Quervernetzungsprodukte dem des Wildtyps (Abb.21B). Eine Änderung der Umgebung von Sue (Änderung des Musters der Quervernetzungsprodukte) in Stämmen mit Cytochrom  $c$ -Oxidase-Assemblierungsdefizienz beziehungsweise nicht assembliertem Cytochrom  $bc_1$ -Komplex ergab sich auch nach einer chemischen Quervernetzung durch MBS (Abb.21C). Signifikante Quervernetzungsprodukte der Molekularmasse von etwa 19, 23, 30 und 42 kDa traten nur nach Quervernetzung in Mitochondrien des Wildtyps und des Stammes  $\Delta cox12$  auf. In den anderen Stämmen waren die Quervernetzungsprodukte bei 19 und 30 kDa schwächer ausgeprägt. Die Quervernetzungsprodukte bei 23 und 42 kDa waren nicht mehr nachweisbar.

Die Umgebung von Sue ändert sich also immer dann, wenn die Cytochrom  $c$ -Oxidase nicht assembliert beziehungsweise Cox2 nur in sehr geringen Mengen vorhanden ist. Das Quervernetzungsprodukt der Größe von 42 kDa könnte aus einer Koppelung von Sue an Cox2 resultiert sein. Dafür spricht sowohl seine Molekularmasse, als auch die Tatsache, dass es in Stämmen mit stark reduzierter Menge an Cox2 nicht mehr nachgewiesen werden kann. Auch wenn der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex nicht assembliert vorliegt, ist die Umgebung von Sue betroffen. Zwischen der Assemblierung der Komponenten des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes und der Interaktion von Sue mit möglichen Interaktionspartnern scheint also ein Zusammenhang zu bestehen.

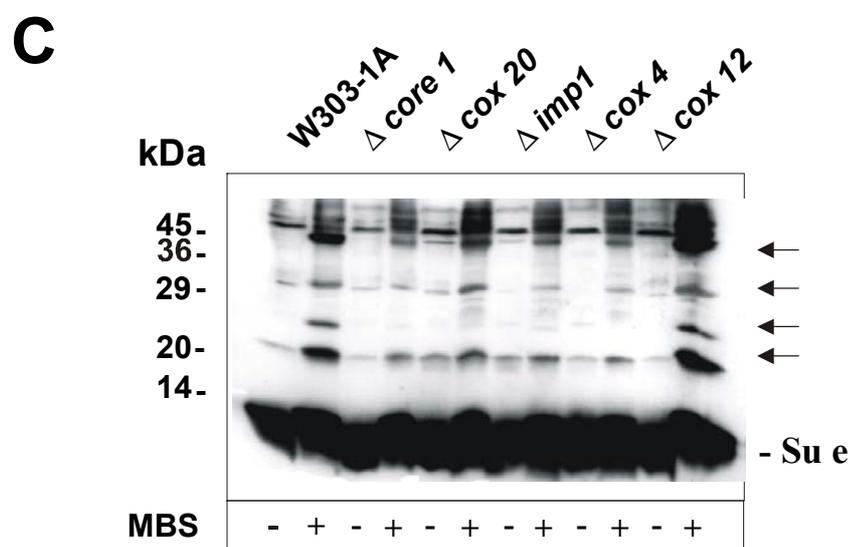
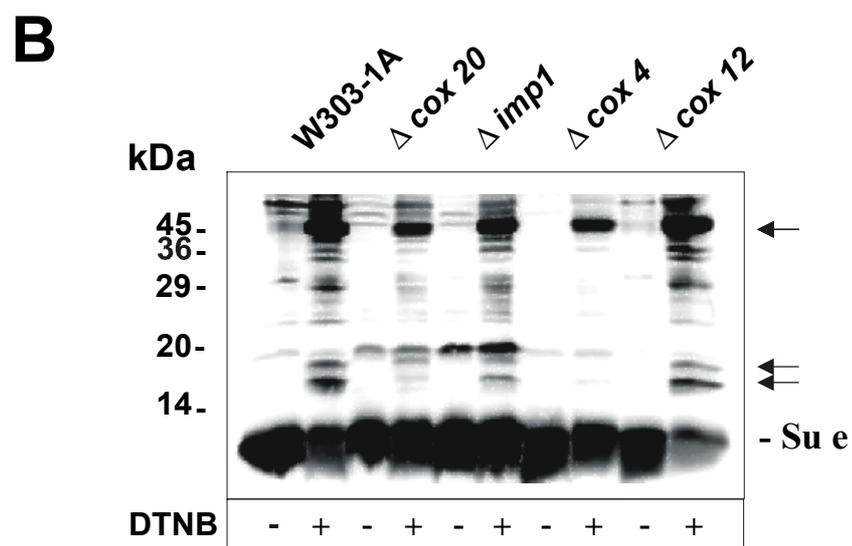
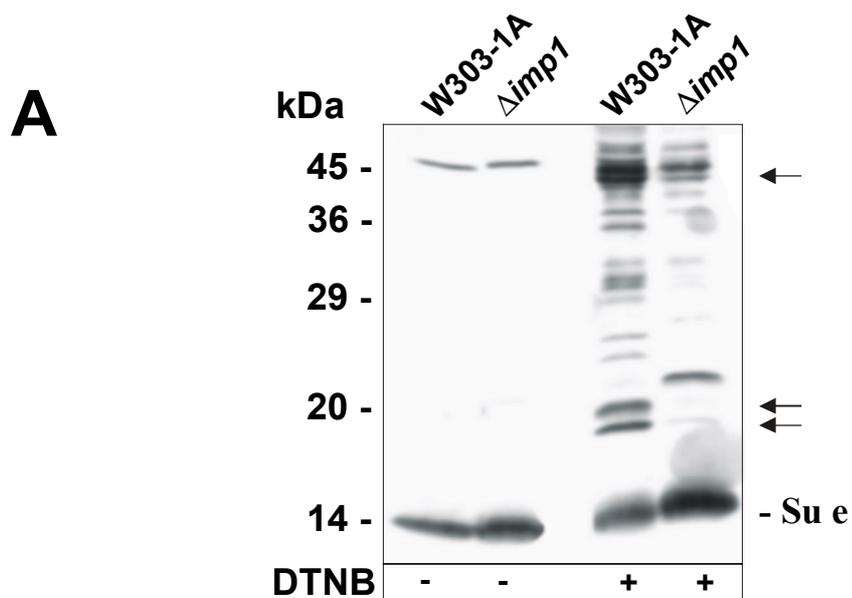


Abb.21

**Abb.21: In Mitochondrien, in denen die Cytochrom *c*-Oxidase beziehungsweise der Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex nicht korrekt assembliert sind, ändert sich die Umgebung der Untereinheit *e* der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase**

(A) Isolierte Mitochondrien (150 µg Protein) der Hefestämme W303-1A und  $\Delta imp1$  wurden wie in Material und Methoden beschrieben mit dem chemischen Quervernetzer DTNB inkubiert. Vergleichsproben wurden nur mit DMSO, ohne Quervernetzungsreagenz, behandelt. Anschließend wurde eine SDS-PAGE (Gelsystem: 16 % Acrylamid, 0,6 % Bisacrylamid) durchgeführt. Die Proben wurden in Auftragspuffer ohne  $\beta$ -Mercaptoethanol aufgenommen, da DTNB in reduzierender Umgebung gespalten wird. Die Produkte der Quervernetzung mit *Sue* wurde mittels Western-Blot-Analyse und Dekoration der Nitrozellulosemembran mit einem Antikörper, der spezifisch den C-Terminus von *Sue* erkennt, analysiert.

(B und C) Isolierte Mitochondrien (150 µg Protein) der Hefestämme W303-1A,  $\Delta core1$ ,  $\Delta cox20$ ,  $\Delta imp$ ,  $\Delta cox4$  und  $\Delta cox12$  wurden mit dem chemischen Quervernetzer DTNB (B) beziehungsweise MBS (C) inkubiert. Ihre weitere Behandlung erfolgte wie in Abbildung 21A. Da MBS nicht spaltbar ist, wurden die Proben nach der Behandlung mit MBS in einem Auftragspuffer aufgenommen, der  $\beta$ -Mercaptoethanol enthielt.

Die Pfeile heben die Quervernetzungsprodukte hervor, die von einer unkorrekten Assemblierung des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplexes betroffen sind.

### 3.3.8 *Sue* befindet sich in enger Nachbarschaft von Cox2

Um zu prüfen, ob das Quervernetzungsprodukt mit *Sue* von etwa 42 kDa, das sowohl nach der Quervernetzung mit DTNB, als auch mit MBS auftrat, aus einer Verknüpfung der Untereinheit *e* der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase (mit einer Molekularmasse von 10 kDa) mit der Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase resultiert (mit einer Molekularmasse von 32 kDa), wurden weitere Experimente durchgeführt. Dabei sollte zunächst untersucht werden, ob ein Quervernetzungsprodukt dieser Größe sowohl von einem Antiserum gegen *Sue* als auch von einem Antiserum gegen Cox2 erkannt wird.

Dazu wurden Wildtyp-Mitochondrien mit MBS inkubiert. Die *Sue*- beziehungsweise Cox2- spezifischen Quervernetzungsaddukte wanderten in einem SDS-Polyacrylamidgel auf der gleichen Höhe, wie man nach Western-Blot-Analyse und darauffolgender Immundekoration mit den entsprechenden spezifischen Antiseren erkennen kann (Abb.22A).

Um zu zeigen, dass das *Sue*-spezifische Quervernetzungsaddukt bei 42 kDa tatsächlich aus einer chemischen Verknüpfung von *Sue* mit Cox2 resultiert, wurde das Quervernetzungsexperiment wiederholt, wobei dieses Mal Mitochondrien des Stammes  $\Delta sue^+Sue-His_{12}$  benutzt wurden, die das Derivat von

Sue mit C-terminalem Histidin-Anhang exprimierten. Nach der chemischen Quervernetzung wurden die Mitochondrien unter denaturierenden Bedingungen (1% SDS) lysiert. Die Quervernetzungsprodukte wurden mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und gebundenes Material durch SDS-PAGE und Western-Blot-Analyse untersucht. Durch darauffolgende Immundekoration mit spezifischen Antisera konnte gezeigt werden, dass das Quervernetzungsprodukt von 42 kDa sowohl Sue als auch Cox2 enthielt. In Abwesenheit von MBS beziehungsweise aus Wildtyp-Mitochondrien ließ sich mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie das Produkt nicht gewinnen. Dessen Isolierung war somit von der Anwesenheit des His<sub>12</sub>-Restes von Sue abhängig (Abb.22B). Mittels der Ni-NTA-Suspension konnte also spezifisch ein Quervernetzungsprodukt der Untereinheit e der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase mit der Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase isoliert werden. Das gleiche Ergebnis lieferte die Quervernetzung mit DTNB. Die Isolierung eines Adduktes von Sue an Cox2 nach chemischer Quervernetzung legt den Schluss nahe, dass die Untereinheit e der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase sehr nahe der Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase in der inneren Membran der Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* lokalisiert ist.

---

**Abb.22: Die Untereinheit e der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase und die Untereinheit 2 der Cytochrom *c*-Oxidase sind nahe benachbart in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert**

(A) In einem Parallelansatz wurden jeweils 150 µg Mitochondrien des Typs W303-1A mit dem Quervernetzer MBS inkubiert und eine SDS-PAGE (Gelsystem: 13 % Acrylamid, 0,6 % Bisacrylamid) durchgeführt. Zur Kontrolle wurde ein Experiment ohne Zugabe des Quervernetzers durchgeführt. Das Auftreten eines Quervernetzungsproduktes mit Sue beziehungsweise Cox2 der Größe von 42 kDa wurde durch Western-Blot-Analyse, Teilung der Nitrozellulose-Membran und nachfolgende Immundekoration mit Antisera, die Cox2p beziehungsweise Sue spezifisch erkennen, belegt.

(B) Gleiche Mengen Mitochondrien der Hefestämme W303-1A (Wildtyp) beziehungsweise  $\Delta$ sue+Sue-His<sub>12</sub> wurden mit dem Quervernetzer MBS behandelt und mit 1% SDS unter denaturierenden Bedingungen lysiert. Das Detergenzextrakt wurde durch einen Zentrifugationsschritt behandelt und mit einer Ni-NTA-Suspension (QIAGEN) inkubiert. Die Eluate wurden einer SDS-PAGE (Gelsystem 13 % Acrylamid, 0,6 % Bisacrylamid) unterzogen, die Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen und eine Immundekoration mit Cox2- beziehungsweise Sue-spezifischen Antikörpern durchgeführt.

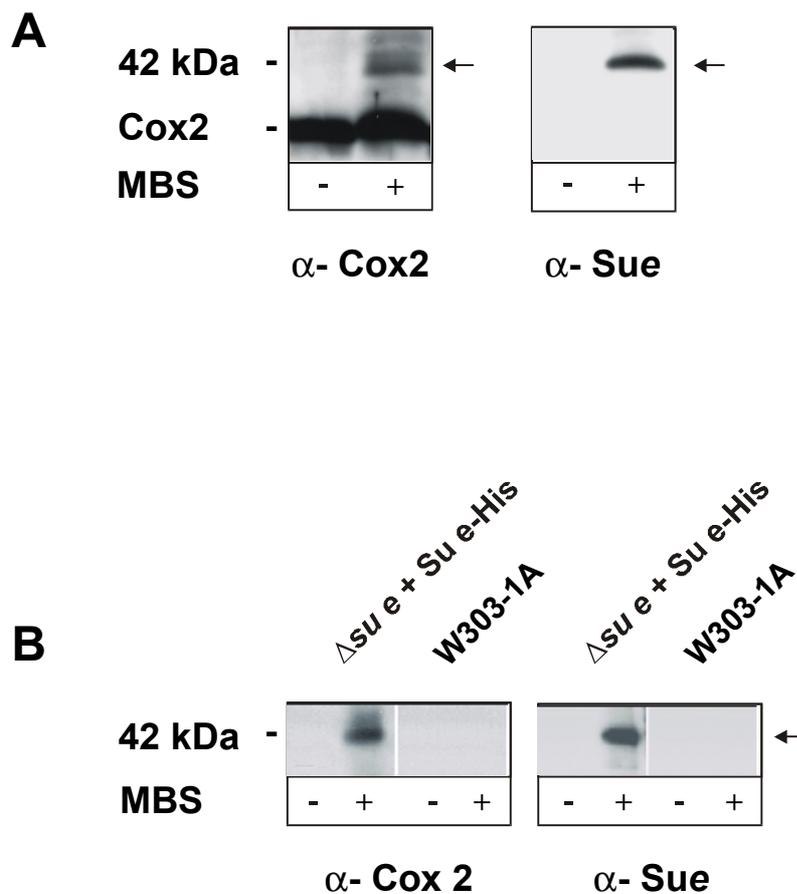
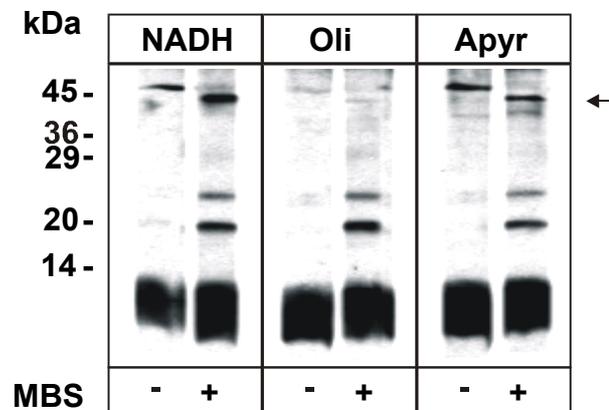


Abb.22

### 3.3.9 Hemmung der Aktivität der ATP Synthase führt zu einer Aufhebung der Vernetzbarkeit von Sue mit Cox2

Es sollte untersucht werden, ob durch die enzymatische Aktivität der ATP Synthase die Umgebung von Sue und damit ihr Zusammenspiel mit möglichen Reaktionspartnern beeinflusst wird. Durch Oligomycin kann sowohl die ATP Synthase-Aktivität (Synthetisierung von ATP unter Ausnutzung des über die innere Mitochondrienmembran aufgebauten Protonengradienten) als auch die ATPase-Aktivität (Aufbau eines Protonengradienten bei niedrigem Membranpotential unter Hydrolyse von ATP) gehemmt werden. Inkubation von Wildtyp-Mitochondrien mit Oligomycin führte in der Tat zu einem veränderten Quervernetzungsmuster (Abb.23). Es verschwand das Quervernetzungsprodukt bei 42 kDa, das wie oben gezeigt aus einer Interaktion oder engen räumlichen Nachbarschaft von Sue und Cox2 herrührt. Da eine veränder-

te Interaktion der Proteine auch indirekt eine Folge einer Senkung des ATP-Spiegels innerhalb der Mitochondrien aufgrund der gehemmten ATP Synthese-Aktivität sein könnte, wurde in ein Vergleichsansatz durchgeführt. Hierbei wurde eine äquivalente Menge intakter Mitochondrien vor der Quervernetzung mit MBS einer Behandlung mit dem Enzym Apyrase unterzogen. Dieses Enzym hydrolysiert ATP und führt zu einer drastischen Senkung des ATP-Spiegels in den Mitochondrien. Dabei blieb das Quervernetzungsprodukt bei 42 kDa erhalten. Die Funktion der  $F_1F_0$ -ATP Synthase hat demnach möglicherweise einen Einfluß auf die Interaktion von *Sue* und *Cox2*.



**Abb.23: Die Interaktion von *Sue* mit *Cox2* wird durch Hemmung der Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase beeinträchtigt.**

Isolierte Mitochondrien (150 µg Protein) des Hefestammes W303-1A wurden nach Vorinkubation mit Oligomycin beziehungsweise Apyrase für 2 min bei 25°C mit dem chemischen Quervernetzer MBS behandelt (30 min bei 0°C). Nach Abbruch der Reaktion wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. *Sue* wurde mittels Western-Blot-Analyse und Dekoration der Nitrozellulosemembran mit einem Antikörper, der spezifisch den C-Terminus von *Sue* erkennt, dargestellt; das Quervernetzungsprodukt bei 42 kDa ist durch einen Pfeil hervorgehoben; Oli=Oligomycin; Apyr=Apyrase.

## 4. Diskussion

### 4.1 Die Funktion von *Sue* in der mitochondrialen $F_1F_0$ -ATP Synthase

Die  $F_1F_0$ -ATP Synthase der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* liegt in Form eines dimeren Komplexes in der inneren mitochondrialen Membran vor (Arnold *et al.*, 1998; Spannagel *et al.*, 1998). Nachdem *Sue* als eine Untereinheit des  $F_0$ -Sektors des Enzyms identifiziert worden war (Arnold *et al.*, 1997), konnte gezeigt werden, dass das Enzym in Abwesenheit dieser Untereinheit nicht in der Lage ist, ein stabiles Dimer zu bilden (Arnold *et al.*, 1998).

Neben *Sue* gelten auch die Untereinheiten *Sug* und *Suk* der  $F_1F_0$ -ATP Synthase als dimerspezifisch. Sie konnten nur im Monomeren, nicht aber im Dimeren des Enzyms nachgewiesen werden (Arnold *et al.*, 1998). Während in der *Sug* Disruptante nur eine sehr geringe Menge an dimerer ATP Synthase existiert (diese Arbeit), wirkt sich eine Disruption von *Suk* nicht nachweisbar auf den Assemblierungszustand des Enzyms aus (Arnold *et al.*, 1998). Es ließ sich allerdings eine Auswirkung der Disruption von *Sue* auf die Anwesenheit von *Suk* beobachten: Im Hefestamm  $\Delta sue$  ist die Expression von *Suk* signifikant reduziert. *Sug* ist in Stamm  $\Delta sue$  nicht mehr nachweisbar. Die Untereinheiten *Sug* und *Suk* können durch die Expression von C-terminal modifizierten Mutanten von *Sue* rekonstituiert werden (Arnold *et al.*, 1998; diese Arbeit). In Zellen mit *Sue*, die durch C-terminale Verkürzung oder durch Anfügen eines Histidin-Anhangs modifiziert waren, fanden sich die Untereinheiten von *Sug* und *Suk* in gleichen Mengen wie im Wildtyp.

#### 4.1.1 *Sue* ist in der Lage, Homodimere zu bilden

Die Existenz einer dimeren  $F_1F_0$ -ATP Synthase wurde nicht nur in Mitochondrien des Organismus *Saccharomyces cerevisiae*, sondern auch in Mitochondrien aus Rinderherzen beobachtet (Schägger und Pfeiffer, 2000). In einer früheren Arbeit wurden zudem Hinweise auf eine Dimerisierung der Untereinheit *e* der  $F_1F_0$ -ATP Synthase von Rinderherzmitochondrien beschrieben. Die Autoren wiesen ein Quervernetzungsprodukt mit *Sue* nach, dessen Molekularmasse demjenigen eines *Sue*-Dimeren entsprach (Belogradov *et al.*, 1996). Dieses Versuchsergebnis reicht für den Beweis des Vorhandenseins eines Homodimeren von *Sue* allerdings nicht aus.

Ist die Untereinheit *e* aus Hefe in der Lage, Homodimere zu bilden? Das Potential von *Sue* als einziger Untereinheit des  $F_0$ -Sektors, eine so ge-

nannte coiled-coil- Struktur zu bilden (Arnold *et al.*, 1997), deutet auf die Fähigkeit zur Ausbildung eines Homodimeren und weiterhin auf eine Beteiligung des Proteins bei der Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase hin.

Dieses Potential zu dimerisieren ist im C-terminalen, hydrophilen Bereich des Proteins lokalisiert, der in den Intermembranraum ragt. Es liegt innerhalb der Region des Proteins, die eine starke Sequenzähnlichkeit zu den Untereinheiten e verschiedener Säugerorganismen aufweist (Arnold *et al.*, 1997).

In der vorliegenden Arbeit wurde der Beweis erbracht, dass *Sue* *in vivo* homodimere Strukturen ausbildet. Mittels chemischer Quervernetzung in intakten Mitochondrien durch das im reduzierenden Milieu instabile Cystein-spezifische Reagenz DTNB konnte ein Quervernetzungsprodukt mit *Sue* isoliert werden, dessen Molekularmasse demjenigen eines *Sue*-Homodimeren entsprach. In einem anschließenden Experiment wurde die Quervernetzung in dem heterogenen Stamm *sue*+*Sue*-His<sub>12</sub> durchgeführt. Dieser Stamm exprimiert sowohl die Wildtyp-Form von *Sue* als auch eine Variante des Proteins mit einem N-terminalen Anhang von 12 Histidinresten. Das Quervernetzungsprodukt wurde mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und in reduzierendem Milieu gespalten. Im Eluat der Ni-NTA-Fraktion konnte sowohl *Sue*-His<sub>12</sub>, als auch *Sue* nachgewiesen werden. Ein mit dem Wildtypstamm durchgeführter Kontrollversuch bestätigte die Spezifität der Isolierung. Da man außerdem berücksichtigen muss, dass *Sue* nur einen einzigen Cysteinrest besitzt, kann man anhand der beschriebenen Ergebnisse auf eine enge räumliche Beziehung zwischen *Sue* und *Sue*-His<sub>12</sub> schließen. Wie es ihr Potential coiled-coil-Strukturen auszubilden nahelegt, ist die Untereinheit e der  $F_1F_0$ -ATP Synthase also tatsächlich in der Lage, zu dimerisieren.

#### 4.1.2 *Sue* spielt eine zentrale Rolle bei der Dimerisierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase

Nachdem *Sue* dimere Strukturen ausbilden kann, und in *Sue*-Disruptanten eine dimere  $F_1F_0$ -ATP Synthase nicht nachweisbar ist, kommt diese Untereinheit als ein wichtiger Dimerisierungsfaktor der  $F_1F_0$ -ATP Synthase in Frage. Mittels einer Dimerisierung der in den  $F_0$ -Sektor integrierten Untereinheit *e* könnte die Assemblierung der ATP Synthase zu einem dimeren Enzymkomplex erfolgen.

Wie bereits erwähnt, liegt jedoch auch in der *Sug*-Disruptante die ATP Synthase vorwiegend in monomerer Form vor. Könnte demnach auch *Sug* als Dimerisierungsfaktor der  $F_1F_0$ -ATP Synthase von Bedeutung sein?

Für eine zentrale Rolle von *Sue* bei der Dimerisierung des  $F_0$ -Sektors der ATP Synthase sprechen folgende Beobachtungen: in Hefestämmen, in denen *Sug* fehlt, ist *Sue*, wenn auch in geringer Konzentration, nachweisbar; entsprechend konnte in der vorliegenden Arbeit auch in *Sug*-Disruptanten mittels blauer Nativgelelektrophorese eine geringe Menge an dimerer  $F_1F_0$ -ATP Synthase nachgewiesen werden. In *Sue*-Disruptanten andererseits ist keinerlei *Sug* nachweisbar – *Sue* scheint also essentiell für die stabile Expression von *Sug* zu sein. Zudem besitzt die Sequenz von *Sug* keinerlei Potential, eine sogenannte „coiled-coil Struktur“ auszubilden. Es ist somit wahrscheinlich, dass die Instabilität der ATP Synthase in *Sug*-Nullmutanten indirekt eine Folge der Herunterregulation von *Sue* und nicht der Abwesenheit von *Sug* ist. Eventuell übt *Sug* für *Sue* eine unterstützende Funktion aus.

#### 4.1.3 Erfolgt die Dimerisierung der ATP Synthase in dynamischer Weise oder liegt ein stabiles Dimeres vor?

Ist die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase ein dynamisch erfolgender Prozess? Gegen diese Annahme sprechen Ergebnisse früherer Arbeiten sowie der vorliegenden:

*Sue* konnte bisher ausschließlich in der dimeren Form des Enzyms nachgewiesen werden (Arnold *et al.*, 1998). Wäre es dynamisch an die  $F_1F_0$ -ATP Synthase assoziiert, um deren Dimerisierung zu bewirken, müsste es im Falle einer monomeren ATP Synthase ausserhalb des Enzyms nachweisbar sein. Dafür gibt es jedoch keinen Beleg. Die Existenz von *Sue* ausschließlich in der

dimeren Form der ATP Synthase spricht für das Vorhandensein eines *in vivo* vorliegenden stabilen dimeren Enzymkomplexes.

Das Verhältnis von ATP Synthase-Monomer zu ATP Synthase-Dimer nach Lyse mit Digitonin wurde weder durch Behinderung der enzymatischen Aktivität durch Oligomycin, noch durch Zerstörung des Membranpotentials noch durch Änderung der Verhältnisses von ATP:ADP:AMP beeinflusst (Arnold 1998). Der Verlust der zusätzlich vorhandenen C-terminalen Region von Sue, die eine signifikante Sequenzähnlichkeit zu Adenosin-Desaminasen aufweist (Arnold, 1998), hat ebenfalls keine Änderung des Verhältnisses von ATPase-Monomer zu ATPase-Dimer zur Folge, wie in der vorliegenden Arbeit anhand von Untersuchungen des Stammes Sue $\Delta$ C mittels blauer Nativgelelektrophorese gezeigt wurde. In diesem Stamm wurden am C-terminalen Ende von Sue 36 Aminosäuren deletiert, die außerhalb des zu Säugerorganismen homologen Bereiches liegen.

Auch die Umgebung von Sue verändert sich weder nach Zerstörung des Membranpotentials noch nach seiner Erhöhung. Dies bestätigten Quervernetzungsexperimente mit den chemischen Quervernetzern DSG, EDC und MBS in intakten Mitochondrien. Sie wurden parallel unter Zugabe von NADH unter Erhöhung des Membranpotentials beziehungsweise von Valinomycin, das das Membranpotential in irreversibler Weise aufhebt, durchgeführt. Die Umgebung von Sue wird demnach auch von einer resultierenden Veränderung der enzymatischen Aktivität der ATP Synthase nicht beeinflusst.

Allerdings konnte nach einer Lyse unter nativen Bedingungen (mit 1% Digitonin) mittels blauer Nativgelelektrophorese neben einer dimeren Form der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase auch eine monomere Form des Enzyms isoliert werden (Arnold *et al.*, 1998; diese Arbeit). Entspricht diese einem auch *in vivo* vorliegenden Monomer? Dagegen spricht zum einen, dass unter ähnlichen Lysebedingungen mittels Gelfiltration nur das Dimere der ATP Synthase isoliert werden konnte, während bei der blauen Nativgelelektrophorese desselben Ly-sates auch der monomere Komplex auftrat (Arnold *et al.*, 1998). Neben der Beeinflussung der Stabilität des dimeren Komplexes durch den Lysevorgang könnte die Bildung eines artifiziellen Monomeren auch aufgrund einer Destabilisierung der dimeren Form durch Auswirkungen des elektrischen Feldes oder des Farbreagens der blauen Nativgelelektrophorese begünstigt werden. Zum anderen führte eine Erhöhung der Konzentration des Detergenz Triton-X100 während des Lysevorgangs zu einer Erhöhung der Menge an monomere ATP Synthase gegenüber der dimeren Form, wie eine anschließende Analyse mittels blauer Nativgelelektrophorese ergab (Arnold *et al.*, 1998). Diese

Ergebnisse lassen darauf schließen, dass das ATP Synthase-Monomere im Verlauf des Experiments artifiziell entsteht.

Es ist somit fraglich, ob *in vivo* überhaupt eine monomere Form der ATP Synthase existiert.

#### 4.1.4 Ist ein ATP Synthase-Dimeres eine Voraussetzung für die Bindung des ATPase-Inhibitor-Proteins $\text{INH}_1$ ?

Die enzymatische Aktivität der mitochondrialen  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase des Organismus *Saccharomyces cerevisiae* ist nicht von ihrer Dimerisierung abhängig. So konnte gezeigt werden, dass die ATP-Hydrolyse-Aktivität des monomeren Enzyms in den Mutanten  $\Delta\text{sue}$  beziehungsweise  $\Delta\text{sug}$  derjenigen des Wildtyps, der den dimeren Komplex enthält, entspricht (Arnold *et al.*, 1998). Was also könnte der Grund für die Existenz eines stabilen Dimeren der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase sein?

Die Existenz eines Dimeren des  $\text{F}_1$ -Sektors der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase wird derzeit im Zusammenhang mit der Hemmung der ATPase-Funktion der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase durch das ATPase-Inhibitor-Protein  $\text{IF}_1$  (Walker 1994) diskutiert:

Das dem Hefeprotein  $\text{INH}_1$  homologe Protein aus Rinderherzmitochondrien  $\text{IF}_1$  (Galante *et al.*, 1981; Van Heeke *et al.*, 1993), bindet an den  $\text{F}_1$ -Sektor der ATP Synthase in einem stöchiometrischen Verhältnis von 1:1 (Klein *et al.*, 1980) und hemmt dadurch die ATPase-Aktivität des Enzyms, also seine Fähigkeit, ATP zu hydrolysieren. Die ATPase-Aktivität des Enzyms wird benötigt, um innerhalb der inneren mitochondrialen Membran einen pH-Gradienten aufzubauen. Dies wird dadurch erreicht, dass Protonen aus der Mitochondrienmatrix in den Intermembranraum gepumpt werden. Der pH-Gradient über die innere Mitochondrienmembran nimmt beispielsweise dadurch ab, dass die Zellen unter Sauerstoffmangel leiden und deshalb der Elektronentransport und der daran gekoppelte Aufbau des pH-Gradienten durch die Enzyme der Atmungskette behindert wird. Dadurch wird wiederum die oxidative Phosphorylierung beeinträchtigt, es wird ATP nur noch über den Weg der Glykolyse bereitgestellt. Unter diesen Bedingungen fungiert die ATP Synthase als ATPase. Es wird also noch zusätzlich ATP abgebaut. Durch Bindung von  $\text{IF}_1$  an die ATP Synthase wird ihre ATPase-Funktion gehemmt. So bleibt ein Grundspiegel an ATP in der Mitochondrienmatrix erhalten.

Kürzlich wurde ein Modell vorgestellt, demzufolge eine dimere Form von  $IF_1$  an zwei benachbarte  $F_1$ -Domänen der  $F_1F_0$ -ATP Synthase bindet und auf diese Weise die ATPase-Aktivität des Enzyms hemmt (Cabezón *et al.*, 2000b). Die Bildung der aktiven, dimeren Form von  $IF_1$  ist abhängig von Mg-ATP und vom pH-Wert (Pedersen *et al.*, 1981; Penin *et al.*, 1988; Sah *et al.*, 1993). Im leicht saurem Milieu (pH<6.5) in der mitochondrialen Matrix liegt das Enzym unter Ausbildung von coiled-coil Strukturen der C-terminalen Region vorwiegend als Dimer vor (Cabezón *et al.*, 2000b; Gordon-Smith *et al.*, 2001). In dieser aktiven Form ist es in der Lage, mittels der einander gegenüber liegenden N-terminalen Regionen, gleichzeitig an die  $F_1$ -Domänen zweier benachbarter  $F_1F_0$ -ATP Synthasen zu binden und dadurch deren ATPase-Aktivität zu hemmen. Ein saures Milieu im Cytosol und darauf folgend in der Mitochondrienmatrix kann bei Sauerstoffmangel und damit einhergehender Erhöhung der Glykolyse entstehen (Rouslin *et al.*, 1983). Mit Abnahme der Protonenkonzentration auf einen Wert von pH=8.0 liegt  $IF_1$  in einer inaktiven Form als Tetramer vor. Hier sind die N-terminalen Regionen maskiert und somit nicht mehr in der Lage, an die  $F_1$ -Domäne der ATPase zu binden (Cabezón *et al.*, 2000a, b).

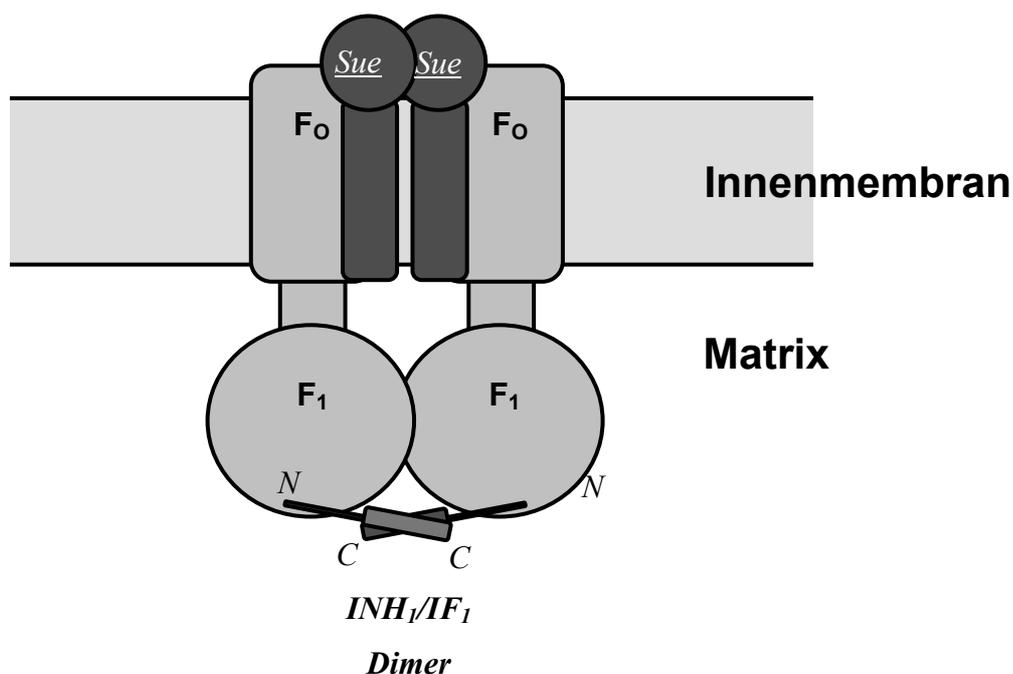
Es ist noch ungeklärt, ob das homologe Protein  $INH_1$  von *Saccharomyces cerevisiae* ebenfalls benachbarte  $F_1$ -Domänen der ATP Synthase bindet und so ihre ATPase-Aktivität hemmt. Allerdings ist dies wahrscheinlich, da sowohl in Hefemitochondrien, als auch in Rindermitochondrien die  $F_1F_0$ -ATP Synthase als dimerer Komplex nachgewiesen werden kann. In der Hefe wird die Bindung von  $INH_1$  an die ATPase zusätzlich durch zwei weitere Proteine, STF1 und STF2 („stabilizing factors 1 and 2“: Akashi *et al.*, 1988; Hashimoto *et al.*, 1981, 1987; Ichikawa *et al.*, 1990) unterstützt.

Durch die Existenz eines statisch vorhandenen Dimeren der ATP Synthase wäre gewährleistet, dass eine aktive Form von  $IF_1/INH_1$  zwei eng benachbarte  $F_1$ -Domänen vorfindet, an die sie bei Bedarf gleichzeitig binden und so die ATPase-Aktivität des Enzyms hemmen kann (Abb.24).

Dieser Hypothese eines ATP Synthase-Dimeren als Voraussetzung einer optimalen Funktion der aktiven Form von  $IF_1/INH_1$  als Inhibitor der ATPase-Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase widerspricht die Annahme von J.E. Walker (unveröffentlicht: Kommunikation mit R.A. Stuart). Anhand der Beobachtung, dass die  $F_1$ -Domäne der ATP Synthase unter Bindung von  $IF_1$  dimerisiert (Cabezón *et al.*, 2000b), postuliert er, dass die ATP Synthase normalerweise als Monomer vorliegt und erst mittels Bindung von  $IF_1$  unter den o-

ben beschriebenen Bedingungen eine Dimerisierung des Enzyms erfolgt. Demnach verlief die Dimerisierung der ATP Synthase in dynamischer Weise abhängig vom Milieu der Zelle. Bis jetzt konnten allerdings, wie im vorhergehenden Kapitel beschrieben (4.1.3) keinerlei Hinweise darauf gewonnen werden, dass ein Monomeres der  $F_1F_0$ -ATP Synthase *in vivo* existiert, beziehungsweise die Dimerisierung des Enzyms in dynamischer Weise erfolgt. Sie sprechen im Gegenteil für die Existenz einer innerhalb der inneren mitochondrialen Membran stabil als Dimer assoziierten ATP Synthase.

Der Hypothese von Walker widerspricht zudem, dass in  $INH_1/STF_1$  Doppeldisruptanten der Hefe die  $F_1F_0$ -ATP Synthase als dimerer Komplex vorliegt, wobei die Expression von *Sue* nicht beeinträchtigt ist (M.K. Dienhart, H. Schägger und R.A. Stuart, in Vorbereitung).



**Abb.24: Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase als Voraussetzung für eine Hemmung der ATPase-Funktion durch den Inhibitor  $INH_1/IF_1$  (Beschreibung im Text)**

Neuere Ergebnisse zeigten vor kurzem, dass auch in Abwesenheit von *Sue* und somit in Abwesenheit eines stabilen ATP Synthase-Dimeren  $\text{INH}_1/\text{IF}_1$  die ATPase-Funktion des Enzyms hemmt (M.K. Dienhart, H. Schägger und R.A. Stuart, in Vorbereitung). Dies könnte bedeuten, dass eine Inhibierung der ATPase-Funktion auch am monomeren Enzym möglich ist. Es wäre jedoch auch möglich, dass in der *Sue*-Disruptante *in vivo* eine dimere ATP Synthase vorliegt, aber aufgrund des Fehlens von *Sue* dieses Dimer sehr instabil und damit nicht nachweisbar ist. Dies könnte bedeuten, dass neben *Sue* ein weiterer Dimerisierungsfaktor der ATP Synthase existiert. Dieses Denkmodell ließe weiterhin den Schluß zu, dass die Bindung von  $\text{IF}_1/\text{INH}_1$  an zwei eng benachbart lokalisierte  $\text{F}_1$ -Domänen einer statisch vorhandenen dimeren Form der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase erfolgt.

#### 4.1.5 *Sue* steht in engem Kontakt zu *Suk*

Drei Untereinheiten des  $\text{F}_0$ -Sektors der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase, die Untereinheiten e, g und k gelten als dimerspezifisch. Das bedeutet, sie sind mittels zweidimensionaler nativer Gelelektrophorese im Monomer des Enzyms nicht mehr nachweisbar (Arnold *et al.*, 1998). Das Fehlen von *Suk* im Gegensatz zu demjenigen von *Sug* und *Sue* wirkt sich auf die Assemblierung der ATP Synthase nicht nachweislich aus. Allerdings konnte eine Beziehung zwischen *Sue* und *Suk* festgestellt werden:

In Hefestämmen, in denen *Sue* fehlt ( $\Delta\text{sue}$ ) beziehungsweise stark herunterreguliert ist ( $\Delta\text{sug}$ ) sinkt auch die Menge an *Suk* signifikant. Anhand der Lyse äquivalenter Mengen von *Sue*- und *Sug*-Disruptanten im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien und Analyse der mittels SDS-PAGE und Western-Blot isolierten Proteine mit einem *Suk* spezifisch erkennenden Antiserum konnte dies beobachtet werden,

Um eine mögliche physikalische Interaktion zwischen *Sue* und *Suk* untersuchen zu können, wurde ein Quervernetzungs experiment durchgeführt. Tatsächlich konnte nach Quervernetzung mit dem Reagenz DSG ein Quervernetzungsprodukt der Molekularmasse von 19 kDa gewonnen werden. Anhand der Isolierung dieses Produktes unter denaturierenden Bedingungen mit einem Antikörper, der spezifisch *Sue* erkennt und nachfolgender erfolgreicher Dekoration mit einem für *Suk* spezifischen Antikörper konnte gezeigt werden, dass mittels DSG eine chemische Quervernetzung von *Sue* und *Suk* erfolgt war. Dafür, dass es sich bei der Quervernetzung tatsächlich um eine Bindung

von *Sue* an *Suk* handelt, spricht weiterhin, dass das Quervernetzungsprodukt von 19 kDa in der *Suk*-Nullmutante nicht mehr vorhanden ist.

Im Stamm  $\Delta sue + Sue\Delta C$ , in dem die in der Hefe zusätzlich vorhandene C-terminale Region disruptiert worden war, sowie im Stamm  $\Delta sue + Sue-His_{12}$  entsprach die mittels Western-Blot-Analyse isolierter Mitochondrien ermittelte Expression von *Suk* derjenigen des Wildtypstammes. Das läßt den Schluß zu, dass der für *Sue* charakteristische C-terminale Bereich für eine Interaktion von *Sue* und *Suk* nicht essentiell ist.

Wozu könnte eine physikalische Interaktion von *Sue* und *Suk* dienen? *Suk* ist ein relativ kleines, 68 Aminosäurereste umfassendes Protein, das im Inter-membranraum lokalisiert und peripher an die innere Mitochondrienmembran assoziiert ist. Es ist nicht essentiell für die Dimerisierung oder die katalytische Funktion der  $F_1F_0$ -ATP Synthase (Arnold *et al.*, 1998).

Auch das Fehlen der beiden Untereinheiten e und k in einer Doppeldisruptante  $\Delta sue / \Delta suk$  hat keinerlei über den Phänotyp der einfachen Nullmutanten hinausgehende Auswirkung auf die Aktivität des Enzyms (Stuart, nicht veröffentlicht).

Ebenso konnte mittels Quervernetzungsexperimenten in isolierten Mitochondrien nach Erhöhung beziehungsweise Senkung des Membranpotentials nach Westernblot-Analyse der Quervernetzungsprodukte von *Sue* keinerlei quantitative Veränderung des wahrscheinlich aus der Bindung von *Sue* an *Suk* resultierenden Quervernetzungsproduktes bei 19 kDa beobachtet werden. Somit scheint eine Änderung des Energiezustandes der inneren Mitochondrienmembran ebenfalls keine Auswirkung auf eine potentielle Interaktion von *Sue* und *Suk* zu haben.

Obwohl eine physikalische Interaktion zwischen *Sue* und *Suk* festgestellt werden konnte, gelang es nicht, die physiologische Grundlage dieser Interaktion zu bestimmen. Die Untereinheit k ist nicht nachweisbar in die Dimerisierung oder katalytische Funktion der  $F_1F_0$ -ATP Synthase involviert. Ein Zusammenspiel von *Sue* und *Suk* wird anscheinend auch nicht durch Änderung des Membranpotentials beeinflusst. Für die Interaktion zwischen *Sue* und *Suk* ist der für *Sue* aus *Saccharomyces cerevisiae* charakteristische C-terminale Bereich nicht notwendig.

## 4.2. Gibt es ein der Untereinheit k homologes Protein?

Durch einen Vergleich der Aminosäuresequenz von *Suk* mit dem Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* durch das Programm rBlast N konnte auf dem Chromosom 15 eine DNS-Sequenz identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenz derjenigen von *Suk* sehr ähnlich ist. Ein Sequenzvergleich war ursprünglich durchgeführt worden, um Hinweise auf die Funktion von *Suk* zu erhalten. Die Aminosäuresequenz kann möglicherweise einem bisher unbekanntem Protein zugeordnet werden. Dieses hypothetische Protein  $Suk^{hom}$  umfasst 90 Aminosäurereste und seine N-terminale Region ist der Aminosäuresequenz von *Suk* zu 45% homolog. Die Hydrophathieprofile von *Suk* und  $Suk^{hom}$  sind in diesem Bereich sehr ähnlich.

Ist  $Suk^{hom}$  wie *Suk* eine Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATP Synthase? Experimente zur Untersuchung dieser Fragestellung gaben keinerlei Hinweis zur Unterstützung einer solchen Annahme.

Ein Test des Wachstumsphänotyps der Disruptante  $\Delta suk^{hom}$  und der Doppel-disruptante  $\Delta suk/\Delta suk^{hom}$  auf einer Agarplatte, die die nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle Glycerin enthielt, ergab ein Wachstum der Disruptanten, das demjenigen des Wildtyps entsprach.  $Suk^{hom}$  übt demnach weder allein, noch im Zusammenspiel mit *Suk* eine essentielle Funktion im Zusammenhang mit der oxidativen Phosphorylierung aus.

Die Analyse der Disruptanten mittels blauer Nativgelelektrophorese und Dekoration mit einem die Untereinheit  $F_1\alpha$  der ATP Synthase spezifisch erkennenden Antikörper ergab, dass  $Suk^{hom}$  beziehungsweise *Suk* gemeinsam mit  $Suk^{hom}$  auch für die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase ohne Bedeutung zu sein scheint.

Die Abwesenheit von  $Suk^{hom}$  beziehungsweise von *Suk* und  $Suk^{hom}$  gleichzeitig hat keinerlei Auswirkung auf die Expression der dimerspezifischen Untereinheiten des  $F_0$ -Sektors oder der Untereinheit  $F_1\alpha$  des  $F_1$ -Sektors des Enzymkomplexes.

Es bestand die Vermutung, es könnte sich bei  $Suk^{hom}$  um eine noch unbekannte Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATP Synthase handeln. Dies wird dadurch in Frage gestellt, dass es nicht gelang, dieses Protein mittels Analyse der monomeren oder der dimeren Form des Enzyms durch zweidimensionale Gelelektrophorese nachzuweisen (Arnold *et al.*, 1998).

Falls  $\text{Suk}^{\text{hom}}$  entgegen bisher erhaltener Ergebnisse ein Bestandteil der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase ist, so ist die Entfaltung seiner physiologischen Wirkung eventuell von anderen als den bisher gewählten Bedingungen, wie beispielsweise der Anzucht der Hefen auf einem YPGal-Medium und einer logarithmischen Wachstumsphase, abhängig.

Möglicherweise ist  $\text{Suk}^{\text{hom}}$ , falls es existiert, jedoch nicht in der ATP Synthase lokalisiert, sondern ist in ganz anderen Bereichen der Mitochondrien oder des Cytosols von *Saccharomyces cerevisiae* wirksam. Eventuell ist es Bestandteil anderer ATPasen in anderen Organellen der Hefe und übt dort eine ähnliche Funktion aus. Allerdings konnte kein Antiserum gewonnen werden, das entweder in Mitochondrien oder im Cytosol lokalisiertes hypothetisches  $\text{Suk}^{\text{hom}}$  spezifisch erkennt.

Ergebnisse, die die Existenz von  $\text{Suk}^{\text{hom}}$  bestätigen, konnten demnach bis jetzt noch nicht erhalten werden.

### 4.3 Interagiert die $F_1F_0$ -ATP Synthase mit dem Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplex?

Es konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Cytochrom  $c$ -Oxidase und der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* jeweils Dimere bilden, die wiederum zu einem Suprakomplex zusammengefasst sind. Sie diffundieren somit weder in Hefe- noch in Rindermitochondrien frei in der inneren Membran, sondern sind stabil miteinander assoziiert (Cruciat *et al.*, 2000; Schägger und Pfeiffer, 2000, 2001). Eventuell ist eine Anordnung in einen Suprakomplex vorteilhaft für die Regulierung der Aktivität oder die Assemblierung der Komponenten der Elektronentransportkette. Es wäre denkbar, dass auch die  $F_1F_0$ -ATP Synthase als Enzym der oxidativen Phosphorylierung physiologisch eng an die anderen Komponenten der Atmungskette gebunden ist.

#### 4.3.1 Die Assemblierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase korreliert mit der Aktivität der Komponenten des Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplexes

Die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase könnte, wie oben vermutet (siehe 4.1.4), der Regulation der ATPase-Aktivität des Enzyms dienen. Ergebnisse der vorliegenden Arbeit erbrachten jedoch Hinweise darauf, dass die Dimerisierung der ATP Synthase essentiell für die optimale Funktion der Komponenten der Atmungskette, wie derjenigen des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes ist.

Frühere Arbeiten erbrachten Hinweise auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase und der Aktivität der Cytochrom  $c$ -Oxidase:

So konnte in Hefestämmen mit nicht funktionsfähiger und nicht assemblierter ATP Synthase ( $\Delta su 4$ ) eine signifikante Reduktion der Aktivität der Cytochrom  $c$ -Oxidase um das Fünffache beobachtet werden (Paul *et al.*, 1989). Aufgrund der Abnahme der Aktivität der Cytochrom  $c$ -Oxidase um etwa 30% in Abwesenheit von Sug, einer Untereinheit der  $F_1F_0$ -ATP Synthase, wurde eine enge physiologische Beziehung zwischen der  $F_1F_0$ -ATP Synthase und der Cytochrom  $c$ -Oxidase vermutet (Boyle *et al.*, 1999). Aus kalorimetrischen Messungen an isolierten Membranvesikeln und EPR-Spektroskopie wurde auf

die Bildung eines Suprakomplexes aus Cytochrom *c*-Oxidase und dem F<sub>0</sub>-Sektor der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase geschlossen (Qiu *et al.*, 1992). Eine Interaktion zwischen Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplex und F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase konnte allerdings nicht beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine direkte Auswirkung des Assemblierungszustandes der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase auf die Funktionalität der Cytochrom *c*-Oxidase beziehungsweise des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes gezeigt. In isolierten Mitochondrien der Hefestämme  $\Delta$ *sue* und  $\Delta$ *sug* ist die Aktivität beider Komponenten der Elektronentransportkette gegenüber dem Wildtyp signifikant reduziert, obwohl die spezifische Aktivität der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase hier nicht beeinträchtigt ist. So konnte im Stamm  $\Delta$ *sue* eine Reduktion der Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität um etwa 75 %, im Stamm  $\Delta$ *sug* um etwa 50 % gemessen werden. Die Aktivität des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes sank in der *Sue*- und der *Sug*- Disruptante um etwa denselben Wert. Eine Reduktion der Cytochrom *c*-Oxidase-Aktivität in  $\Delta$ *sue* beziehungsweise  $\Delta$ *sug* wurde auch von weiteren Gruppen beobachtet (Tokatlidis *et al.*, 1996; Boyle *et al.*, 1999). Auf nicht-fermentierbaren Medien erfolgt das Wachstum der *Sue*- und *Sug*-Disruptante im Vergleich zum Wildtyp signifikant langsamer (Arnold *et al.*, 1998).

Die Reduktion der Aktivitäten der Cytochrom *c*-Oxidase und des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes korrelieren mit dem Assemblierungsgrad der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase: Die geringste Reduktion der Aktivitäten findet man im Stamm  $\Delta$ *suk*, wo die ATP Synthase zwar nicht mehr völlig intakt, aber zu einem Dimer assembliert ist. Hier ist sie um etwa 15 % verringert. In Mitochondrien des Stammes  $\Delta$ *sug* liegt noch ein geringer Teil der ATP Synthase als Dimer vor, in Mitochondrien des Stammes  $\Delta$ *sue* konnte keinerlei Dimer nachgewiesen werden, entsprechend ist hier die Reduktion der Aktivitäten am deutlichsten ausgeprägt.

Diese Korrelation weist auf einen Einfluss des Assemblierungszustandes der F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase auf die Aktivität der Komponenten des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplexes hin.

### 4.3.2 Die Assemblierung der $F_1F_0$ -ATP Synthase beeinflusst die Assemblierung des Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplexes

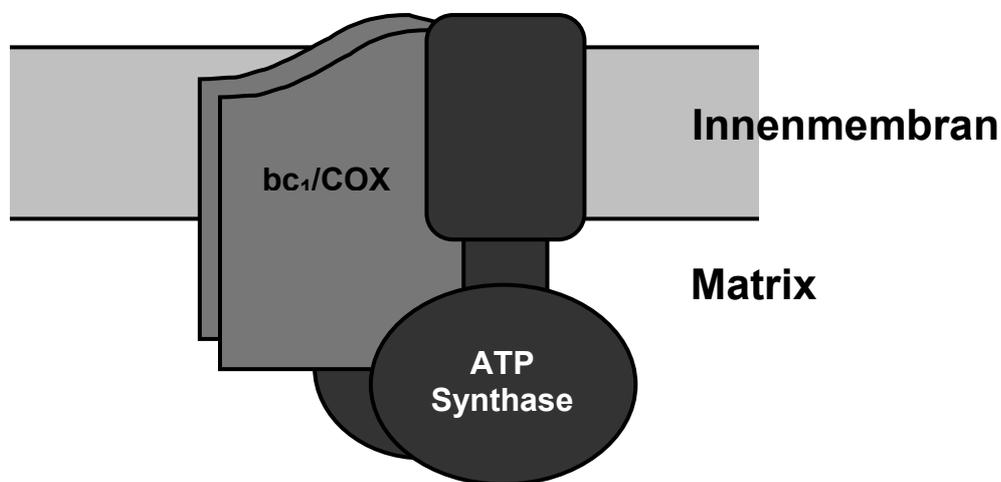
Auf welche Weise wirkt sich die Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase auf die Aktivitäten des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes und der Cytochrom  $c$ -Oxidase aus? Möglicherweise ist die Stabilität des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes beeinträchtigt, wenn die ATP Synthase nicht mehr als Dimer vorliegt. Beispielsweise könnte bedeuten ein ATP Synthase-Dimer den Suprakomplex vor Zerfall oder einem Angriff durch abbauende Proteine schützen oder für eine korrekte Assemblierung notwendig sein (Abb.25).

In *Sue* -Nullmutanten wird die Expression von Cox2 signifikant reduziert. Somit könnte die Reduktion der Aktivität der Cytochrom  $c$ -Oxidase in  $\Delta sue$  auch darauf zurückgehen, dass aufgrund der geringeren Expression von Cox2 ein signifikanter Teil der Cytochrom  $c$ -Oxidase nicht vollständig assembliert vorliegt. Eventuell interagiert *Sue* (neben seiner Rolle als Dimerisierungsfaktor der ATP Synthase) mit Untereinheiten der Cytochrom  $c$ -Oxidase und beeinflusst ihre Stabilität oder ihre Assemblierung auf eine Weise, die noch zu untersuchen wäre. Allerdings kann man im Stamm  $\Delta sug$  keine Herunterregulation beziehungsweise erhöhte Instabilität von Cox2 beobachten, obwohl auch hier die Menge an *Sue* signifikant reduziert ist. Möglicherweise reicht eine geringe Menge an *Sue* aus, um Cox2 zu stabilisieren.

Die erstgenannte Hypothese einer Auswirkung der Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase auf die Stabilität beziehungsweise die Assemblierung des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes wird durch die Ergebnisse der blauen Nativgelelektrophorese in *Sue*-, *Sug*- und *Suk*-Disruptanten unterstützt. Sowohl in  $\Delta sue$ , als auch in  $\Delta sug$  ist der Suprakomplex unvollständig assembliert. Dass im Stamm  $\Delta sug$  die Assemblierung des Suprakomplexes beeinträchtigt ist, obwohl die Menge an Cox2 derjenigen des Wildtyps entspricht, deutet auf eine direkte Auswirkung der Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase auf die Assemblierung und somit die Aktivität des Suprakomplexes hin. Entsprechend ist in  $\Delta suk$  (mit dimerer ATP Synthase) der Suprakomplex vollständig und in  $\Delta atp10$  (ohne assemblierten  $F_0$ -Sektor) überhaupt nicht assembliert. Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse muss man allerdings die Neigung einiger Disruptanten von Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase berücksichtigen, spontan *rho*<sup>-</sup> - Hefestämme zu bilden, deren mitochondriale Erbinformation verloren gegangen ist. Das gilt besonders für die Hefestämme  $\Delta sue$  oder  $\Delta atp10$ . Dies würde ebenfalls indirekt zu den beobachteten Phänomenen führen. Auch hier würde zum Beispiel die Cytochrom

*c*-Oxidase nicht in einen Suprakomplex assemblieren, da kein mitochondrial kodiertes Cox2 gebildet würde. Dieser Annahme widerspricht jedoch entschieden die bereits dargestellte Beobachtung, dass im Stamm  $\Delta sug$ , in dem Cox2 in einer dem Wildtyp vergleichbaren Menge exprimiert wird, der Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplex ebenfalls nicht vollständig assembliert.

Der Phänotyp, der bezüglich der Assemblierung des Cytochrom  $bc_1$ -Suprakomplexes beziehungsweise der Expression von Cox2 in *Sue*-Disruptanten auftritt, kann in den Hefestämmen  $\Delta sue+Sue-His_{12}$  und  $\Delta sue+Sue\Delta C$  nicht mehr beobachtet werden. Wie bereits erwähnt, ist im Stamm *Sue-His<sub>12</sub>* der C-Terminus durch einen Anhang von 12 Histidinresten modifiziert. Im Stamm  $\Delta sue+Sue\Delta C$  wurde die in *Saccharomyces cerevisiae* zusätzlich vorhandene C-terminale Region disruptiert. Die Untersuchung der Assemblierung des Suprakomplexes in diesen Stämmen sollte Hinweise dafür geben, ob die C-terminale Region direkt in diese involviert ist. Auch in diesem Fall liegt wieder eine dimere  $F_1F_0$ -ATP Synthase vor. Die Assemblierung des Suprakomplexes hängt sichtbar von derjenigen der  $F_1F_0$ -ATP Synthase ab.



**Abb.25:** Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase zum „Schutz“ des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes.

Beschreibung siehe Text.  $bc_1/COX$ = Suprakomplex aus dem Dimeren des Cytochrom  $bc_1$ -Komplexes und dem Dimeren der Cytochrom *c*-Oxidase.

Die Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase zu einem Dimer wird durch die Assemblierung der Komponenten des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes nicht beeinflusst. Die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase verläuft also unabhängig von der Assemblierung des Suprakomplexes.

#### 4.3.3 Die Untereinheit e der $F_1F_0$ -ATP Synthase ist wahrscheinlich Untereinheiten des Cytochrom $bc_1$ -COX-Suprakomplexes benachbart

Eine direkte Interaktion von Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase mit Untereinheiten der Cytochrom  $c$ -Oxidase wurde zwar bereits postuliert (Boyle *et al.*, 1999), doch diese Annahme konnte bisher nicht bewiesen werden.

Auch Ergebnisse der Untersuchung des Umfelds von Sue in Hefestämmen mit unvollständig assemblierter Cytochrom  $c$ -Oxidase beziehungsweise Cytochrom  $bc_1$ -Komplex unterstützen die Annahme eines Suprakomplexes aus Cytochrom  $bc_1$ -Komplex, Cytochrom  $c$ -Oxidase und  $F_1F_0$ -ATP Synthase in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Durch Untersuchung des Musters der Interaktionspartner von Sue nach Quervernetzung sollten Hinweise darauf gewonnen werden, ob Untereinheiten der  $F_1F_0$ -ATP Synthase sich in enger Nachbarschaft mit Untereinheiten der Komponenten des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes befinden. Diese erfolgte in den Stämmen  $\Delta\text{cox}20$ ,  $\Delta\text{cox}4$  und  $\Delta\text{impl}1$ , in denen die Cytochrom  $c$ -Oxidase nicht vollständig assembliert,  $\Delta\text{cox}12$ , in dem sie assembliert und  $\Delta\text{core}1$ , in dem der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex nicht assembliert.

Die Änderung der Umgebung von Sue in den Stämmen, in denen die Cytochrom  $c$ -Oxidase beziehungsweise der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex nicht assembliert sind, weist auf eine enge physiologische Beziehung dieser Untereinheit mit den beiden Komponenten des Suprakomplexes hin.

Durch Quervernetzungsexperimente mit den chemischen Quervernetzern MBS und DTNB im Stamm  $\Delta\text{sue}+\text{Sue-His}_{12}$  gelang es weiterhin mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie, ein Quervernetzungsprodukt der Größe von 42 kDa spezifisch zu isolieren. Dieses war sowohl mit einem Antiserum, das Sue, als auch mit einem Antiserum, das Cox2 spezifisch erkennt, nachweisbar. Somit wurde eine physikalische Interaktion zwischen der Untereinheit Sue der  $F_1F_0$ -ATP Synthase und der Untereinheit Cox2 der Cytochrom  $c$ -Oxidase nachgewiesen.

Es scheint, als ob die Interaktion von Sue und Cox2 bei Hemmung der ATP Synthase- beziehungsweise ATPase-Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase durch

Oligomycin unterbrochen wird. Dies wurde ebenfalls anhand von Quervernetzungsexperimenten gezeigt.

Die vorliegenden Daten sprechen für die Existenz eines Suprakomplexes in *Saccharomyces cerevisiae*, der nicht nur den Cytochrom  $bc_1$ -Komplex und die Cytochrom  $c$ -Oxidase, sondern auch die  $F_1F_0$ -ATP Synthase umfaßt. Dies wäre physiologisch von einigem Vorteil: eine stabile Einbindung der Komponenten der Atmungskette in einen Multienzymkomplex würde zum Beispiel die Weiterleitung von Intermediaten an die folgende Komponente der Elektronentransportkette erleichtern und beschleunigen (Fersht, 1999). Die Bildung von ATP ist an den Aufbau eines elektrochemischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran gekoppelt. Eine physiologisch enge Beziehung zwischen der ATP Synthase und den Komponenten der Elektronentransportkette, die an diesem Aufbau beteiligt sind, wäre sinnvoll. Eine notwendige koordinierte Regulation der einzelnen Aktivitäten wäre so erheblich leichter durchführbar.

Die Anordnung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase zu einem Dimer verläuft unabhängig von der Assemblierung des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes. Die Assemblierung eines möglichen Supra-Suprakomplexes aus Cytochrom  $c$ -Oxidase, Cytochrom  $bc_1$ -Komplex und  $F_1F_0$ -ATP Synthase erfolgt demnach eventuell geordnet. Eine Voraussetzung dafür wäre zunächst die Dimerisierung der ATP Synthase.

#### 4.3.4 Sue – ein Regulationsfaktor innerhalb der Atmungskette?

Eine physikalische Interaktion von Sue und Cox2 könnte auf eine Funktion von Sue als Regulationsfaktor der Aktivitäten der Komponenten der Atmungskette hindeuten. Die Regulation könnte durch einen direkten Kontakt mit Untereinheiten der Enzymkomplexe erfolgen.

Sue wird bei der Isolierung der ATP Synthase in Gegenwart von Detergenzien relativ leicht abgelöst (Arnold *et al.*, 1998; Arakaki *et al.*, 2001). Dies ist einer der Gründe, warum es so spät diesem Enzym zugeordnet werden konnte. Eventuell war eine relativ lockere Assoziation von Sue an seine Interaktionspartner auch der Grund, warum es nicht gelang, Cox2 nach einer Lyse unter milden Bedingungen (bei einer Solubilisierung mit 1% Digitonin beziehungsweise 1% DDM) mit einem Antiserum gegen Sue zu isolieren.

Für Sue wurde wiederholt eine regulative Funktion vorgeschlagen. So besitzt die Aminosäuresequenz der zusätzlich vorhandenen C-terminalen Region von Sue aus *Saccharomyces cerevisiae*, das wie bereits erwähnt in den Inter-membranraum ragt, signifikante Sequenzähnlichkeit zu Adenosin-Desaminasen anderer Organismen. Sue könnte demnach durch Interaktion mit Adenin-Nukleotiden regulatorisch wirksam werden indem sie beispielsweise die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase beeinflusst.

Diese Hypothese konnte allerdings nicht bestätigt werden (siehe Kapitel 4.1.1). Möglicherweise wird jedoch durch eine Interaktion von Sue mit Adenin-Nukleotiden eine potentielle Interaktion von Sue und Cox2 beeinflusst. Somit würde der Gehalt an ATP in der mitochondrialen Matrix nicht die Aktivität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase, sondern die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase beeinflussen. Auch hier wäre die Bildung eines Suprakomplexes aus den Enzymen der Atmungskette sinnvoll.

Die Expressionsrate von Sue in Zellen aus dem Muskelgewebe von Mäusen (C2C12 Zellen) hing von der Verfügbarkeit an Sauerstoff ab (Levy und Kelly, 1997). Hierbei wurde die Expression verschiedener Gene während der Differenzierung von Myoblasten zu Myotuben unter normalen Bedingungen beziehungsweise bei Sauerstoffmangel untersucht. Nach einem Sauerstoffmangel von 24 Stunden sank dabei die Konzentration an Sue-mRNA in der Zelle um mehr als 70%.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde ebenfalls eine regulatorische Funktion des Proteins, allerdings ausschließlich auf die Aktivität der ATP Synthase bezogen, vorgeschlagen. Könnte es sein, dass diese regulatorische Funktion sich nicht nur auf die ATP Synthase, sondern auch auf die Cytochrom *c*-Oxidase erstreckt? Die Verfügbarkeit von Sauerstoff innerhalb einer Zelle dürfte sich primär auf die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase und erst sekundär, über das elektrochemische Potential, auf diejenige der  $F_1F_0$ -ATP Synthase auswirken.

Es ist bisher noch nicht geklärt, ob die Verfügbarkeit von Sauerstoff eine Auswirkung auf die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase hat. Die Herunterregulation der Expression von Sue bei geringer Verfügbarkeit von Sauerstoff könnte die Bildung eines ATP Synthase-Monomeren oder aber die Instabilisierung der dimeren Form und damit wahrscheinlich auch die Bildung geringerer Mengen an vollständig assembliertem Suprakomplex zur Folge haben.

Die Expression von *Sue* würde sich auf diese Weise auf die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase auswirken.

Des Weiteren wurde eine Auswirkung der C-terminalen Region von *Sue* aus Rattenmitochondrien auf die ATPase-Aktivität der ATP Synthase beobachtet (Higuti *et al.*, 1992; Arakaki *et al.*, 2001). Es gelang, in Mitoplasten die ATPase-Aktivität der ATP Synthase durch Blockierung dieser Region von *Sue* durch einen spezifischen Antikörper zu stimulieren. Die Autoren stellten zudem eine Sequenzähnlichkeit der C-terminalen Region von *Sue* mit der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Tropomyosin-bindenden Region von Troponin T fest. Sie vermuteten daher in *Sue* eine Untereinheit der ATP Synthase, die über ihre C-terminale Region die Regulation der Aktivität des Enzyms in Abhängigkeit des  $\text{Ca}^{2+}$ -Spiegels in der Zelle beeinflusst. Auch andere Untereinheiten der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase werden als Vermittler zwischen der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration in der Zelle und der Aktivität der ATP Synthase diskutiert. Dazu gehört die Untereinheit  $\beta$  des  $\text{F}_1$ -Sektors (Hubbard und McHugh, 1996).

Interessanterweise ist auch die Aktivität der Cytochrom *c*-Oxidase abhängig von der  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration. Kürzlich wurde die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Regulation der Cytochrom *c*-Oxidase mit der Aktivität der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase in Beziehung gesetzt (Bender und Kadenbach, 2000). Könnte hier *Sue* als ein Koordinator der  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängigen Aktivitäten beider Enzymkomplexe wirken?

*Sue* wurde durch die vorliegende Arbeit als ein Dimerisierungsfaktor der  $\text{F}_1\text{F}_0$ -ATP Synthase identifiziert. Weitere Funktionen des Proteins müssen noch geklärt werden. Insbesondere ist die Natur seiner potentiellen Interaktion mit Cox2 zu untersuchen.

## 5. Zusammenfassung

Im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit steht die Funktion der Untereinheit *e* (*Sue*) der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase von *Saccharomyces cerevisiae*. Anhand der Resultate der durchgeführten Experimente wurden folgende Schlussfolgerungen gezogen:

- (1) *Sue* ist der Lage, ein *Sue*-Homodimeres zu bilden. Das Protein spielt eine zentrale Rolle bei der Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase zu einem stabilen Dimer. *Sue*-Disruptanten bilden entsprechend kein stabiles ATP Synthase-Dimeres aus. Die C-terminalen 36 Aminosäurereste von *Sue*, die gegenüber Untereinheiten *e* aus Säugerzellen zusätzlich vorhanden sind, sind für die Dimerisierung von *Sue* und der  $F_1F_0$ -ATP Synthase ohne Bedeutung.
- (2) Zwischen den Untereinheiten *e* und *k*, die beide im  $F_0$ -Sektor der ATP Synthase lokalisiert sind, besteht eine enge räumliche Beziehung. Für die Interaktion von *Sue* mit *Suk* ist der Bereich von *Sue*, der anderen Untereinheiten *e* aus Säugerzellen ähnelt, ausreichend.
- (3) Im Hefegenom wurde ein der Sequenz von *Suk* nahe verwandtes Leseraster gefunden. Die Sequenzähnlichkeit auf Aminosäureebene beträgt 45%. Ein entsprechendes hypothetisches Protein wurde als *Suk*<sup>hom</sup> bezeichnet. Eine Deletion dieser Sequenz allein oder gemeinsam mit dem Gen für *Suk* blieb ohne Auswirkungen auf die oxidative Phosphorylierung, die Assemblierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase und die Expression von Untereinheiten des  $F_0$ -Sektors der  $F_1F_0$ -ATP Synthase.
- (4) Die Dimerisierung der  $F_1F_0$ -ATP Synthase und somit auch die Funktion von *Sue* als Dimerisierungsfaktor erwies sich als essentiell für die Funktion weiterer Komponenten der Atmungskette: der Cytochrom *c*-Oxidase und des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-Komplexes. Die Assemblierung der ATP Synthase wirkt sich auf die Aktivitäten der beiden Komponenten des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplexes aus. Sie beeinflusst auch deren Assemblierung in den Suprakomplex beziehungsweise seine Stabilität. Die Anwesenheit der Region von *Sue*, die anderen Untereinheiten *e* aus Säugetierzellen ähnelt, reicht für die Bildung des Cytochrom *bc*<sub>1</sub>-COX-Suprakomplexes aus.

Das Dimer der ATPase Synthase ist demzufolge in den Suprakomplex eingebunden. Allerdings hat der Assemblierungszustand des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes keinerlei Auswirkungen auf die Assemblierung der ATP Synthase. Dies deutet auf einen hierarchisch ablaufenden Prozeß der Bildung eines Suprakomplexes aus Cytochrom  $bc_1$ -Komplex, Cytochrom  $c$ -Oxidase und  $F_1F_0$ -ATP Synthase hin.

Die ATP Synthase nutzt zur Bildung von ATP den elektrochemischen Gradienten über die innere Mitochondrienmembran, an dessen Aufbau der Cytochrom  $bc_1$ -Komplex und die Cytochrom  $c$ -Oxidase beteiligt sind. Eine Einbindung dieser Enzyme in einen Suprakomplex würde eine koordinierte Regulation der oxidativen Phosphorylierung ermöglichen.

(5) Zwischen der Untereinheit *Sue* der  $F_1F_0$ -ATP Synthase und der Untereinheit *Cox2* der Cytochrom  $c$ -Oxidase konnte eine enge räumliche Beziehung nachgewiesen werden. Diese ist von der Funktionalität der  $F_1F_0$ -ATP Synthase abhängig.

Anhand der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnte somit folgende Erklärung für die Funktion der Untereinheit *e* der mitochondrialen  $F_1F_0$ -ATP Synthase gefunden werden:

*Sue* dient als Dimerisierungsfaktor der  $F_1F_0$ -ATP Synthase. Die Dimerisierung von *Sue* und damit die Dimerisierung der ATP Synthase ist essentiell für die Stabilisierung des Cytochrom  $bc_1$ -COX-Suprakomplexes und die Funktion seiner Komponenten.

## 6. Literaturverzeichnis

- Abrahams, J.P., Leslie, G.W., Lutter, R. und Walker, E. (1994). Structure at 2.8 Å resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* **370**, 621-628.
- Ackerman, S.H. und Tzagoloff A. (1990a). Identification of two nuclear genes (*ATP11*, *ATP12*) required for the assembly of the yeast F<sub>1</sub>-ATPase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **87**, 4986-4990.
- Ackerman, S.H. und Tzagoloff A. (1990b). *ATP10*, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase. *J. Biol. Chem.* **265**, 9952-9959.
- Ackerman, S.H., Martin, J. und Tzagoloff, A. (1992). Characterization of *ATP11* and detection of the encoded protein in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267**, 7386-7394.
- Akashi, A., Yoshida, Y., Nakagoshi, H., Kuroki, K., Hashimoto, T., Tagawa, K. und Imamoto, F. (1988). Molecular cloning and expression of a gene for a factor which stabilizes formation of inhibitor-mitochondrial ATPase complex from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biochem (Tokyo)*. **104**, 526-350.
- Arakaki, N., Ueyama, Y., Hirose, M., Himeda, T., Shibata, H., Futaki, H., Kitagawa, K. und Higuti, T. (2001). Stoichiometry of subunit e in rat liver mitochondrial H<sup>+</sup>-ATP synthase and membrane topology of its putative Ca<sup>2+</sup>-dependent regulatory region. *Biochim. Biophys. Acta* **1504**, 220-228.
- Arnold, I., Bauer, M.F., Brunner, M., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1997). Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase :the novel subunit e is identical to Tim11. *FEBS Letters*, **411**, 195-200.
- Arnold, I. (1998). Biogenese mitochondrialer Innenmembranproteine: Mechanismen der Sortierung und Topogenese. *Dissertation*, Fakultät für Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., und Schagger, H. (1998). Yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO Journal* **17** (24), 7170-7178.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A. und Schagger, H. (1999). ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the *ATP18* gene. *J. Biol. Chem.* **274**, 36-40.
- Arselin, G., Vaillier, J., Graves, P.V. und Velours, J. (1996). ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the *ATP14* gene. *J. Biol. Chem.* **271**, 20284-20290.

- Babcock, G.T. und Wikström, M. (1992). Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration. *Nature* **356**, 301-309.
- Behrens, M., Michaelis, G. und Pratje, E. (1991). Mitochondrial inner membrane protease 1 of *Saccharomyces cerevisiae* shows sequence similarity to the *Escherichia coli* leader peptidase. *Mol. Gen. Genet.* **228**, 167-176.
- Belogradov, G.I., Tomich, J.M. und Hatefi Y. (1996). Membrane topography and near-neighbour relationships of the mitochondrial ATP synthase subunits e, f and g. *J. Biol. Chem.* **271**, 20340-20345.
- Bender, E. und Kadenbach, B. (2000). The allosteric ATP-inhibition of cytochrom *c*-oxidase activity is reversibly switched on by cAMB-dependent phosphorylation. *FEBS Lett.* **466**, 130-134.
- Birnboim, H. C. und Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Bottcher, B., Schwarz, L. und Graber, P.J. (1998). Direct indication for the existence of a double stalk in CF<sub>0</sub>F<sub>1</sub>. *J.Mol. Biol.* **281**, 757-762.
- Boumans, H., Grivell, L.A. und Berden, J.A. (1998). The respiratory chain of yeast behaves as a single functional unit. *J. Biol. Chem.* **273**, 4872-4877.
- Bowman, S., Ackerman, S.H., Griffiths, D.E. und Tzagoloff, A. (1991). Characterization of *ATP12*, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase. *J. Biol. Chem.* **266**, 7517-7523.
- Boyer, P.D. (1993). The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim. Biophys. Acta* **1140**, 215-250.
- Boyer, P.D. (1997). The ATP synthase--a splendid molecular machine. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717-749.
- Boyle, G.M., Roucou X., Nagely P., Devenish R.J. und Prescott, M. (1999). Identification of subunit g of yeast mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome *c* oxidase. *Eur. J. Biochem.* **262**, 315-323.
- Brandt, U. und Trumppower, B. L. (1994). The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **29**, 165-197.
- Brandt, U., Uribe, S., Schägger, H., und Trumppower, B.L. (1994). Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex. *J. Biol. Chem.* **269**, 12947-12953.

- Brandt, U. (1996)a. Energy conservation by bifurcated electron-transfer in the cytochrome-*bc*<sub>1</sub> complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**, 41-46.
- Brandt, U. (1996)b. Bifurcated ubihydrochinone oxidation in the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex by proton-gated charge transfer. *FEBS Lett.* **387**, 1-6.
- Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G. und Walker J.E. (2000). Dimerization of bovine F<sub>1</sub>-ATPase by binding the inhibitor protein, IF<sub>1</sub>. *J. Biol. Chem.* **275**, 28353-28355.
- Cabezón, E., Butler, P.J., Runswick M.J. und Walker J.E. (2000). Modulation of the oligomerization state of the bovine F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein IF<sub>1</sub>, by pH. *J. Biol. Chem.* **275**, 25460-25464.
- Caplan, A.J., Cyr, D.M. und Douglas, M.G. (1992). YDJ1p facilitates polypeptide translocation across different intracellular membranes by a conserved mechanism. *Cell* **71**, 1143-1155.
- Chaconas J. und van de Sande J. (1980). 5'-[<sup>32</sup>P]-labeling of RNA and DANN restriction fragments. *Meth. Enzymol.* **65**, 75-85.
- Chazotte, B. und Hackenbrock, C.R. (1989). Lateral diffusion as a rate-limiting step in ubiquinone-mediated mitochondrial electron transport. *J. Biol. Chem.* **264**, 4978-4985.
- Chirico, W.J., Waters, M.G. und Blobel, G. (1988). 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332**, 805-809.
- Collinson, I.R., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Runswick, M.J. und Walker, J.E. (1994). ATP synthase from bovine heart mitochondria: identification by proteolysis of sites in F<sub>0</sub> exposed by removal of F<sub>1</sub> and the oligomycin-sensitivity conferral protein. *Biochem. J.* **303**, 639-645.
- Craig, E.A.. (1993). Heat shock proteins: molecular chaperones of protein biogenesis. *Microbiol. Rev.* **57**, 402-414.
- Crofts, A.R. und Berry, E.A. (1998). Structure and function of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex of mitochondria and photosynthetic bacteria. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 501-509.
- Cruciat, C.M., Hell, K., Fölsch, H., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1999). Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex. *EMBO J.* **18**, 5226-6233.
- Cruciat, C.-M., Brunner, S., Baumann, F., Neupert, W. und Stuart, R.A. (2000). The Cytochrom *bc*<sub>1</sub> and Cytochrom *c* Oxidase Complexes Associate to Form a Single Supra-complex in Yeast Mitochondria. *J. Biol. Chem.* **275**, 18093-18098.

- de Vries, S. und Marres, C.A.M. (1987). The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* **895**, 205-239.
- Deshaies, R.J., Koch, B.D., Werner-Washburne, M., Craig, E.A. und Schekman, R. (1988). A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332**, 800-805.
- Devenish, R.J., Prescott, M., Roucou, X. und Nagley, P. (2000). Insights into ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1458**, 428-442.
- Dower, W. J., Miller, J. F. und Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E.coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Engelbrecht, S. und Junge, W. (1997). ATP synthase: a tentative structural model. *FEBS Letters* **414**, 485-491.
- Esser K, Pratje E. und Michaelis G. (1996). SOM 1, a small new gene required for mitochondrial inner membrane peptidase function in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.* **252**, 437-445.
- Fersht, A. (1999). *Structure and Mechanism in Protein Science*. W.H. Freeman&Co., New York, NY
- Galante, Y.M., Wong, S.Y. und Hatefi Y. (1981). Mitochondrial adenosine triphosphatase inhibitor protein: reversible interaction with complex V (ATP synthase complex). *Biochemistry* **20**, 2671-2678.
- Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G. und Walker, J.E. (2000). The structure of the central stalk in bovine F(1)-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 1055-1061.
- Gietz, D., St. Jean, A., Woods, R. A. und Schiestl, R. H. (1992). Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucl. Acids Res.* **20**, 1425.
- Glerum, D.M. und Tzagoloff, A. (1998). Affinity purification of yeast cytochrome oxidase with biotinylated subunits 4, 5, or 6. *Anal. Biochem.* **260**, 38-43.
- Gordon-Smith, D.J., Carbajo, R.J., Yang, J.C., Videler, H., Runswick, M.J., Walker, J.E. und Neuhaus, D. (2001). Solution Structure of a C-terminal coiled-coil domain from bovine IF(1): the inhibitor protein of F(1) ATPase. *J. Biol. Chem.* **308**, 325-339.
- Gupte, S.S., Wu, E.S., Hoehli, M., Jacobson, K., Sowers, A.E. und Hackenbrock, C.R. (1984). Relationship between lateral diffusion, collision frequency and electron transfer of mitochondrial inner membrane oxidation-reduction components. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **81**, 2606-2610.

- Gupte, S.S. und Hackenbrock, C.R. (1988a). Multidimensional diffusion modes and collision frequencies of cytochrome *c* with its redox partners. *J. Biol. Chem.* **263**, 5241-5247.
- Gupte, S.S. und Hackenbrock, C.R. (1988b). The role of cytochrome *c* diffusion in mitochondrial electron transport. *J. Biol. Chem.* **263**, 5248-5253.
- Hartl, F.-U., Pfanner, N., Nicholson, D. und Neupert, W. (1989). Mitochondrial protein import. *Biochim. Biophys. Acta* **998**, 1-45.
- Hashimoto, T., Negawa, Y. und Tagawa, K. (1981). Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial ATPase—stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme. *J. Biochem (Tokyo)*. **90**, 1151-1157.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y. und Tagawa, K. (1987). Binding properties of 9K protein to F<sub>1</sub>-ATPase: a counterpart ligand to the ATPase inhibitor. *J. Biochem (Tokyo)*. **102**, 685-692.
- Hatefi, Y. and Rieske, J.S. (1967). The preparation and properties of the DPNH-cytochrome *c* reductase (complex I-III of the respiratory chain). *Methods Enzymol.* **10**, 225-231.
- Hatefi, Y. (1985). The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 1015-1069.
- Hell, K., Tzagoloff, A., Neupert, W. und Stuart, R.A. (2000). Identification of Cox20p, a novel protein involved in the maturation and assembly of cytochrome oxidase subunit 2. *J. Biol. Chem.* **275**, 4571-4578.
- Herrmann, J. M., Fölsch, H., Neupert, W. und Stuart, R. A. (1994). Isolation of yeast mitochondria and study of mitochondrial protein translation. In Celis, D. E. (ed.), *Cell Biology: A Laboratory Handbook*, Academic Press, San Diego, CA, **1**, 538-544.
- Herrmann, R.G. (1997). Eukaryotism, toward a new interpretation. In Schenk, H.E.A., Herrmann, R.G., Jeon, K.W., Müller, N.E. und Schwemmler, W. (eds.), *Eukaryotism and Symbiosis*, Springer, Heidelberg, New York, 73-118.
- Higuti, T., Kuroiwa, K., Kawamura, Y. und Yoshihara, Y. (1992). Complete amino acid sequence of subunit e of rat liver mitochondria H<sup>+</sup>-ATP synthase. *Biochemistry* **31**, 12451-12454.
- Hubbard, M.J. und McHugh, N.J. (1996). Mitochondrial ATP synthase F<sub>1</sub>-beta-subunit is a calcium-binding protein. *FEBS Lett.* **391**, 323-329.

- Ichikawa, N., Yoshida, Y., Hashimoto, T., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Imamoto, F. und Tagawa, K. (1990). Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase inhibitor in yeast. *J. Biol. Chem.* **265**, 6274-6278.
- Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B. und Michel, H. (1995). Structure at a 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*. *Nature* **376**, 660-669.
- Iwata, S., Lee, J.W., Okada, K., Lee, J.K., Iwata, M., Rasmussen, B., Link, T.A., Ramaswamy, S. und Jap, B.K. (1998). Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex. *Science* **281**, 64-71.
- Jones, P.C., Jiang, W. und Fillingame, R.H. (1998). Arrangement of the multicopy H<sup>+</sup>-translocating subunit *c* in the membrane sector of the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, 17178-17185.
- Junge, W., Lill, H. und Engelbrecht, S. (1997). ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends Biochem. Sci.* **22**, 420-423.
- Karrasch, S. und Walker, J.E. (1999). Novel features in the structure of bovine ATP synthase. *J. Mol. Biol.* **290**, 379-384.
- Klein, G., Satre, M., Dianoux, A.C. und Vignais, P.V. (1980). Radiolabeling of natural adenosine triphosphatase inhibitor with phenyl (14C)isothiocyanate and study of its interaction with mitochondrial adenosine triphosphatase. Localization of inhibitor binding sites and stoichiometry of binding. *Biochemistry* **19**, 2919-2925.
- Konstantinov, A.A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., Gennis, R.B. (1997). The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 9085-9090.
- Kriauciunas, A., Yu, L., Yu, C. A., Wynn, R. M. und Knaff, D. B. (1989). The *Rhodospirillum rubrum* cytochrom *bc*<sub>1</sub> complex: peptide composition, prosthetic group content and quinone binding. *Biochim. Biophys. Acta* **976**, 70-76.
- Kyhse-Anderson, J. (1984). Electroblothing of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.* **10**, 203-207.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- LaMarche, A.E.P., Abate, M.I., Chan, S.H.P. and Trumpower, B.L. (1992). Isolation and characterization of *COX12*, the nuclear gene for a previously unrecognized subunit of *Saccharomyces cerevisiae* Cytochrom *c*-Oxidase. *J. Biol. Chem.* **267**, 22473-22478.

- Law, R.H., Manon, S., Devenish, R.J. und Nagley, P. (1995). ATP synthase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **260**, 133-163.
- Levy, F.H. und Kelly, D.P. (1997). Regulation of ATP synthase subunit e gene expression by hypoxia: cell differentiation stage-specific control. *Am. J. Physiol.* **272**, C457-65
- Marzuki, S., Watkins, L.C., Choo und W.M. (1989). Mitochondrial H<sup>+</sup>-ATPase in mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defective subunit 8 of the enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta.* **975** 222-230.
- Menz, R.I., Leslie, A.G. und Walker, J.E. (2001). The structure and nucleotide occupancy of bovine mitochondrial F(1)-ATPase are not influenced by crystallisation at high concentrations of nucleotide. *FEBS Letters* **494**, 11-14.
- Michel, H. (1998). The mechanism of proton pumping by cytochrome *c* oxidase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 12819-12824.
- Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144-148.
- Mitchell, P. (1975). The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Lett.* **59**, 137-139.
- Modrow, S. und Wolf, H. (1986). Characterization of two related Epstein-Barr virus-encoded membrane proteins that are differentially expressed in Burkitt lymphoma and *in vitro* transformed cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**, 5703-5707.
- Modrow, S., Höflacher, B., Gürtler, L. und Wolf, H. (1989). Carrier bound synthetic oligopeptides in ELISA test systems for distinction between HIV-1 and HIV-2 infection. *J. Acq. Immun. D.* **2**, 141-148.
- Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863-917
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M. und Kinosita Jr, K. (1997). Direct observation of the rotation of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **386**, 299-302.
- Nunnari, J., Fox, T. D. und Walter, P. (1993). A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* **262**, 1997-2004.
- Omote, H., Sambonmatsu, N., Saito, K., Sambongi, Y., Iwamoto-Kihara, A., Yanagida, T., Wada, Y. und Futai, M. (1999). The gamma-subunit rotation and torque generation in F<sub>1</sub>-ATPase from wild-type or uncoupled mutant *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 7780-7784.

- Patterson T.E. und Poyton R.O. (1986). *COX8*, the structural gene for yeast cytochrome *c* oxidase subunit VIII. DNA sequence and gene disruption indicate that subunit VIII is required for maximal levels of cellular respiration and is derived from a precursor which is extended at both its NH<sub>2</sub> and COOH termini. *J. Biol. Chem.* **261**, 17192-17197.
- Paul, M.F., Velours, J., Arselin de Chateaubodeau, G., Aigle, M. und Guerin, B. (1989). The role of subunit 4, a nuclear-encoded protein of the F<sub>0</sub> sector of yeast mitochondrial ATP synthase, in the assembly of the whole complex. *Eur.J.Biochem.* **185**, 163-171.
- Pedersen, P.L., Hullihen, J. und Wehrle, J.P. (1981). Proton adenosin triphosphatase complex of rat liver. The effect of trypsin on the F<sub>1</sub> and F<sub>0</sub> moieties of the enzyme. *J. Biol. Chem.* **256**, 1362-1369.
- Pedersen, P.L. (1996). Frontiers in ATP synthase research: understanding the relationship between subunit movements and ATP synthesis. *Bioenerg. Biomembr.* **28**, 389-395.
- Penin, F., Di Pietro, A., Godinot, C. und Gautheron, D.C. (1988). Fate of nucleotides bound to reconstituted F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> during adenosine 5'-triphosphate synthesis activation or hydrolysis: role of protein inhibitor and hysteretic inhibition. *Biochemistry* **27**, 8969-8974.
- Pratje, E., Mannhaupt, G., Michaelis, G. und Beyreuther, K. (1983). A nuclear mutation prevents processing of a mitochondrially encoded membrane protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **2**, 1049-1054.
- Prescott, M., Boyle, G., Lourbakous, A., Nagley, P. und Devenish, R.J. (1997). Disruption of a gene in *Saccharomyces cerevisiae* encoding a putative homolog of subunit g of mammalian ATP synthase. *Yeast* **134**, S137.
- Qiu, Z.H., Yu, L. und Yu, C.A. (1992). Spin-Label electron paramagnetic resonance and differential scanning calorimetry studies of the interaction between mitochondrial cytochrome *c* oxidase and adenosine triphosphatase synthase complex. *Biochemistry* **31**, 3297-3302.
- Rich, P.R. (1984). Electron and proton transfers through quinones and cytochrome *bc*<sub>1</sub> complexes. *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 53-79.
- Rothstein, R.J. und Sherman, F. (1980). Genes affecting the expression of cytochrome *c* in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics* **94**, 871-889.
- Rouslin, W. (1983). Protonic inhibition of the mitochondrial oligomycin-sensitive adenosine 5'-triphosphatase in ischemic and autolyzing cardiac muscle. Possible mechanism for the mitigation of ATP hydrolysis under nonenergizing conditions. *J. Biol. Chem.* **258**, 9657-9661.

- Sah, J.F., Chellappa, K. und Mohanty, P. (1993). PH dependent conformational changes modulate functional activity of the mitochondrial ATPase inhibitor protein. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **194**, 1521-1528.
- Saiki, R., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K., Horn, G., Erlich, H. A. und Arnheim, N. (1985). Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**, 1350-1354.
- Saiki, R., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. und Erlich, H. A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**, 487-491.
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y. und Futai, M. (1999). Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase ( $F_0F_1$ ): direct observation. *Science* **286**, 1722-1724.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). In *Molecular cloning: a laboratory manual* (New York: Cold Spring Harbor Press).
- Saraste, M. (1999). Oxidative phosphorylation at the *fin de siècle*. *Science* **283**, 1488-1493.
- Schägger, H. und von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223-231.
- Schägger, H. und Pfeiffer, K. (2000). Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.* **19**, 1777-1783.
- Schägger, H. und Pfeiffer, K. (2001). The ratio of oxidative phosphorylation complexes I, II, III, IV and V in bovine heart mitochondria, and the composition of respiratory chain supercomplexes. *J. Biol. Chem.* **276**, 37861-37867.
- Schatz, G. und Dobberstein, B. (1996). Common principles of protein translokation across membranes. *Science* **271**, 1519-1526.
- Schmidt, R.A., Qu, J., Williams, J.R. and Brusilow, W.S. (1998). Effects of carbon source on expression of  $F_0$  genes and on the stoichiometry of the c subunit in the  $F_1F_0$  ATPase of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **180**, 3205-3208.
- Schneider, A., Behrens, M., Scherer, P., Pratje, E., Michaelis, G. und Schatz, G. (1991). Inner membrane protease I, an enzyme mediating intramitochondrial protein sorting in yeast. *EMBO J.* **10**, 247-254.
- Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V. und Velours, J. (1997). The subunit f of mitochondrial yeast ATP synthase—characterization of the protein and disruption of the structural gene *ATP17*. *Eur. J. Biochem.* **247**, 1111-1117.

- Spannagel, C., Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V., Grandier-Vazeille, X. und Velours, J. (1998). Evidence of a subunit 4 (subunit b) dimer in favor of the proximity of ATP synthase complexes in yeast inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1414**, 260-264.
- Stock, D., Leslie, A.G.W. und Walker, J.E. (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* **286**, 1700-1705
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A.G.W. und Walker, J.E. (2000). The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 672-679.
- Stuart, R.A., Cyr, D.M., und Neupert, W. (1994). Mitochondrial molecular chaperones: their role in protein translocation. *Trends Biochem. Sci.* **19**, 87-92.
- Taanman, J.W. und Capaldi, R.A. (1992). Purification of yeast cytochrome *c* oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme. *J. Biol. Chem.* **267**, 22481-22485.
- Telford, J., Kressmann, A., Koski, R., Müller, F., Clarkson, S. und Birnstiel, M. (1979). Delimitation of a promoter for RNA polymerase III by means of a functional test. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **76**, 267-271.
- Tokatlidis, K., Junne, T., Moes, S., Schatz, G., Glick, B.S. und Kronidou, N. (1996). Translocation arrest of an intramitochondrial sorting signal next to Tim11 at the innermembrane import site. *Nature* **384**, 585-588.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from acrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **79**, 267-271.
- Trumpower, B.L. (1990). Cytochrome *bc*<sub>1</sub> complexes from microorganisms. *Microbiol. Rev.* **54**, 101-129.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R. und Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at a 2.8 Å. *Science* **272**, 1136-1144.
- Tzagoloff, A., Akai, A. und Needleman, R.B. (1975). Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. *J. Biol. Chem.* **250**, 8228-8235.
- Tzagoloff, A., Wu, M. A. und Crivellone, M. (1986). Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of *CORI*, the structural gene for the 44-kilodalton core protein of yeast coenzyme QH<sub>2</sub>-cytochrome *c* reductase. *J. Biol. Chem.* **261**, 17163-17169.

- Tzagoloff, A. (1995). Ubiquinol-cytochrome *c* oxidoreductase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol.* **260**, 51-63.
- Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V., Camougrand und N., Velours, J. (1999). Isolation of supernumerary yeast ATP synthase subunits e and i. Characterization of subunit i and disruption of its structural gene *ATP18*. *J. Biol. Chem.* **274**, 543-548.
- Valiyaveetil, F.I. und Fillingame, R.H. (1998). Transmembrane topography of subunit a in the *Escherichia coli* F<sub>1</sub>F<sub>0</sub> ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **273**, 16241-16247.
- Van Heeke, G., Deforce, L., Schnizer, R.A., Shaw R., Couton, J.M., Shaw, G., Song, P.-S. und Schuster S.M. (1993). Recombinant bovine heart mitochondrial F<sub>1</sub>-ATPase inhibitor protein: overproduction in *Escherichia coli*, purification and structural studies. *Biochemistry* **32**, 10140-10149.
- Wach, A., Brachat, A., Poehlmann, R. und Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808.
- Wada, T., Long, J.C., Zhang, D. und Vik, S.B. (1999). A novel labeling approach supports the five-transmembrane model of subunit a of the *Escherichia coli* ATP synthase. *J. Biol. Chem.* **274**, 17353-17357.
- Walker, J.E., Lutter, R., Dupuis A. und Runswick, M.J. (1991). Identification of the subunits of F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATPase from bovine heart mitochondria. *Biochemistry* **30**, 5369-5378.
- Walker, J.E. (1994). The regulation of catalysis in ATP synthase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **4**, 912-918.
- Walker, J.E., Collinson, I.R., Van Raaij, M.J. und Runswick, M.J. (1995). Structural analysis of ATP synthase from bovine heart mitochondria. *Methods Enzymol.* **260**, 163-190.
- Weber, J. und Senior, A.E. (1997). Catalytic mechanism of F<sub>1</sub>-ATPase. *Biochim Biophys Acta* **1319**, 19-58.
- Weber, J., und Senior, A.E. (2001). Bi-site catalysis in F<sub>1</sub>-ATPase: Does it exist? *J. Biol. Chem.* **38**, 35422-35428.
- Wikstrom, M. (1989). Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping. *Nature* **338**, 776-778.
- Wikström, M. (1998). Proton translocation by bacteriorhodopsin and heme-copper oxidases. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 480-488.
- Yang, X.H. und Trumppower, B.L. (1986). Isolation of a three-subunit cytochrome *bc*<sub>1</sub> complex from *Paracoccus denitrificans*. *Methods Enzymol.* **126**, 316-325.

- Yasuda, R., Noji, H., Yoshida, M., Kinosita Jr, K. und Itoh, H. (2001) Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F<sub>1</sub>-ATPase. *Nature* **410**, 898-904.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Yamashita, E., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T. und Tsukihara, T. (1998). Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase. *Science*, **280**, 1723-1729.
- Yu, C.A., Yu, L. (1980). Resolution and reconstitution of succinate-cytochrome *c* reductase: preparations and properties of high purity succinate dehydrogenase and ubiquinol-cytochrome *c* reductase. *Biochim. Biophys. Acta* **591**, 409-420.

## **DANKSAGUNG**

Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert danke ich sehr herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die wissenschaftliche Begleitung meiner Doktorarbeit. Die Zeit an seinem Institut gehört zu meinen schönsten Erinnerungen. Das Klima und die Arbeitsbedingungen dort habe ich als hervorragend empfunden.

Herrn Prof. Dr. R. Herrmann danke ich vielmals für seine Bereitschaft, meine Dissertation an der Fakultät für Biologie zu vertreten.

Von ganzem Herzen möchte ich mich bei Frau Prof. Dr. Rosemary Stuart bedanken, unter deren Anleitung meine Arbeit entstanden ist. Ich werde ihr nie vergessen, mit welchem Engagement sie mittels Internet und Telefon von Amerika aus mit mir in Kontakt blieb. Der (nicht nur) wissenschaftliche Austausch war immer sehr spannend und anregend. Sie war nicht nur fachlich, sondern auch menschlich eine wunderbare Gruppenleiterin.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Sandra Esser für ihre hervorragende und engagierte Mitarbeit. Sie trug durch ihren Humor und ihr freundliches Wesen entscheidend dazu bei, dass ich immer gerne im Labor gearbeitet habe.

Mein großer Dank gilt auch den wissenschaftlichen Kollegen, Kai, Isabel, Frank, Connie, Markus, Carola, Michael B., Thomas, Stefan, Holger und allen anderen für die gute Zusammenarbeit und das schöne Arbeitsklima. Besonders bedanke ich mich bei Cristi, deren kräftiges Zureden im Verein mit Rosemary mich dazu veranlasst hat, meine Arbeit auch nach der abrupten Einberufung in den Schuldienst weiter zu führen.

Dank auch an Frau Döge für ihre Unterstützung und die anregenden Buchempfehlungen.

Bei Frau Farsen bedanke ich mich für die Unterstützung und ihre Hilfsbereitschaft in Verwaltungsfragen, besonders während der Zeit, als die Arbeit in der Schule und die Arbeit im Labor nebeneinander liefen.

Mein Dank gilt ferner den Mitarbeitern der Werkstatt, des Tierstalls und der Pforte für ihre freundliche Unterstützung. Ohne sie wäre ein so reibungsloser Ablauf im Labor nicht möglich gewesen.

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinem Mann und meinen Eltern bedanken. Ich danke ihnen für das viele Zuhören, für ihre Unterstützung und für ihre Bereitschaft, immer wieder einmal das Kindchen zu betreuen. Ohne sie wäre ich nicht in der Lage gewesen, Schule, Kind und Doktorarbeit zu vereinbaren.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten:

Name Susanne Brunner (geb. Pietschmann)  
Geburtsdatum 16.01.1967  
Geburtsort München

### Schulbildung:

1973-1977 Grundschulen Geretsried, Penzberg, Bernried  
1977-1986 staatliches Gymnasium Tutzing  
Juni 1986 Abitur

### Hochschulbildung:

Okt. 1986 – März 1989 Studium der Biologie an der Technischen Universität München  
März 1989 – Juni 1993 Studium des Lehramtes an Gymnasien (Biologie und Chemie) an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
April 1991 – April 1992 Zulassungsarbeit/Diplomarbeit bei der ehem. Boehringer-Mannheim GmbH unter Anleitung von Prof. Dr. Böck, LMU München  
Thema: „Klonierung und Expression letaler Gene in *E.coli* in strikt regulierten Expressionssystemen am Beispiel des *Sau3A1*-Endonuklease- und des *Sau3A1*-Methylasegens“  
Sept. 1993 – Sept. 1995 Vorbereitungsdienst für das Lehramt an Gymnasien  
Okt. 1997 Abschluss der Diplom-Hauptprüfung in Biologie an der Technischen Universität München  
Januar 1998 Beginn der vorliegenden Dissertation unter Anleitung von Prof. Dr. Dr. W. Neupert am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München

### Berufsausübung:

Okt. 1995- Nov. 1996 Anstellung bei der ehem. Boehringer-Mannheim GmbH (befristet)  
Sept. 1999 Anstellung in den Gymnasialdienst (unbefristet)  
Sept. 2001 Verbeamtung (StRn z.A.)