



Institut für Biologische Informationsverarbeitung

*Untersuchungen zur in vivo und in vitro
Expression des Membranproteins
Bacteriorhodopsin in Mitochondrien*

Elisabeth Fuß

***Untersuchungen zur in vivo und in vitro
Expression des Membranproteins
Bacteriorhodopsin in Mitochondrien***

Elisabeth Fuß

Berichte des Forschungszentrums Jülich ; 3500
ISSN 0944-2952
Institut für Biologische Informationsverarbeitung Jül-3500
D 61 (Diss. Univ. Düsseldorf)

Zu beziehen durch: Forschungszentrum Jülich GmbH · Zentralbibliothek
D-52425 Jülich · Bundesrepublik Deutschland
☎ 02461/61-61 02 · Telefax: 02461/61-61 03 · e-mail: zb-publikation@fz-juelich.de

Untersuchungen zur *in vivo* und *in vitro* Expression des Membranproteins Bacteriorhodopsin in Mitochondrien

Die Licht-getriebene Protonenpumpe Bacteriorhodopsin (BR) aus *Halobacterium salinarum* mit der mitochondrialen Signalsequenz der Untereinheit 9 der ATPase aus *Neurospora crassa* und Teilstücke von BR mit der mitochondrialen Signalsequenz der Untereinheit IV der Cytochrom-c-Oxidase aus *Saccharomyces cerevisiae* wurden im Cytoplasma von *Schizosaccharomyces pombe* exprimiert. Nur ein Teil des BR wurde ins Zielkompartiment, die Mitochondrien, importiert. In Experimenten zum Import der BR-Konstrukte in isolierte Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe* konnte kein Import von BR oder BR-Teilstücken nachgewiesen werden. Zur Expression von BR direkt in den Mitochondrien wurde ein neues, dem genetischen Code der Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* angepaßtes BR-Gen (mtbos) über biolistische Transformation in die Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* gebracht und über homologe Rekombination anstelle des Gens für die Untereinheit III der Cytochrom-c-Oxidase in eine vollständige mitochondriale DNA integriert. Die Transkription dieses Gens in der mitochondrialen Matrix konnte nachgewiesen werden, jedoch kein Translationsprodukt. Diese Arbeit hat gezeigt, daß zum Import stark hydrophober Proteine in Mitochondrien noch entscheidende Fragen offen sind. Mit BR ist erstmals die Transkription eines Fremdgens kodierend für ein Membranprotein in Hefemitochondrien gelungen.

Experiments for the *in vivo* and *in vitro* expression of the membrane protein bacteriorhodopsin in mitochondria

The light-driven proton pump bacteriorhodopsin (bR) from *Halobacterium salinarum* was fused to the mitochondrial signal sequence of *Neurospora crassa*'s ATPase subunit 9 and parts of bR were fused to the mitochondrial signal sequence of the subunit IV of the cytochrome-c-oxidase of *Saccharomyces cerevisiae*. During expression of these gene-constructs in the cytoplasm of *Schizosaccharomyces pombe* only a small fraction of the fusion protein was imported into the mitochondria. The same constructs were tested for import into isolated mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. This *in vitro* assay gave no evidence for an import of these proteins into the mitochondria. For the expression of bR in the mitochondrial matrix of *Saccharomyces cerevisiae* a gene for bR was adapted to the genetic code of these mitochondria. The gene was brought into the mitochondria via biolistic transformation and integrated into a complete mitochondrial DNA at the gene location for the subunit III of the cytochrome-c-oxidase, using homologous recombination. The transcription of the gene for bR in the mitochondrial matrix has been shown, but no translation product was detected. In summary, these experiments demonstrate that important problems about the import of very hydrophobic proteins into mitochondria are still unsolved. Transcription of bR in the matrix of yeast mitochondria is the first demonstrated transcription of a heterologous gene encoding a membrane protein in mitochondria.

Untersuchungen zur *in vivo* und *in vitro* Expression des Membranproteins Bacteriorhodopsin in Mitochondrien

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Mitochondrium.....	1
1.1.1	Die Genexpression in Mitochondrien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2
1.1.2	Der Import von Proteinen in Mitochondrien	3
1.1.3	Chaperone	6
1.2	<i>Halobacterium salinarum</i> und Bacteriorhodopsin	9
1.3	Bacteriorhodopsin in Mitochondrien: Stand der Forschung	11
1.4	Aufgabenstellung.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN	13
2.1	Geräte.....	13
2.2	Chemikalien, Enzyme, Standards.....	14
2.3	Puffer, Lösungen und Medien	16
2.3.1	Puffer und Lösungen.....	16
2.3.2	Medien	18
2.4	Organismen und Wachstumsbedingungen	19
2.4.1	Organismen.....	19
2.4.2	Kulturbedingungen.....	21
2.4.2.1	<i>Escherichia coli</i>	21
2.4.2.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> und <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	21
2.4.2.3	Anzucht von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mit Bacteriorhodopsin-Genkonstrukten	21
2.4.3	Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen	22
2.4.4	Stammhaltung.....	22
2.5	Plasmide	23
2.6	Oligonucleotide.....	23
2.7	Arbeiten mit DNA	24
2.7.1	Standardmethoden	24
2.7.2	Gesamt-DNA-Präparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	24

2.7.3	Agarose-Gelelektrophorese	25
2.7.4	Konzentrieren von DNA	25
2.7.5	Reinigung von DNA	25
2.7.6	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	26
2.7.6.1	Reaktionsbedingungen	26
2.7.6.2	Reinigung von PCR-Produkten	27
2.7.6.3	Klonierung von PCR-Produkten	27
2.7.6.4	Ortsspezifische Mutagenese	27
2.7.7	DNA-Sequenzierung (Cycle Sequencing)	27
2.7.8	DNA/DNA-Hybridisierung zum Nachweis von DNA (Southernblotanalyse)	28
2.7.8.1	Transfer von DNA auf Nylonfilter (Southernblot)	28
2.7.8.2	DNA/DNA-Hybridisierung	28
2.7.9	Transformation von <i>Escherichia coli</i> mit Plasmid-DNA	29
2.7.10	Transformation von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	29
2.7.11	Biolistische Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.7.12	Replikaplattierung	30
2.7.13	Paarung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	30
2.8	Arbeiten mit RNA	31
2.8.1	<i>in vitro</i> Transkription	31
2.8.2	Isolierung von Gesamt-RNA	31
2.8.3	RNA/DNA-Hybridisierung zum Nachweis von RNA (Northernblotanalyse)	32
2.8.3.1	Denaturierende RNA-Gelelektrophorese	32
2.8.3.2	Transfer von RNA auf Nylonfilter (Northernblot)	32
2.8.3.3	RNA/DNA-Hybridisierung	33
2.9	Arbeiten mit Proteinen	33
2.9.1	<i>in vitro</i> Translation	33
2.9.2	Herstellen von Gesamtzellextrakten im analytischen Maßstab aus <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	33
2.9.3	Herstellen von Gesamtzellextrakten im analytischen Maßstab aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	34
2.9.4	Herstellen von Extrakten überexprimierter Proteine aus <i>Escherichia coli</i>	34
2.9.5	Solubilisierung und Denaturierung von Bacterioopsin	34
2.9.6	<i>in vitro</i> Testsystem zum Nachweis einer Wechselwirkung von Bacterioopsin mit dem Chaperonin GroEL	35
2.9.7	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	35
2.9.7.1	Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen	36
2.9.8	Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Westernblotanalyse)	37
2.9.8.1	Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen	37
2.9.8.2	Immunochemische Detektion von auf Membranen transferiertem Bacterioopsin	37
2.9.9	Antikörperaufreinigung über Westernblot	38
2.9.10	Autoradiographie	38

2.10	Arbeiten mit Mitochondrien	39
2.10.1	Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen	39
2.10.2	Proteinbestimmung	40
2.10.3	<i>in vitro</i> Import von Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien.....	40
3	ERGEBNISSE.....	42
3.1	<i>in vivo</i> Import von Bacterioopsin in die innere Mitochondrienmembran von <i>Schizosaccharomyces pombe</i> mit der Signalsequenz SU9	42
3.1.1	Herstellen des Genkonstrukts bestehend aus SU9-Präsequenz und bop-Gen	43
3.1.2	Expression von Genkonstrukten aus BO-Gen mit mitochondrialen Präsequenzen und <i>in vivo</i> Regeneration von BR	44
3.2	<i>in vivo</i> Import von BO in Teilstücken.....	45
3.2.1	Herstellen der Genkonstrukte aus BO-Teilstücken mit coxIV-Signalsequenz.....	46
3.2.2	Expression von coxIVAB und coxIVCG und <i>in vivo</i> Regeneration von BR.....	47
3.3	<i>in vitro</i> Import von Bacterioopsin in die innere Mitochondrienmembran von <i>Schizosaccharomyces pombe</i>.....	49
3.3.1	<i>in vitro</i> Transkription.....	50
3.3.2	<i>in vitro</i> Translation.....	53
3.3.3	<i>in vitro</i> Import in Mitochondrien.....	55
3.4	Wechselwirkung von Bacterioopsin mit dem Chaperonin GroEL.....	61
3.4.1	Bacteriorhodopsin/Bacterioopsin zur Untersuchung einer Wechselwirkung mit GroEL.....	63
3.4.2	Solubilisierung und Denaturierung von BO aus Purpurmembranen und als Fusion mit GST	64
3.4.3	Wechselwirkung von solubilisiertem BO aus Purpurmembran und GST-BOS-Fusionsprotein mit GroEL.....	65
3.5	Expression von BO in Mitochondrien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> durch Biolistische Transformation	69
3.5.1	Anpassung des BO-Gens an den genetischen Code der mitochondrialen DNA von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	69
3.5.2	Biolistische Transformation.....	71
3.5.3	Herstellen eines <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Stammes, der BO in den Mitochondrien exprimiert	72
3.5.4	Lokalisation von mtbos in Gesamt-DNA Präparationen von EF11.....	73
3.5.5	Transkription von mtbos in Mitochondrien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	78
3.5.6	Translation von BO in Mitochondrien von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	79

4	DISKUSSION	80
4.1	Import von Bacterioopsin in Mitochondrien	80
4.2	Expression von Bacterioopsin in Mitochondrien	85
5	ZUSAMMENFASSUNG	89
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	91
7	ANHANG	97
7.1	Das mthos-Gen.....	97
7.2	Abkürzungen	99

1 EINLEITUNG

In allen drei Domänen des Lebens, Eukaryonten, Eubakterien und Archaea, existieren Mechanismen zur Energiegewinnung durch Nutzung des Sonnenlichts. In den chlorophyllhaltigen Pigmenten der phototrophen Eukaryonten und Eubakterien erfolgt nach Lichtanregung eine Ladungstrennung im Chromophor. Die dabei freigesetzten Elektronen durchlaufen ein komplexes Redoxsystem. Dieser Elektronenfluß erzeugt einen transmembranen Protonengradienten, der zum Antrieb der Synthese von Adenosintriphosphat (ATP), dem universellen Überträger chemischer Energie in der Zelle, genutzt wird (STRYER, 1991). In der Gruppe der Archaeobakterien, bei *Halobacterium salinarum*, wird die Lichtenergie durch die Protonenpumpe Bacteriorhodopsin in einen Protonengradienten umgewandelt.

Chemotrophe Organismen gewinnen freie Energie durch die Oxidation von Nährstoffen. Die freigesetzten Elektronen durchlaufen wie bei der Photosynthese ein komplexes Redoxsystem. Auch hier wird ein transmembraner Protonengradient zum Antrieb der ATP-Synthese erzeugt. In Eukaryonten findet dieser Prozeß, der als Atmung bezeichnet wird, in den Mitochondrien statt.

1.1 Das Mitochondrium

Die Größe von Mitochondrien variiert von 0,3-1,0 µm Breite und 1 µm Länge. In sich teilenden Hefezellen kann ihre Länge bis zu 10 µm betragen. Sie sind keine starren Gebilde, vielmehr verändern sich Form und Lage ständig (BEREITER-HAHN, 1990). Ihr eiförmiges Erscheinungsbild, wie man es aus elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Ultradünnschnitten der Zelle kennt, täuscht. In Hefezellen durchzieht die mitochondriale Struktur gleich einem Netzwerk die gesamte Zelle (LISOWSKY, MICHAELIS, 1986).

Mitochondrien sind aus zwei Membranen aufgebaut. Die Innenmembran umschließt den Matrixraum. Zwischen Innenmembran und Außenmembran befindet sich der Intermembranraum.

Der Matrixraum ist der Ort zahlreicher Stoffwechselreaktionen, wie der Aminosäure-Biosynthese, des Citronensäurezyklus und der Oxidation der Fettsäuren. Er enthält auch das mitochondriale Genom und ist der Ort der mitochondrialen Proteinbiosynthese. Die Innenmembran bildet zur Vergrößerung der Oberfläche zahlreiche Einstülpungen in den Matrixraum. In ihr befinden sich die Komplexe der Atmungskette und die mitochondriale ATPase, sowie zahlreiche Transportproteine. Innen- und Außenmembran sind an Membrankontaktstellen, die vermutlich die Orte der Translokation von Proteinen in das Mitochondrium sind, angenähert (GLICK, SCHATZ, 1991). Die Außenmembran ist für Moleküle mit einem Molekulargewicht unter 5 kD aufgrund ihres Poringehalts frei passierbar. Weiterhin enthält sie spezielle Transportproteine und einige Enzyme des Lipidstoffwechsels.

1.1.1 Die Genexpression in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Untersuchung der mitochondrialen Genetik eignet sich die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) besonders gut. Wohingegen in fast allen anderen höheren Organismen Mutationen im mitochondrialen Genom zum Zelltod führen, ist *S. cerevisiae* auch nach vollständigem Verlust mitochondrialer DNA noch lebensfähig. Dies ist in der Befähigung dieser Hefe zur Fermentation begründet.

Insgesamt enthalten Mitochondrien etwa 700 verschiedene Proteine, von denen die meisten nukleär codiert sind (HARTL, NEUPERT, 1990). Nur sieben Komponenten der Atmungskette und für die mitochondriale Genexpression essentielle Faktoren sind auf der mitochondrialen DNA codiert.

Die mitochondriale DNA aus *S. cerevisiae* liegt zirkulär in 50 Kopien pro haploider Zelle vor und hat je nach Stamm eine Größe von 75 bis 80 kb. Sie codiert sieben Proteinkomponenten der Atmungskettenenzyme: die Cytochrom-c-Oxidase Untereinheiten I, II und III, das Apocytochrom b und die Untereinheiten 6, 8 und 9 des F_0 -Teils der mitochondrialen ATPase. Bei diesen Proteinen handelt es sich um sehr hydrophobe Proteine (MC MULLIN, FOX, 1993). Außerdem codiert sie noch für eine Reihe von Proteinen und RNA-Molekülen, die für die mitochondriale Genexpression benötigt werden (Abb. 1).

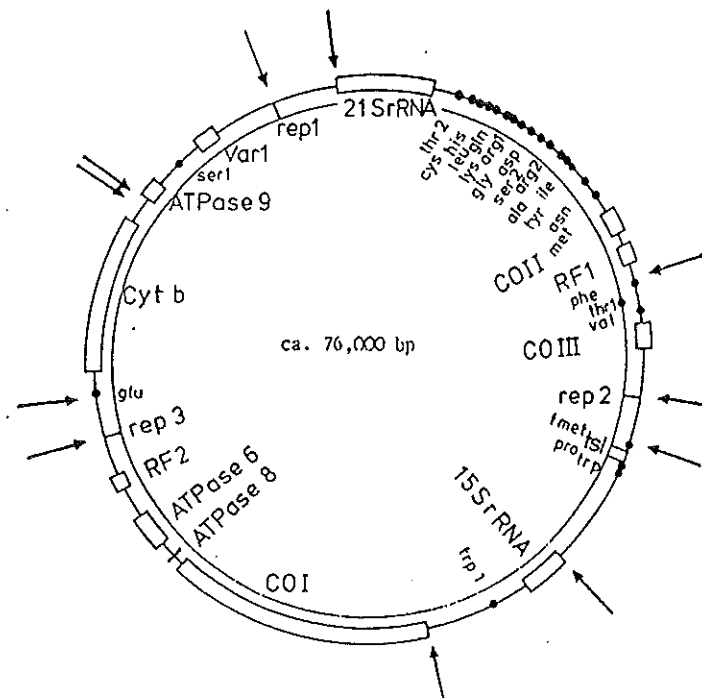


Abb. 1: Genkarte der mitochondrialen DNA von *S. cerevisiae*. Die Pfeile markieren die Initiationsstellen der Transkription - die Promotoren. COI, COII, COIII: die drei größten Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase; Cytb: Apocytochrom b; ATPase 6, 8, 9: die drei entsprechenden Untereinheiten der mitochondrialen ATPase; Var 1: ein Polypeptid, das mit der kleinen ribosomalen Untereinheit der Mitochondrien assoziiert ist; RF1 und RF2: offene Leseraster, deren Genprodukte noch unbekannt sind; tsl: tRNA-Synthese Locus; rep 1,2,3: Replikationsstartstellen; schwarze Punkte stellen die tRNA-Gene dar. (LISOWSKY, MICHAELIS, 1986)

Viele Daten über die mitochondriale Genexpression wurden erst zugänglich, nachdem es möglich war, über Transformation von Mitochondrien gezielte Eingriffe in das mitochondriale Genom vorzunehmen.

Bei der nachfolgenden Beschreibung der mitochondrialen Genexpression in *S. cerevisiae* sind nur einige Punkte angesprochen. Genauere Beschreibungen findet man bei COSTANZO, FOX (1990) und DIECKMANN, STAPLES (1994).

Die mitochondriale Transkription in *S. cerevisiae* verläuft in zwölf Transkriptionseinheiten (DIECKMANN, STAPLES, 1994). Aus den Primärtranskripten werden durch Prozessierungsereignisse die reifen RNA-Moleküle, wobei am 5'-Ende der mRNA-Moleküle ein einige 100 bp-langer untranslatierter Bereich resultiert.

Die Regulation der Transkription erfolgt über äußere Einflüsse. Der Gehalt der meisten mitochondrialen mRNAs ist unter Glukose dereprimierten Bedingungen drei- bis viermal höher als unter Glukose reprimierten Bedingungen. Dabei wird die Menge der einzelnen RNAs unabhängig voneinander geregelt. So bleibt der Gehalt an COXIII mRNA im Verhältnis zur gesamten RNA-Menge bei unterschiedlichen Glukosemengen gleich. Der Einfluß von Sauerstoff auf die Transkription ist noch wenig untersucht. Es wurde aber festgestellt, daß die Menge der COXIII mRNA in anaerob wachsenden Zellen um den Faktor 2-3 reduziert ist.

Bei der Translation bilden nukleär kodierte Translationsfaktoren mit dem 5'-untranslatierten Bereich der mRNA-Moleküle einen Komplex, der sowohl mit den mitochondrialen Ribosomen als auch mit der mitochondrialen Innenmembran assoziiert ist. Die Assoziation des Translationskomplexes mit der inneren Mitochondrienmembran soll eine Rolle bei der korrekten Lokalisation und Orientierung der Proteine in der inneren Mitochondrienmembran spielen (persönliche Kommunikation mit T.D. Fox und M.C. Costanzo).

Ebenso wie die Transkription wird auch die Translation über Umgebungsfaktoren wie Sauerstoffgehalt des Mediums und die Art der Kohlenstoffquelle reguliert. Dabei spielen nukleär codierte Translationsfaktoren eine entscheidende Rolle. So wird die Translation der coxIII mRNA über die Menge von Pet494 reguliert. Die Expression dieses Translationsfaktors ist unter anaeroben Wachstumsbedingungen und in Medium mit Galaktose, Glycerin oder Ethanol erhöht (BROWN et al., 1994; COSTANZO, FOX, 1990).

1.1.2 Der Import von Proteinen in Mitochondrien

Die nicht vom mitochondrialen Genom codierten mitochondrialen Proteine sind nukleär codiert. Sie werden als Vorläuferproteine mit Signalsequenzen im Cytoplasma der Zelle synthetisiert und posttranslational in die Mitochondrien importiert. Es wird allerdings auch ein cotranslationaler Import diskutiert, weil an Mitochondrien assoziierte Ribosomen gefunden wurden (KELLEMS et al., 1975). In ihrer neueren Arbeit von 1995 diskutieren HÖNLINGER et al., daß keine laufende Proteinsynthese zum Proteinimport in Mitochondrien nötig ist, ohne jedoch die Möglichkeit des cotranslationalen Imports auszuschließen.

Die Präproteine werden von zwei Multienzymkomplexen in der Außenmembran (TOM-Proteine) und der Innenmembran (TIM-Proteine) erkannt, durch die Membranen transportiert und in die einzelnen mitochondrialen Kompartimente dirigiert. An diesem Prozeß sind cytosolische und mitochondriale Chaperone und Chaperonine, die Fehlfaltungen der Proteine verhindern, beteiligt.

Abbildung 2 zeigt ein Bild der mitochondrialen Import-Maschinerie, bei dem die 1996 von PFANNER et al. eingeführte einheitliche Nomenklatur berücksichtigt ist.

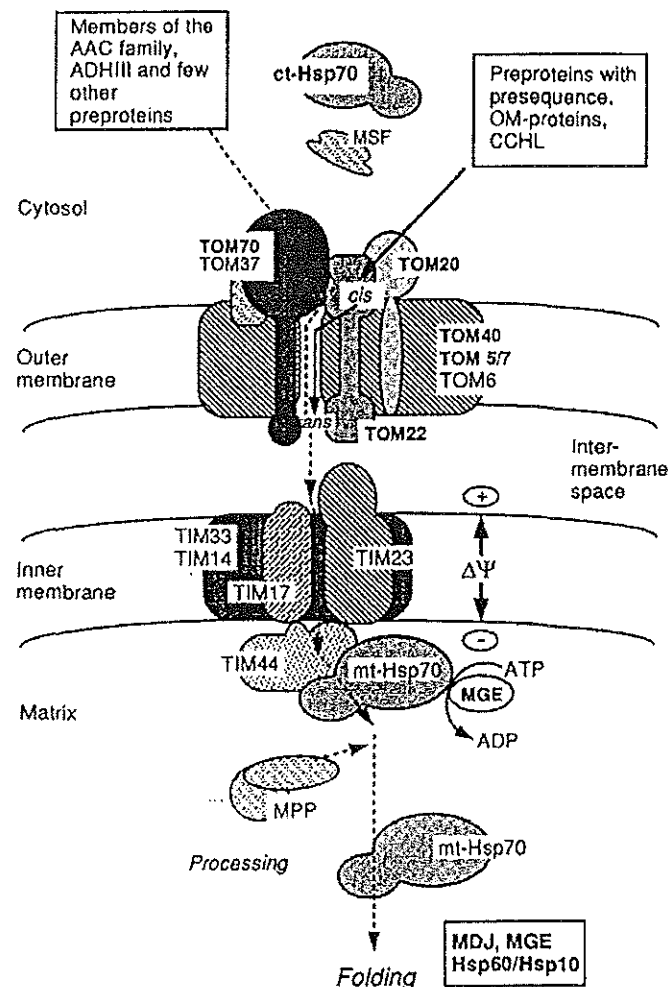


Abb. 2: Die mitochondriale Importmaschinerie (BAUER, NEUPERT, 1996)

Es ist der typische Importweg eines Präproteins in die Matrix gezeigt. Abkürzungen: cpn = Chaperonin, CyP = Cyclophilin, ct = cytoplasmatisch, hsp = Hitzeschock-Protein, MDJ = mitochondriales DnaJ, MGE = mitochondriales GrpE, MPP = mitochondriale Prozessierungs-Peptidase, MSF = mitochondrialer Import-Stimulations-Faktor, mt = mitochondrial, OM = äußere mitochondriale Membran, Tim = Protein der mitochondrialen Innenmembran, Tom = Protein der mitochondrialen Außenmembran

Die Proteine der äußeren mitochondrialen Membran werden im Cytosol ohne Signalsequenz synthetisiert. Alle anderen Proteine bis auf wenige Ausnahmen (Cytochrom c, ADP/ATP-Translokator) tragen Signalsequenzen. Diese bis zu 70 Aminosäuren langen N-terminalen Sequenzen werden in ein oder zwei proteolytischen Schritten im Mitochondrium abgespalten. Sie bilden eine α -Helix mit amphiphilem Charakter (ROISE, SCHATZ, 1988). Dieses Sekundärstrukturmotiv scheint das alleinige Importsignal darzustellen. Fremdproteine mit fusionierten Präsequenzen mitochondrialer Proteine werden in Mitochondrien importiert, wenn die Präsequenz oberflächenexponiert ist (HURT, VAN LOON, 1986; HURT et al., 1984; PFANNER et al., 1987; DOUGLAS et al., 1984).

Da die Vorläuferproteine posttranslational importiert werden und in ihrer nativen Konformation die mitochondrialen Membranen nicht passieren können (EILERS et al., 1988), muß ihre vorzeitige Faltung im Cytosol verhindert werden. Diese Aufgabe wird zum einen von cytosolischen Chaperonen (z. B. Hsp70) und zum anderen von Präsequenz-bindenden Faktoren (z. B. PBF oder MSF) erfüllt (MURAKAMI, MORI, 1990; MURAKAMI et al.; 1988, HACHIYA et al.; 1994).

Die Erkennung der Vorstufenproteine und ihre Translokation über die Außenmembran geschieht über die Translokase der äußeren mitochondrialen Membran, den Tom-Komplex. Er setzt sich nach derzeitigem Kenntnisstand aus 10 verschiedenen Proteinen zusammen. Der Rezeptorbereich besteht aus vier Proteinen (Tom70, Tom37, Tom22 und Tom20), wobei Tom22 und Tom20 an der Bindung der N-terminalen Präsequenz beteiligt sind. Die spezifische Erkennung erfolgt vermutlich über eine elektrostatische Wechselwirkung zwischen der negativ geladenen cytosolischen Domäne von Tom22 und den positiven Ladungen der Präsequenz (LILL, NEUPERT, 1995 und 1996).

Nach Bindung an die Rezeptoren werden die Vorstufenproteine in die generelle Insertionspore (GIP) weitergeleitet. Die vorzeitige Faltung der Vorstufenproteine wird durch die Bindung von Chaperonen und MSF verhindert. Zum Lösen der Bindung zwischen Chaperonen, MSF und entfaltetem Vorläuferprotein wird Energie in Form von ATP benötigt. Erst dann kann das ungefaltete Vorstufenprotein mit Hilfe von Tom20 und Tom22 in die GIP geleitet werden. Unspezifische Wechselwirkungen zwischen den Wänden der GIP und der Präsequenz könnten diesen Schritt energetisch favorisieren. Im letzten Schritt durch die äußere Mitochondrienmembran assoziiert die Präsequenz mit einer dem Intermembranraum zugewandten Bindestelle des Tom-Komplex (LILL, NEUPERT, 1996).

Vorstufenproteine konnten während des Imports als Intermediate erfaßt werden. In dieser Stufe überspannen sie sowohl die innere als auch die äußere Membran. Daraus wurde auf das Vorhandensein von transienten Translokations-Kontaktstellen geschlossen. An diesen Stellen treten die beiden mitochondrialen Membranen in engeren Kontakt, so daß Tom- und Tim-Komplex sich gegenüber stehen (PFANNER et al., 1994). Wie der Übergang der Vorstufenproteine zwischen Tim- und Tom-Komplex verläuft, ist bisher noch unbekannt (LILL, NEUPERT, 1995; MILLAR, SHORE, 1997).

Der Import über die Innenmembran wird durch das elektrische Membranpotential $\Delta\psi$ angetrieben. Vom Importkomplex der inneren Membran sind bisher nur die beiden Membranproteine Tim17 und Tim23 und das periphere, der Matrix zugewandte Protein Tim44 identifiziert worden (PFANNER et al., 1994). Über Bindung an Tim44 gelangt das Vorläuferprotein in den Matrixraum, wo es von mitochondrialem (mt) Hsp70 gebunden wird. Dadurch wird das Vorläuferprotein vor frühzeitiger Faltung bewahrt. Eine zusätzliche Funktion wird mtHsp70 bei der weiteren Translokation des Vorläuferproteins zugeschrieben (LILL, NEUPERT, 1995).

Schon während des Imports wird die Präsequenz durch die matrixständige Prozessierungs-peptidase MPP abgespalten. Zur Ablösung des Proteins von Hsp70 werden die Komponenten MDJ und MGE benötigt. Matrixproteine erhalten dann ihre korrekte Faltung mit Hilfe von Hsp60 und Hsp10, den mitochondrialen GroEL/GroES-Homologen (1.1.3).

Vorläufer von Proteinen des Intermembranraums oder der Innenmembran enthalten eine zweiteilige N-terminale Signalsequenz. Laut dem Modell der „konservativen Sortierung“ wird beim Transport des Vorläufers in die Matrix der erste Teil der Signalsequenz abgespalten. Der zweite Teil dient als Exportsignal für den Transport in die innere Membran oder den Intermembranraum.

Alternativ wird das „Stop-Transfer-Modell“ diskutiert, bei dem der zweite Teil der Präsequenz als Stop-Signal der weiteren Translokation genutzt wird. Er wird von Proteasen des Intermembranraums abgespalten (GLICK et al., 1992; LILL, NEUPERT, 1995).

Den oben beschriebenen Importweg beschreiten nicht alle Proteine. Einige Proteine benutzen alternative Wege, um an ihren Bestimmungsort im Mitochondrium zu gelangen. Beispiele dafür sind der ADP/ATP-Translokator (PFANNER, NEUPERT, 1987) oder Cytochrom c (NICHOLSON et al., 1987).

Bei der korrekten Faltung der Proteine und bei der Assemblierung der importierten Proteine mit den mitochondrial codierten Proteinen zu den Komplexen der Atmungskette sind Chaperone beteiligt.

1.1.3 Chaperone

Die Faltung vieler neu synthetisierter Proteine in allen Zellen und Zellkompartimenten hängt von einem Set konservierter Proteine, den sogenannten Chaperonen, ab. Sie verhindern die Fehlfaltung von Proteinen unter normalen und Stress-Bedingungen. Durch Bindung an andere Proteine stabilisieren Chaperone diese in einem Zustand, in dem sie ansonsten instabil wären. Durch kontrolliertes Binden und Ablösen fördern Chaperone *in vivo* nicht nur die korrekte Faltung eines Polypeptids, sondern auch die Assemblierung von Proteinkomplexen, den Transport in ein zelluläres Subkompartiment und präsentieren falsch gefaltete Proteine der zellulären Abbaumaschinerie (HARTL, 1996).

Die meisten Erkenntnisse stammen aus Untersuchungen der Chaperone aus *Escherichia coli* (*E. coli*). Die wichtigsten Klassen der Chaperone aus *E. coli* sind das DnaK-System (Hsp70 in *E. coli*) und das GroEL-System.

Das Hsp70-Chaperon System:

Die Bezeichnung Hsp, „heat shock protein“, stammt von der Beobachtung, daß einige dieser Proteine Hitze-induzierbar sind. Die Assoziation mit Proteinen unter Normalbedingungen zeigt, daß Hsp70-Chaperone auch dann eine Rolle bei der Faltung neu synthetisierter Polypeptide spielen (HARTL, 1996).

Bei Hsp70-Chaperonen handelt sich um hoch konservierte ATPasen mit einem relativen Molekulargewicht von etwa 70 kD. Vertreter dieser Klasse sind sowohl in prokaryotischen als auch eukaryotischen Zellen zu finden. Ihre Funktion ist die Bindung und die Freigabe hydrophober Abschnitte ungefalteter Polypeptide in einem ATP-hydrolysierenden Reaktionszyklus. Sie sind auch an Translokationsprozessen von Polypeptiden durch Membranen beteiligt (vergleiche Kapitel 1.1.2 zum Transport über die mitochondrialen Membranen). Beim Binden und Lösen von Proteinen sind weitere Helferproteine, zum Beispiel die Co-Chaperone DnaJ oder Hsp40, beteiligt.

Der Hsp70 Reaktionszyklus ist am besten untersucht für das System aus dem Hsp70-Chaperon DnaK und seinen Co-Chaperonen DnaJ und GrpE aus *E. coli* (Abb. 3). Das Chaperon DnaJ interagiert mit der ungefalteten Polypeptidkette und leitet diese zu DnaK, das ATP gebunden hat. DnaJ interagiert mit dem Komplex aus DnaK, ATP und dem Polypeptid. DnaK hydrolysiert ATP, wobei der gesamte Komplex stabilisiert wird. Nach Bindung von GrpE dissoziiert der Komplex aus DnaK, ADP, DnaJ und Substrat-Polypeptid. Neues ATP wird an DnaK gebunden, das somit für einen neuen Zyklus

zur Verfügung steht. Das Polypeptid wird je nach Zustand erneut in einen Zyklus aus Bindung und Freigabe von DnaK geführt, faltet sich spontan oder wird an ein anderes Chaperonsystem wie zum Beispiel die Chaperonine weitergegeben.

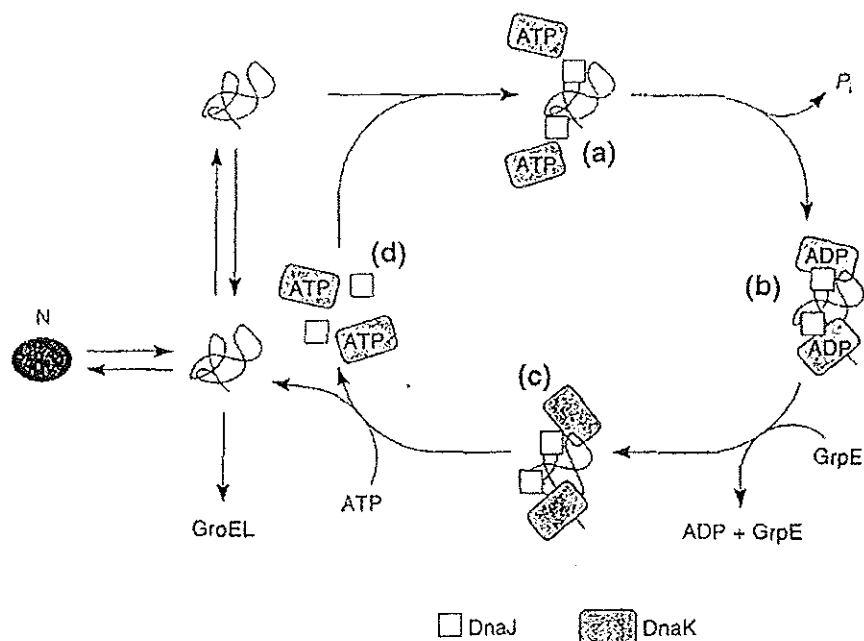


Abb. 3: Modell des Hsp70 Reaktionszyklus am Beispiel von DnaK/DnaJ/GroE (HARTL et al., 1994).
N = Polypeptid mit nativer Faltung

Das Chaperonin-System:

Chaperonine haben eine essentielle Funktion bei der ATP-abhängigen Faltung von Proteinen. Es gibt zwei Untergruppen von Chaperoninen: die Mitglieder der GroEL-artigen Chaperone (Hsp60) und der TRiC-Familie (TCP-1 Ring Komplex). Die GroEL-artigen Chaperonine kommen in Eubakterien, Mitochondrien und Chloroplasten vor. Sie bestehen aus zwei gestapelten Ringen, die ihrerseits aus sieben Untereinheiten aufgebaut sind. Sie kooperieren mit GroES in *E. coli*. GroES besteht aus einem einzelnen heptameren Ring aus etwa 10 kD Untereinheiten. TRiC Chaperonine kommen in Archaeobakterien und im eukaryotischen Cytosol vor. Sie sind aus Doppelringen aus 8 oder 9 Untereinheiten aufgebaut und scheinen von einem GroES ähnlichen Faktor unabhängig zu sein. Funktionsuntersuchungen wurden überwiegend an GroEL/GroES durchgeführt. Die Strukturähnlichkeit von TRiC zu GroEL/GroES legt ähnliche Reaktionsschemata für TRiC nahe.

Gemäß röntgenkristallographischer Daten ist GroEL ein zylindrischer Komplex mit einem zentralen Hohlraum, der Proteine von 15 bis 60 kD Größe aufnehmen kann. GroES sitzt gleich einer Kappe auf der Öffnung von GroEL (BRAIG et al., 1994; BOISVERT et al., 1996; LORIMER, TODD, 1996; MAYHEW, HARTL, 1996).

Der Ausgangsstatus zur Polypeptidbindung ist der asymmetrische Komplex aus GroEL, GroES und ADP. Das Polypeptid und ATP werden im GroES-freien Ring über hydrophobe Interaktionen gebunden. Die Hydrolyse des ATP bewirkt die Dissoziation von GroES und ADP vom Substratpolypeptid-freien GroEL-Ring. Die erneute Bindung von GroES und ATP am mit dem

Substratpolypeptid besetzten Ring erlaubt die Faltung des Polypeptids. ATP-Hydrolyse öffnet den GroEL/GroES-Käfig. Jetzt verlassen gefaltete Proteine GroEL, während ungefaltete Proteine erneut gebunden werden (Abb. 4).

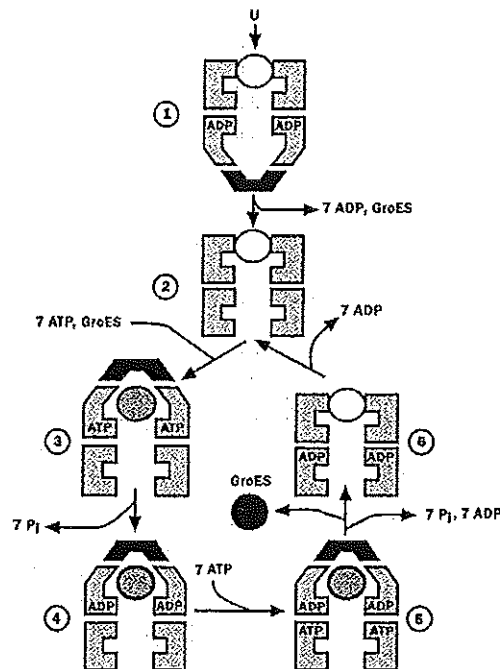


Abb. 4: Schematischer Überblick über den GroEL/GroES-Reaktionszyklus (MAYHEW et al., 1996)

Zelluläre Protein-Faltungs-Wege:

FRYDMAN und HARTL (1996) konnten zeigen, daß chemisch denaturierte Polypeptide und neu synthetisierte Polypeptide unterschiedlich mit Chaperonen interagieren. Wohingegen chemisch denaturierte Polypeptide aus dem Chaperonin immer wieder in die Umgebungslösung abgegeben werden und dort falten, werden neu synthetisierte Polypeptide erst aus Chaperonkomplexen entlassen, wenn sie ihre korrekte Faltung erlangt haben. Oligomere Enzyme und Polypeptide sollen zwischen verschiedenen Chaperonsystemen und dem Cytosol kreisen und dabei zum aktiven Komplex assemblieren.

ELLIS und HARTL (1996) kalkulieren, daß die Zahl der in einer Zelle von *E. coli* vorhandenen GroEL-Moleküle ausreicht, um die Faltung von 30 % der löslichen Proteine zu unterstützen. Dabei diskutieren sie jedoch auch, daß für die Faltung aller Proteine in der Zelle Chaperone nötig sind, weil die hohe Proteindichte in der Zelle zwangsläufig zu Aggregationen führen müßte. LORIMER (1996) kommt rechnerisch auf etwa dieselben Zahlen wie ELLIS und HARTL. Er schließt jedoch aus dem Mangel an GroEL in der Zelle, daß unter Streß-freien Bedingungen 95 % aller Proteine unabhängig von Chaperonen falten.

Wechselwirkungen von Chaperonen mit Membranproteinen sind bislang wenig untersucht. HIGH und LAIRD (1997) fassen zusammen, daß eine Reihe von Chaperonen des endoplasmatischen

Retikulums mit lumenalen Teilen von Membranproteinen interagieren. Es gibt aber auch erste Hinweise auf sehr spezifische Chaperone für die Faltung einzelner Membranproteine und für den Zusammenbau von einzelnen Membranproteinkomplexen (persönliche Kommunikation mit H. Plücken, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf).

1.2 *Halobacterium salinarum* und Bacteriorhodopsin

Die zur Gruppe der Archaeobakterien gehörigen Arten der Gattung *Halobacterium* haben sich an ein Leben in hochkonzentrierten Salzlösungen, wie sie in Salzseen heißer Regionen auftreten, angepaßt. Sie wachsen in 3,5 bis 5,0 M NaCl-Lösung optimal. Dies wird dadurch ermöglicht, daß die Kalium-Konzentration im Zellinneren ebenso hoch ist wie die Natrium-Konzentration des Mediums.

Die stäbchenförmigen, beweglichen Zellen von *H. salinarum* (früher *H. halobium*) sind zum Schutz vor der extremen Sonneneinstrahlung ihrer Lebensräume durch Carotinoide rot, orange oder gelb gefärbt. Wenn die Atmung durch Sauerstoffmangel zum Erliegen kommt, synthetisieren die Zellen das Retinal-Protein Bacteriorhodopsin (BR), um Licht als alternative Energiequelle nutzen zu können. Das Chromoprotein lagert sich in der Zellmembran zu dunkelroten zweidimensional kristallinen Bereichen, den Purpurmembranen, zusammen (SCHLEGEL, 1992; STOECKENIUS, 1985). Es wird als Vorläuferprotein gebildet und in die Zellmembran eingelagert. Nach Abspaltung von 13 Aminosäuren am N-Terminus und einem Aspartat am C-Terminus verbleiben die 248 Aminosäuren des reifen Proteins. Das Protein ohne Chromophor wird als Bacterioopsin (BO) bezeichnet. All-*trans*-Retinal ist als protonierte Schiff'sche Base an Lys216 gebunden (KHORANA, 1988). Die Polypeptidkette besteht aus sieben α -Helices, die die Membran durchspannen. Sie liegt derart in der Zellmembran, daß der N-Terminus außen liegt, und der C-Terminus im Zellinneren lokalisiert ist (STOECKENIUS, 1985; KHORANA, 1988) (Abb. 5).

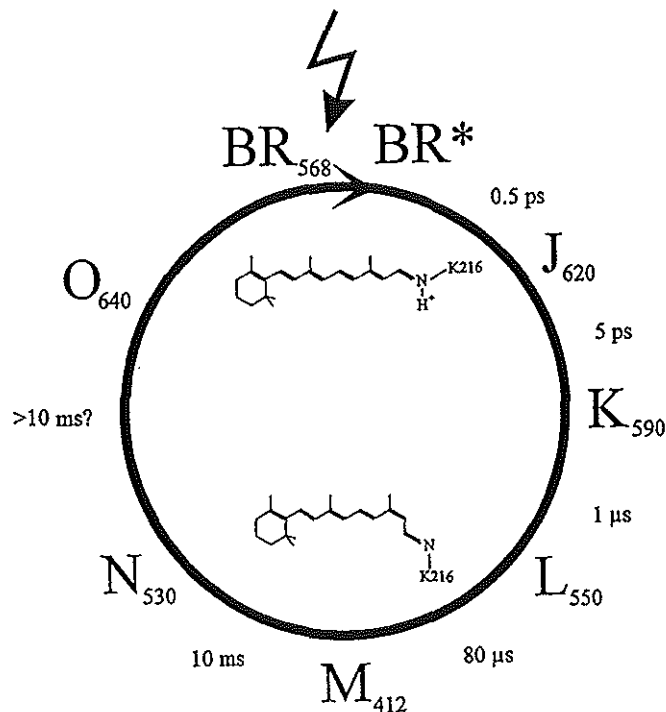


Abb. 6: Ein Modell für den Photozyklus von BR. Die Zwischenzustände werden mit Großbuchstaben abgekürzt. Die Indices geben die Absorptionsmaxima in nm wieder.

Im ersten Schritt des Photozyklus wird durch die Absorption eines Photons die Isomerisierung des Retinals von der *all-trans* zur *13-cis* Konfiguration verursacht. Eine Serie von Zwischenereignissen schließt sich an. Darunter fallen die Deprotonierung der Schiff'schen Base und der Protonentransfer zu Asp85 im L-M Übergang. Ein anderes Proton wird freigesetzt, die Schiff'sche Base wird im M-N Übergang von Asp96 reprotoniert, und ein Proton wird im N-O Übergang von der cytoplasmatischen Seite aufgenommen. Gleichzeitig wird die Reisoomerisierung des Retinals beobachtet. Die Deprotonierung von Asp85 mit der Rückkehr in den Grundzustand schließt den Photozyklus (OESTERHELT, 1989; ZSCHERP, 1997). Mit Hilfe der von BR absorbierten Lichtenergie wird also ein Protonengradient über die Zellmembran aufgebaut, so daß das Außenmedium angesäuert wird. Der Gradient wird zur ATP-Synthese genutzt (SCHLEGEL, 1992).

1.3 Bacteriorhodopsin in Mitochondrien: Stand der Forschung

Erste Versuche zur heterologen Expression von Bacteriorhodopsin (BR) wurden in *E. coli* durchgeführt (MC COY, KHORANA, 1983). Das exprimierte BR war aber auch nach Gabe von *all-trans*-Retinal in den Zellen nicht funktionsfähig. Nach Injektion von *in vitro* hergestellter mRNA in Oozyten von *Xenopus laevis* gelang unter Zusatz von *all-trans*-Retinal die transiente Expression von funktionsfähigem BR (NAGEL et al., 1995). Die Hefe *S. pombe* ist der einzige Organismus, in dem dauerhaft die funktionelle heterologe Expression von Bacteriorhodopsin (BR) in der Cytoplasmamembran bei Zusatz von *all-trans*-Retinal gelang (HILDEBRANDT et al., 1989 und 1991). Versuche zur Expression in der Cytoplasmamembran von *S. cerevisiae* führten zwar zum BO (LANG-HINRICHS

et al., 1994). Allerdings färbten sich die Zellen nach Gabe von all-*trans*-Retinal nicht rot. Das heißt, es konnte kein aktives BR hergestellt werden.

HOFFMANN et al. (1994) verknüpften BR mit einer N-terminalen Signalsequenz (Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit IV) für den Import in Mitochondrien von *S. pombe*. Ein Teil des exprimierten BR wurde durch die Signalsequenz in die innere Mitochondrienmembran dirigiert. Nach Zusatz von all-*trans*-Retinal konnte die Funktionsfähigkeit des BR nachgewiesen werden.

1.4 Aufgabenstellung

Durch den Einbau einer zweiten Protonenpumpe, Bacteriorhodopsin (BR), in die innere Mitochondrienmembran wird zusätzliche Energie für die ATP-Synthese gewonnen, mit dem Ziel, bioenergetische Fragestellungen zu bearbeiten. Ein weiterer Aspekt ist die Untersuchung des Einbaus von Membranproteinen. BR kann als Modellsystem herangezogen werden, da seine Aktivität relativ einfach gemessen werden kann. Die Rotfärbung des Proteins aufgrund des Retinalgehalts ist ein leicht zu detektierendes Merkmal für die Detektion der korrekten Faltung und der korrekten Insertion von BR in Membranen. Da Hefen wie *S. cerevisiae* und *S. pombe* als Modellorganismen schon weitreichend in ihrer Physiologie untersucht sind, bietet sich die Untersuchung solcher Fragestellungen in diesen Organismen an.

HOFFMANN et al. (1994) verknüpften BO mit einer N-terminalen Signalsequenz für den Import in Mitochondrien. Die Expression dieses Konstruktes in *S. pombe* führte nur teilweise zum Einbau von BO in die innere Mitochondrienmembran. Auch die Cytoplasmamembran von Zellen, in denen BO mit mitochondrialer Sigalsequenz exprimiert wurde, enthielt große Mengen BO. Dies erschwert Studien zur Physiologie und zum Energieaufwand für Transportvorgänge ins Mitochondrium, da sich zwei Prozesse, der Einbau von BO in die Cytoplasmamembran und der Einbau in die innere Mitochondrienmembran überlagern können. Daher sollten in der hier vorliegenden Arbeit Stämme von *S. pombe* oder *S. cerevisiae* hergestellt werden, die BR ausschließlich in der inneren Mitochondrienmembran enthalten. Es sollten verschiedene Ansätze verfolgt werden.

Der bereits von HOFFMANN et al. (1994) etablierte *in vivo* Import von BR in die innere Mitochondrienmembran von *S. pombe* sollte durch Verknüpfung von BR mit effizienteren Signalsequenzen verbessert werden. Um genaueren Aufschluß über die Ursachen des ineffizienten Imports von BR in die innere Mitochondrienmembran von *S. pombe* zu erhalten, und um daraus Ansatzpunkte zur Verbesserung des *in vivo* Imports zu erhalten, sollten *in vitro* Experimente zum Import von BR in die innere Mitochondrienmembran der Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* durchgeführt werden. Schließlich sollte BR direkt in Mitochondrien von *S. cerevisiae* exprimiert werden. Dadurch sollte das Problem des Imports von BR in die Mitochondrien umgangen werden.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Geräte

Agarosegelelektrophorese:

Power Pack P25, Biometra, Göttingen
Laufkammer Bio Max (QS710), Kodak,
Laufkammer GMA 200, Pharmacia, Uppsala, Schweden

DNA-Sequenzierung:

Power Supply EPS 3500, Pharmacia, Uppsala, Schweden
GATC 1500 Direct Blotting Electrophoresis DNA-Sequencer mit GATC CCU 1500
Schriftmotor und GATC-Tube, GATC Gesellschaft, Konstanz

Geldokumentationssystem:

Gel Doc 1000, Molecular Analyst, Bio-Rad, München

pH-Meter:

pH-Meter 766 Calimatic, Knick, Berlin
mit pH-Elektrode von Schott Geräte, Hofheim a. Ts.

Photometer:

GENEQUANT, Pharmacia, Uppsala, Schweden
UV-120-02, Shimadzu, Japan

SDS-Gelelektrophorese:

Model 1000/500 Power Supply, Bio-Rad, München
Protean II xi Cell, Bio-Rad, München
2050 Midget, Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, U.S.A.

Sterilfilter:

Supor Acrodisc 32, 0,2 µm, Gelman Sciences, Ann Arbor, U.S.A.
Bottle Top Filter, 0,2 µm, 150 ml, Nalgene, Rochester, U.S.A.

Thermocycler:

PTC-200, MJ Research, Watertown, U.S.A.

Ultraschallbehandlung:

Labsonic L mit Nadel 40TL, Braun, Melsungen

UV-Tisch:

TFL20M, Biometra, Göttingen

Wasserbäder:

Typ 3047, Köttermann, Häningsen
F20 Ultratemp 2000, Julabo, Seelbach

Zentrifugen:

Optima TL Ultracentrifuge mit Rotor TLA 45, Beckmann, Palo Alto, U.S.A.
 Microcentrifuge MC-13, Heraeus, Osterode
 Centrifuge 5414, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
 Biofuge 13 R mit Rotor HFA 14.2, Heraeus, Osterode
 Megafuge 1.0 R mit Rotor BS4402/A, Heraeus, Osterode
 Centricon H-401 mit den Rotoren A8.24 oder A6.9, Kontron, Hermle Laborgeräte GmbH,
 St. Leon-Rot 2

2.2 Chemikalien, Enzyme, Standards**Chemikalien:**

Sofern nicht anders angegeben, hatten alle Chemikalien p.a. Qualität. Die Lösungen wurden mit hochreinem Wasser (Milli Q-Qualität) angesetzt.

Acrylamid-Bisacrylamid (30 % / 0,8 %)	Merck
Adenin	Sigma
ATP, di-Natrium-Salz	Sigma
Agar	Difco
Agarose (Standard)	Sigma
Agarose, Metaphor	Biozym
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumpersulfat	Bio-Rad
Ammoniumsulfat	Merck
Ampicillin	Boehringer Mannheim
L-Arginin	Sigma
Bacto Pepton	Difco
Biotin (Vitamin H)	Sigma
Borsäure	Merck
Brain Heart Infusion Agar	Difco
Bromphenolblau	Bio-Rad
Calciumchlorid	Merck
Chloroform	Merck
Citronensäure	Merck
Coomassie Brilliant Blue R250	Serva
CPD-Star	Boehringer Mannheim
CSPD	Boehringer Mannheim
L-Cystein	Sigma
DTT	Merck
dNTPs	Biolabs
Eisenchlorid	Sigma
EDTA	Merck
Essigsäure	Riedel de Haen
Ethanol, absolut	Riedel de Haen
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd	Merck
Formamid	Gibco/BRL
D (+) Galaktose	Sigma
D (+) Glukose	Sigma
Glycerin	Sigma
Glycin	Sigma
Guanidiniumhydrochlorid	Merck
Harnstoff	Merck
Inositol	Sigma
Isoamylalkohol	Merck
Isopropanol	Riedel de Haen

Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydrogen-Phthalat	Sigma
Kaliumhydroxid	Merck
Kaliumjodid	Sigma
Kupfersulfat	Merck
N-Lauroylsarcosin	Sigma
L-Leucin	Sigma
Lithiumacetat	Sigma
L-Lysin	Sigma
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Maleinsäure	Merck
Mangansulfat	Merck
β -Mercaptoethanol	Merck
Methanol	Riedel de Haen
L-Methionin	Sigma
Molybdat	Merck
MOPS	Sigma
NADH	Boehringer Mannheim
Natriumazid	Merck
Natriumchlorid	Merck
tri-Natriumcitrat	Merck
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck
Natriumhydroxid	Merck
Natrium-Panthotenat	Sigma
Natriumsulfid	Aldrich
Nikotinsäure	Sigma
Paraffin	Merck
Pepton	Oxoid
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol	Roth
PMSF	Sigma
Polyethylenglykol 3350	Sigma
Ponceau S	Sigma
all- <i>trans</i> -Retinal	Sigma
Rinderserumalbumin, Fettsäure-frei	Sigma
RNA aus Hefe	Boehringer Mannheim
Rubidiumchlorid	Merck
Saccharose	Merck
Salzsäure	Riedel de Haen
SDS	Bio-Rad
D-Sorbitol	Sigma
TEMED	Bio-Rad
Thiamin-Hydrochlorid	Sigma
Trichloressigsäure	Merck
Tris (Base)	Sigma
Tris (HCl)	Sigma
Tris-Acetate	Sigma
Trypton	Difco
Tween 20	Sigma
Valinomycin	Sigma
X-Gal	AGS
Xylen Cyanol	Bio-Rad
Yeast Extract	Difco
YNB	Difco
YNB, ohne Aminosäuren	Difco
Zinksulfat	Sigma
Zitronensäure	Merck

Enzyme:

Alkalische Phosphatase (aus Kälberdarm)	Boehringer Mannheim
Klenow Fragment der DNA-Polymerase aus <i>E. coli</i>	Boehringer Mannheim
Lysing Enzymes (von <i>Tricoderma harzianum</i>)	Sigma
Novozym	Biolabs
ProteinaseK	Boehringer Mannheim
Ribonuclease A (aus Rinderpankreas)	Sigma
Taq Expand High Fidelity	Boehringer Mannheim
T4 DNA-Ligase	Gibco/BRL
Thermo Sequenase	Amersham
Zymolyase 20T	Seikagaku

Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Biolabs, Gibco/BRL, Boehringer Mannheim und Amersham bezogen.

Standards:

DNA:	1 kb Leiter	Gibco/BRL
RNA:	G315	Amersham
Protein:	Rainbow, high molecular weight	Amersham
	Rainbow, low molecular weight	Amersham
	broad range	Bio-Rad

2.3 Puffer, Lösungen und Medien**2.3.1 Puffer und Lösungen**

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle Lösungen und Puffer in Wasser (Millipore-Qualität) angesetzt.

Medienzusätze:

Ampicillin-Stammlösung: 50 mg/ml Ampicillin (Na-Salz) in Wasser, sterilfiltriert

Transformation von *S. pombe*:

LiAc/EDTA: 100 mM Lithiumacetat, 1 mM EDTA, pH 4,9

PEG: 100 mM Lithiumacetat, 1 mM EDTA, 40 % (w/v) PEG 3350, pH 4,9

Lösen von DNA:

TE: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0 (HCl)

10 mM Tris, pH 8,5 (HCl)

Agarosegelelektrophorese:

Ethidiumbromid-Stammlösung: 10 mg/ml Ethidiumbromid

TAE: 40 mM Tris-Acetate, 1 mM EDTA, pH 8,0 (Essigsäure)

DNA-Probenpuffer: 50 % Saccharose, 1x TAE, 0,25 % Bromphenolblau

RNA-Probenpuffer: 75 µl Formamid, 30 µl 5 x MOPS, 30 µl Formaldehyd, 15 µl Farbmarker (50 % (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,25 % (w/v) Xylen Cyanol, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau, 5 x TAE), 1 µl Ethidiumbromid-Stammlösung

5 x MOPS: 0,2 M MOPS, 0,05 M Na-Acetat, 0,01 M EDTA, pH 7,0 (NaOH)

Hybridisierungslösungen:

20 x SSC: 3 M NaCl, 0,3 M tri-Na-Citrat, pH 7,0-7,2 (HCl)

High-SDS-Hybridisierungslösung (RNA/DNA): 7 % (w/v) SDS, 50 % (v/v) Formamid, 2 % (w/v) Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim), 5 x SSC, 0,1 % (w/v) Lauroylsarcosin, 50 mM Natriumphosphat-Puffer (50 mM Natriumhydrogenphosphat, 50 mM di-Natriumdihydrogenphosphat, pH 7,0)

Standard-Hybridisierungslösung (DNA/DNA): 5 x SSC, 0,1 % (w/v) Lauroylsarcosin, 0,02 % (w/v) SDS, 1 % Blocking Reagenz (aus einer 10%igen Stammlösung in Maleinsäurepuffer)

Maleinsäurepuffer: 0,1 M Maleinsäure, 0,15 M NaCl, pH 7,5 (festes NaOH)

Polyacrylamidgelelektrophorese:

Sammelepuffer: 0,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 6,8

Trennepuffer: 1,5 M Tris, 0,4 % (w/v) SDS, pH 8,8

Laufpuffer für die Bio-Rad-Laufkammer: 50 mM Tris, 384 mM Glycin, 0,1 % (w/v) SDS, pH 8,3 (HCl)

Laufpuffer für die Midget-Kammer: für 5 l: 94,5 g Glycin, 15 g Tris, 5 g SDS

Probenpuffer: 124 mM Tris, 4 % (w/v) SDS, 10 % β-Mercaptoethanol, 20 % (v/v) Glycerin, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau

Coomassie-Färbelösung: 0,05 % (w/v) Coomassie R250, 10 % (v/v) Essigsäure, 25 % (v/v) Isopropanol

Entfärber: 10 % (v/v) Essigsäure

Herstellen von Gesamtzellextrakten von *S. pombe*:

Protoplastierungspuffer: 1,2 M Sorbitol, 40 mM Na₂HPO₄, 54 mM Zitronensäure, 0,2 % (v/v) β-Mercaptoethanol, pH 5,6

Harnstoffprobenpuffer: 8 M Harnstoff, 0,2 M Tris (HCl), 2 % (w/v) SDS, 0,05 % (w/v) Bromphenolblau, 0,2 M DTT

Isolierung von Mitochondrien:

1,2 M Sorbitol

DTT-Puffer: 100 mM Tris, 10 mM DTT, pH 9,4 (Schwefelsäure)

Zymolyase-Puffer: 1,2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphatpuffer (20 mM Kaliumdihydrogenphosphat, 20 mM di-Kaliumhydrogenphosphat, pH 7,4)

Homogenisierungspuffer: 0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0,2 % BSA (Fettsäure frei), 1 mM PMSF, pH 7,4 (HCl)

SEM: 250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH 7,2 (KOH)

Import von Proteinen in isolierte Mitochondrien:

BSA-Puffer: 250 mM Saccharose, 10 mM MOPS, 3 % (w/v) BSA (Fettsäure frei), pH 7,2 (KOH)

Untersuchungen zur Wechselwirkung von BO und GroEL:

Rückfaltungspuffer: 0,1 M Tris, 10 mM MgCl₂, 10 mM KCl, pH 7,5

Harnstoff-Puffer: 8 M Harnstoff, 0,1 M Tris, 20 mM DTT, pH 8,0

Westernblotanalyse:

Blot-Puffer: 39 mM Glycin, 48 mM Tris (Base), 20 % (v/v) Methanol

Ponceau S-Färbelösung: 0,2 % (w/v) Ponceau S, 3 % (w/v) Trichloressigsäure

TBS: 20 mM Tris, 137 mM NaCl, pH 7,6 (HCl)

2.3.2 Medien

Wenn nicht anders angegeben, wurden die Medien autoklaviert (121 °C, 20 min.). Zucker, Antibiotika und Aminosäuren wurden sterilfiltriert und nach dem Abkühlen zugesetzt.

Für Agarplatten zur Anzucht von *Escherichia coli* wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt.

Für Agarplatten zur Anzucht von Hefen wurde dem Medium 2 % (w/v) Agar zugesetzt.

Bakterienmedien:

dYT: 1,6 % (w/v) Trypton, 1 % (w/v) Yeast Extrakt, 0,5 % (w/v) NaCl

LB-Medium: 1 % (w/v) Trypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt, 1 % (w/v) NaCl, pH 7,5 (NaOH oder HCl)

PM: 4,3 M NaCl, 80 mM MgSO₄, 10 mM tri-NaCitrat, 27 mM KCl, 0,1 % (w/v) Pepton (Oxoid), pH 7,0 (NaOH), Sterilisieren: 2 h 90 °C

Hefemedien:

EMM: 0,3 % (w/v) KH-Phatalat, 0,22 % (w/v) Na₂HPO₄, 0,5 % (w/v) NH₄Cl, 2 % (w/v)

Glukose,

20 ml/l Salze (50x/l):	MgCl ₂ x 6 H ₂ O	53,5 g
	CaCl ₂ x 6 H ₂ O	1,0 g
	KCl	50,0 g
	Na ₂ SO ₃	2,0 g
1 ml/l Vitamine (1000x/l):	Na-Panthotenat	1,0 g
	Nikotinsäure	10,0 g
	Inositol	10,0 g
	Biotin	10,0 mg
0,1 ml/l Mineralien (10.000x/l):	H ₃ BO ₃	5,0 g
	MnSO ₄	4,0 g
	ZnSO ₄ x 7 H ₂ O	4,0 g
	FeCl ₃ x 6 H ₂ O	2,0 g
	H ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,4 g
	CuSO ₄ x 5 H ₂ O	0,4 g
	KJ	1,0 g
	Zitronensäure	10,0 g

SD: 0,67 % (w/v) YNB ohne Aminosäuren, 2 % (w/v) Glukose

auxotrophe Zusätze je nach Bedarf:

Adenin:	20 mg/l
L-Arginin:	20 mg/l
L-Leucin:	262 mg/l
L-Lysin:	183 mg/l

SD+Sorb+Ade: 5 % (w/v) Glukose, 0,67 % (w/v) YNB, 1 M Sorbitol, 0,01 % (w/v) Adenin

YNB: 0,17 % (w/v) YNB, 0,5 % (w/v) NH_4SO_4 , 0,5 % (w/v) Glukose, 150 mg/ml L-Leucin

YPD: 2 % (w/v) Glukose, 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt

YPGal: 2 % (w/v) Galaktose, 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt

YPGlyc: 3 % (w/v) Glycerin, 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt

YPRaf: 2 % (w/v) Raffinose, 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt

YPEG: 3 % (v/v) Ethanol, 3 % (v/v) Glycerin, 2 % (w/v) Pepton, 1 % (w/v) Hefe-Extrakt

2.4 Organismen und Wachstumsbedingungen

2.4.1 Organismen

Die verwendeten Organismen sind in den folgenden Tabellen beschrieben.

Tab. 1: Verwendete *Escherichia coli* Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	relevante genetische Marker	Referenz	Herkunft
DH5 α	(ϕ 80 Δ lacZM15)[lacZYA-argF]U196 <i>recA1 endA1 hsdR17 (r^m) supE44</i> λ <i>thi-1 gyr A rel A1</i>	Hanahan (1985)	ITC Biotechnology GmbH
GM2163	F ⁻ <i>ara-14 leuB6 tonA31 lacY1 tsx-78</i> <i>supE44 galK2 galT22 hisG4 rpsL136</i> <i>xyl-5 mt1-1 thi-1 dam-13 Tn9 (Cr^I) dcm-6</i> <i>hsdR2 mcrA⁻ mcrB⁻</i>	Palmer, Marinas (1994)	Biolabs

Tab. 2: Verwendete *Schizosaccharomyces pombe* Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	relevante genetische Marker	Referenz	Herkunft
972 h ⁻	Wildtyp, haploid	Osterwalder (1924)	Laborbetrieb
Leucin-Mangelmutante	leu 1-32, haploid, h ⁻	Beach, Nurse (1981), Kohli (1987)	Laborbetrieb
Uracil/Leucin-Mangelmutante	ura ⁻ , leu ⁻ , haploid		V. Hildebrandt

Tab. 3: Verwendete *Saccharomyces cerevisiae* Stämme und ihre Eigenschaften

Stamm	relevante genetische Marker	Mitochondrium	Paarungstyp
CAB3	leu2-3,112, his4-519, ura3ΔNS	rho ⁺ , cox3::URA3	MATα
D273-10B	Wildtyp	rho ⁺	MATα
DFS160	ade2-101, [ura3-52], Δleu2, arg8Δ::URA3, kar1-1	rho ⁰	MATα
DFS188	ura3-52, leu2-3,112, lys2, his3ΔHindIII, arg8::hisG	rho ⁺	MATa
GW22	lys2	rho ⁺ , cox3-421	MATa
GW46	ade2-101, ura3-52, kar1-1	rho ⁺ , cox3-421	MATα
GW202	ura3-52, ade2, leu2-3,122, pet127Δ::hisG	rho ⁺	MATa
MCC259	ade2-101, ura3-52, kar1-1	rho ⁻ , COX3	MATα
MCC265	ade2-101, ura3-52	rho ⁻ , COX3	MATa
V76	op1, ade1	rho ⁺ , cox3-V76	MATα

Alle in Tab. 3 aufgeführten Stämme stammen aus dem Labor von T. D. Fox (Cornell-University, Department of Genetics, Ithaca, N.Y.).

Zur Erläuterung der Nomenklatur sind in Tab. 4 die wichtigsten Klassen der mitochondrialen Mutationen bei *S. cerevisiae* aufgeführt.

Tab. 4: Die wichtigsten Klassen mitochondrialer (mt) Mutationen:

Symbol	Besondere Eigenschaften
rho ⁺	Wildtyp, vollständiges mt Genom
rho ⁰	vollständiger Verlust der mtDNA
rho ⁻	große Deletionen in der mtDNA, vollständiger Verlust der mt Protein-Synthese
synthetischer rho ⁻	Plasmid mit kleinem Stück mtDNA statt mt Genom
mit ⁺	Wildtyp
mit ⁻	begrenzte Mutation, die nur die Funktion eines einzelnen Gens betrifft

Zur Isolierung von Mitochondrien zum *in vitro* Import wurden folgende Wildtyp-Hefestämme gewählt:

Saccharomyces cerevisiae: PK82 von E.A. Craig (GAMBILL et al. 1993)

Schizosaccharomyces pombe: 972h⁻ (OSTERWALDER, 1924)

2.4.2 Kulturbedingungen

2.4.2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli wurde, wenn nicht anders angegeben, in Flüssigmedium (LB oder dYT) mit Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin für 12 bis 16 h bei 37 °C im Schüttelinkubator angezogen oder auf Agarplatten mit Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin bei 37 °C über Nacht inkubiert.

2.4.2.2 *Saccharomyces cerevisiae* und *Schizosaccharomyces pombe*

Saccharomyces cerevisiae und *Schizosaccharomyces pombe* wurden auf Agarplatten 2-4 Tage bei 30 °C angezogen. Die Kultivierung in Flüssigmedium (Die Wahl des Mediums ist im Einzelfall angegeben.) erfolgte im Schüttelinkubator (mindestens 150 Upm) bei 30 °C, bis die gewünschte Zelldichte erreicht war.

2.4.2.3 Anzucht von *Schizosaccharomyces pombe* mit Bacterioopsin-Genkonstrukten

Für eine Vorkultur wurden 20 ml EMM mit Zusatz von 2 µM Thiamin von einer EMM + 2 µM Thiamin Agarplatte angeimpft. Die Kultivierung erfolgte für 24 h bei 30 °C im Schüttelinkubator (150 Upm). Zum Animpfen der Hauptkultur wurden die Zellen der Vorkultur zur Beseitigung des Thiamins zweimal mit sterilem Wasser gewaschen.

Die Vorkultur wurde in der Heraeus Megafuge 5 min mit 3.500 Upm zentrifugiert, in sterilem Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach dem zweiten Waschschrift wurden die Zellen in

2 ml Wasser resuspendiert und zum Animpfen der Hauptkultur in EMM verwendet. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C im Schüttelinkubator. 2 h nach Animpfen der Hauptkultur wurde 2 µM all-*trans*-Retinal (Sigma) zugesetzt. Weitere Retinalzugaben erfolgten stündlich ab der 14. Kulturstunde zu je 2 µM. Die Zellen wurden nach 16-20 h, sobald sie eine Optische Dichte von 3 erreicht hatten, geerntet. Die Retinalzugabe konnte entfallen, wenn kein aktives Bacteriorhodopsin erforderlich war.

2.4.3 Bestimmung der Zelldichte von Flüssigkulturen

Zur Bestimmung der Zelldichte wurde die Optische Dichte der Kulturen im Shimadzu UV-120-02 Spektralphotometer bei 600 nm, wenn nicht anders angegeben, gemessen. Dazu wurden die Kulturen so verdünnt, daß der Meßwert nicht über 1 lag.

2.4.4 Stammhaltung

Die kurzfristige Lagerung von Organismen erfolgte auf Agarplatten bei 4 °C. Die langfristige Lagerung von Organismen erfolgte bei -70 °C wie im folgenden näher erläutert.

Escherichia coli:

500 µl einer über Nacht angezogenen Kultur wurden in Selektionsmedium mit 500 µl sterilem Glycerin gemischt und bei -70 °C eingefroren. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wurde etwas gefrorene Substanz von der Oberfläche abgekratzt und zur Anzucht auf einer Agarplatte ausgestrichen oder in Flüssigmedium resuspendiert.

Saccharomyces cerevisiae:

Mit einem sterilen flachen Zahnstocher wurde Zellmaterial von einer Agarplatte entnommen und in 600 µl sterilem 15 % (v/v) Glycerin in Wasser resuspendiert. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wurde etwas gefrorene Substanz von der Oberfläche abgekratzt und zur Anzucht auf einer Agarplatte ausgestrichen oder in Flüssigmedium resuspendiert.

Schizosaccharomyces pombe:

Zellmaterial wurde von einer Agarplatte entnommen und nach Herstellerangabe in ein Röhrchen der Microbank (MAST Diagnostica) überführt. Zum Ansetzen einer neuen Kultur wurde ein Kügelchen aus der Microbank entnommen und auf einer Agarplatte ausgerollt.

2.5 Plasmide

<u>Plasmid:</u>	<u>Marker:</u>	<u>Herkunft:</u>
pCR Script SK ⁺	Amp ^r	Stratagene
pDS24	Amp ^r	T. D. Fox (STEELE et al., 1996)
pEH8	Amp ^r	A. Hoffmann (Hurt et al., 1984)
pGEM3z	Amp ^r	Promega
pGEM3-F ₁ β	Amp ^r	J. Rassow (RASSOW et al., 1990)
pGEM4-AAC	Amp ^r	H. Steger
pGEM4-SU9-DHFR	Amp ^r	N. Pfanner (PFANNER et al., 1987)
pNB	Amp ^r , Leu2	V. Hildebrandt
pNEU	Amp ^r , Leu2	V. Hildebrandt
pREP2	Amp ^r , ura4 ⁺	V. Hildebrandt (MAUNDRELL et al., 1993)
pRS3/5	Leu2	T. D. Fox
pSP65-coxIV-DHFR	Amp ^r	K. Verner
pUC18	Amp ^r	Pharmacia

2.6 Oligonucleotide

Die Oligonucleotide wurden von Eurogentec oder Gibco/BRL bezogen.

COXAB:	5'-[GAGAATTCATACAAATAGATAAC]-3'
COXCD:	5'-[TCCCGGGAGCAGAACCCCATCTACT]-3'
COXENDE:	5'-[CATCAATAAAATAGTACGTATAAAAATAATCAG]-3'
COXMITTE:	5'-[GCTGCATTCACATCTCTGATGGTGTTCATGG]-3'
COXSONDEVO:	5'-[GGTGTGAACCTCCATGAGAGAG]-3'
ENDEAB:	5'-[TAAGCTTTTAATGATGATGGTGATGATGAGAACGACCCATTGTGA GGCCATACCCACCC]-3'
ENDECD:	5'-[TAAGCTTTTAATGATGATGGTGATGATGAGAACGACCCATGTCGC TGGTCGCGGCCGCGC]-3'
MTBOS1:	5'-[CAGTAGACAAGCCCAGATTACTGGTCGTCCTGAATGG]-3'
MTBOS2:	5'-[CCTTGACCAAAAAGTACAAAGTGCCTAAACCC]-3'
MTBOS3:	5'-[ACCATGGTCAAACCGTAACCTAATAACATAGATAAATACATAG]-3'
MTBOS4:	5'-[CCCTGATCAGCGTCCACTAATAAAGCTAAATCTAATAATAACAAAG GAGTAGTG]-3'
MTBOS5:	5'-[GCTGATCAGGGTACTATCTTAGCTTTGGTAGGTG]-3'
MTBOS6:	5'-[CGTATAGATTTGTCTGATGAGCTATTTTC]-3'
MTBOS7:	5'-[GCCTTTAAACATTGAACTTTGTTGTTTCATGG]-3'
MTBOS8:	5'-[GGATTCGGTTTGATTTGTTGCGTTCTAGAGCAATTTTCGGCG]-3'
MTBOS9:	5'-[CGGGATCCTTAGTCTGACGTCGCCGCTGC]-3'

NEUNACHCOX: 5'-[GAATGAGTGAGGGGGGAACCGAACCC]-3'
 SU9H: 5'-[CAGGATCCATCGGAAGAGTAGGCGCGC]-3'
 SU9R: 5'-[ACGAATTCCCACCATGGCCTCCACTCGTGTCC]-3'
 VORCOX: 5'-[GAATAAATAATCCGGCGAAAGAGATATTAATTCCG]-3'

2.7 Arbeiten mit DNA

2.7.1 Standardmethoden

Sämtliche Standardmethoden, die im Folgenden nicht beschrieben sind, wie Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen und DNA-Ligationen wurden nach MANNIATIS et al. (1982) oder nach den Angaben des Herstellers der verwendeten Enzyme oder Materialien durchgeführt.

Für folgende Arbeiten wurden Materialien der Firma QIAGEN nach Herstellerangaben verwendet:

Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> (bis zu 20 µg DNA):	QIAprep Spin Miniprep Kit
Plasmid-Präparation aus <i>E. coli</i> (bis zu 100 µg DNA):	QIAGEN Plasmid Midi Kit
Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:	QIAEX II Gel Extraction Kit
Aufreinigen von DNA nach enzymatischen Reaktionen:	QIAquick Nukleotide Removal Kit
Präparation von Gesamt-DNA aus <i>S. cerevisiae</i> (bis zu 100 µg DNA):	QIAGEN Genomic-tip 100

2.7.2 Gesamt-DNA-Präparation aus *Saccharomyces cerevisiae*

Es wurde nach der Methode von SHERMAN et al. (1986) gearbeitet.

5 ml einer über-Nacht-Kultur in YPD wurden im 15 ml Falcon-Röhrchen in der Heraeus-Zentrifuge 5 min bei 5.000 Upm zentrifugiert. Die Zellen wurden in 0,5 ml 1 M Sorbitol, 0,1 M EDTA, pH 7,5 resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zusatz von 20 µl 7,5 mg/ml Zymolyase 20T wurde für 60 min bei 37 °C inkubiert. Zum Pelletieren der Sphäroplasten wurde 1 min in einer Mikrozentrifuge mit 13.000 Upm bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die Sphäroplasten wurden in 0,5 ml 50 mM Tris pH 7,4, 20 mM EDTA resuspendiert, mit 10 % SDS gut durchmischt und für 30 min bei 65 °C inkubiert. Es wurden 200 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben und für 60 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min 13.000 Upm in der Mikrozentrifuge) wurde der Überstand mit 1 Volumen Isopropanol (Raumtemperatur) versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es wurde für 10 sek in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das Pellet wurde getrocknet und in 0,3 ml TE durch Inkubation bei 40 °C resuspendiert. Nach Zusatz von 2 µl 10 mg/ml RNase A wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die DNA wurde durch Zusatz von 30 ml Natriumacetat und 200 µl Isopropanol präzipitiert und 10 sek in der Mikrozentrifuge bei 13.000 Upm pelletiert. Das Pellet wurde getrocknet und bei 40 °C in 50 µl TE resuspendiert. Die DNA-Lösung wurde durch zweiminütige

Zentrifugation in der Mikrozentrifuge bei 13.000 Upm von unlöslichem Material, das nachfolgende Reaktionen inhibieren kann, getrennt.

2.7.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose wurde in TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgeköcht und mit 7,5 µl einer 10 mg/ml Ethidiumbromidlösung pro 100 ml Agaroselösung versetzt. Die Agaroselösung konnte bis zu 14 Tagen bei 60 °C aufbewahrt werden.

Es fanden Gele mit einer Konzentration zwischen 0,5 % (w/v) und 2 % (w/v) Agarose Verwendung.

Die Elektrophorese wurde mit TAE-Puffer bei 100 V durchgeführt.

Zur Analyse von Fragmenten mit Längen unter 200 Nukleotiden wurde auch MetaPhor Agarose in einer Konzentration von 2 % bis 3 % (w/v) verwendet.

2.7.4 Konzentrieren von DNA

Zum Konzentrieren wurde die DNA mit Isopropanol oder Ethanol gefällt:

Durch die Verwendung von Pellet Paint (Novagen), einem roten Glycofarbstoff, der mit der DNA assoziiert, wurden die DNA-Pellets sichtbar gemacht. Ein weiterer Effekt der Verwendung von Pellet Paint ist die Festigung der DNA Pellets.

Die DNA wurde mit 2 µl Pellet Paint und 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat gemischt. Nach Zusatz von 1 Volumen Isopropanol oder 2 Volumen Ethanol wurde erneut gemischt und 2-5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNA wurde durch 5-minütige Zentrifugation in einer Mikrozentrifuge bei 13.000 Upm präzipitiert. Anschließend wurde das Pellet einmal mit 70%igem und einmal absolutem Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde getrocknet und in Wasser oder Puffer (10 mM oder 1 mM Tris/HCl, pH 8,5) aufgenommen.

Alternativ wurde für die *in vitro* Transkription die DNA ohne Pellet Paint gefällt. Dann wurden die Zentrifugationsschritte bei 4 °C für 10 Minuten durchgeführt.

2.7.5 Reinigung von DNA

Zum Entfernen von RNAsen aus DNA-Präparationen wurde die DNA-Lösung 3x mit einer TE-gesättigten Phenol/Chloroform-Lösung und 2x einer Lösung aus Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) ausgeschüttelt. Zur Trennung der Phasen wurde jeweils 5 Minuten in einer Mikrozentrifuge mit 13.000 Upm bei Raumtemperatur abzentrifugiert.

2.7.6 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die PCR wurde zur Vervielfältigung von DNA-Fragmenten verwendet. Man benötigt dazu zwei Primer, von denen der eine zum 3'-Bereich der gewünschten Sequenz und der andere zum Gegenstrang des 5'-Bereichs komplementär ist. Dabei ist es zum einen möglich, am 5'-Ende der Primer nicht komplementäre Sequenzen anzuhängen, was das Einführen neuer Restriktionsschnittstellen an den Enden der amplifizierten DNA ermöglicht. Zum anderen können einige Nukleotide im mittleren Bereich des Primers ebenfalls nicht komplementär sein, was den Austausch einzelner Basen ermöglicht (ortsspezifische Mutagenese).

2.7.6.1 Reaktionsbedingungen

Für die PCR-Amplifizierung wurde ein Enzymgemisch aus den thermostabilen Enzymen Taq-DNA-Polymerase und Pwo-DNA-Polymerase (Expand High Fidelity PCR System, Boehringer Mannheim) mit mitgeliefertem Reaktionspuffer (Magnesiumionen-haltig) eingesetzt. Dabei dient die Taq-DNA-Polymerase der Amplifizierung, die Pwo-DNA-Polymerase hat eine Korrektur-Funktion.

Die Reaktionsansätze ohne Enzyme wurden in 0,2 ml Reaktionsgefäßen auf Eis zusammengegeben und für 3-4 min auf 95 °C erhitzt. Das Enzymgemisch wurde zugegeben, und die Reaktion im PTC-200 Thermo-Cycler der Firma MJ Research durchgeführt.

Reaktionsansatz:

Primer 1 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Primer 2 (100 pmol/µl)	1,0 µl
Template	20,0 ng (Plasmid) oder 1,0 µg (genomische DNA)
dNTP Mix (je 5 mM)	5,0 µl
10x Reaktionspuffer	10,0 µl
Expand High Fidelity	1,0 µl
H ₂ O	ad 100,0 µl

Wurde eine PCR nur zur Analyse durchgeführt, wurde der Ansatz um die Hälfte reduziert.

Reaktionsbedingungen:

- Schritt 1: 1 min 95 °C
- Schritt 2: 1 min Annealing-Temperatur ($T_m - 4$ °C)
- Schritt 3: 1 min 72 °C
- Schritt 4: gehe zu Schritt 2, 29x
- Schritt 5: bis zur manuellen Beendigung des Programms 4 °C

$$T_m = (\text{Anzahl Basenpaare A:T zwischen Template und Primer}) \times 2 \\ + (\text{Anzahl Basenpaare G:C zwischen Template und Primer}) \times 4$$

Bei erwarteten Produktlängen von mehr als 2 kb wurde Schritt 3 auf 2,5 min verlängert.

2.7.6.2 Reinigung von PCR-Produkten

Zur Reinigung der PCR-Produkte wurde die Reaktion in Agarose-Gelen (2.7.3) aufgetrennt, und die Produktbande aus dem Gel ausgeschnitten. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit dem QIAEX Gel Extraction Kit (QIAGEN) nach Herstellerangaben.

2.7.6.3 Klonierung von PCR-Produkten

Aufgereinigte PCR-Produkte wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Herstellerangaben mit dem SureClone Ligation Kit (Pharmacia) in die SmaI-Schnittstelle von pUC18 kloniert.

2.7.6.4 Ortsspezifische Mutagenese

Diese Methode wurde angewandt, um das *bos*-Gen (POMPEIJUS et al. 1993) dem genetischen Code der Mitochondrien von *S. cerevisiae* anzupassen.

Die hier angewandte Methode beruht auf LANDT et al. (1990). In einer ersten PCR-Reaktion wird ein Mutageneseprimer mit der gewünschten veränderten DNA-Sequenz verwendet. Zur Amplifikation des Gegenstranges wird der zweite Primer unterhalb der zu mutagenisierenden Position gesetzt. Die in dieser ersten PCR-Reaktion amplifizierte DNA enthält die durch den Mutageneseprimer vorgegebene Mutation. In einer weiteren Reaktion wird das gereinigte Produkt der ersten Reaktion als Primer und ein Oligonukleotid als zweiter Primer eingesetzt.

So wurde die erste Hälfte des *mtbos*-Gens (7.1) in drei aufeinanderfolgenden PCRs und die zweite Hälfte in vier aufeinanderfolgenden PCRs erstellt. Als Primer wurden die Oligonukleotide MTBOS1 bis MTBOS9 eingesetzt (2.6). (Vergleiche zur Vorgehensweise auch Kapitel 3.5.1)

2.7.7 DNA-Sequenzierung (Cycle Sequencing)

Im Gegensatz zur üblichen Sequenzierung nach Sanger beruht das Cycle Sequencing auf wiederholte Zyklen von Denaturierung, Primer Anheftung und Elongation. Nach jeder Elongation wird das Produkt durch Hitze-Denaturierung vom Template getrennt. Deshalb muß nur sehr wenig Template zur Sequenzierung eingesetzt werden. Ein weiterer Vorteil im Vergleich zur Sequenzierung nach Sanger liegt darin, daß beim Cycle Sequencing kein Denaturierungsschritt für doppelsträngige DNA-Templates vorgeschaltet werden muß. Die Denaturierung erfolgt bei jedem Zyklus durch Erhitzen.

Das Cycle Sequencing wird mit Thermo Sequenase (Amersham) und dem GATC-BioCycle Sequencing Kit durchgeführt. Dabei erfolgt die Markierung durch Einbau von Biotin-markierten Dideoxy-Nukleotiden (terminator labeling). Der Einbau eines Dideoxy-Nukleotids führt zum Kettenabbruch bei der Elongation. Über die Biotin-Markierung kann die Detektion der DNA-Stränge erfolgen. Die Gelelektrophorese (4%iges Acrylamidgel) und Blotting erfolgt mit dem GATC-1500-System (Direct Blotting Electrophoresis). Dabei wird während des Gellaufs die Transfermembran in engem Kontakt

zur Gelunterkante unter dem Gel entlanggefahren, wodurch es zum Transfer der DNA-Banden auf die Membran kommt.

Es wurde wie vom Hersteller (GATC Gesellschaft) angegeben verfahren. 2 µg Plasmid-DNA (Gegebenfalls wurde die DNA wie unter 2.7.4 beschrieben mit Pellet Paint aufkonzentriert.) wurden pro Hauptmix in zehnfach verdünntem TE eingesetzt. Die Sequenzreaktion wurde in 0,2 ml Gefäßen im Thermo-Cycler mit folgendem Programm inkubiert:

Denaturierung:	3 Minuten 95 °C
30 Zyklen:	30 Sekunden 50 °C
	30 Sekunden 95 °C
Final:	4 Minuten 60 °C

2 µl von jeder Reaktion wurden auf das Gel (4 %) aufgetragen.

Zur Fixierung der DNA auf der Blottingmembran wurde diese getrocknet und mit 1,6 Joule unter UV-Licht inkubiert. Die kolorimetrische Detektion erfolgte im GATC-Tube.

2.7.8 DNA/DNA-Hybridisierung zum Nachweis von DNA (Southernblotanalyse)

2.7.8.1 Transfer von DNA auf Nylonfilter (Southernblot)

Die DNA wurde im 0,8%igen Agarosegel (TAE als Laufpuffer) elektrophoretisch getrennt (2.7.3). Das Gel wurde erst nach dem Gellauf in einer Ethidiumbromidlösung (1µg/ml in TAE) 15 min gefärbt, dokumentiert und in TAE entfärbt. Die DNA wurde anschließend im Vakuumblotter VacuGene XL (Pharmacia) auf einen Nylonfilter (NY 13 N, Millipore) transferiert. Der Aufbau erfolgte wie von der Herstellerfirma beschrieben. Es wurde ein Vakuum von 50 mbar angelegt.

Folgende Inkubationen wurden durchgeführt:

10 min	Depurinisierung (0,2 N HCl)
7 min	Denaturierung (0,5 M NaOH, 0,25 M NaCl)
7 min	Neutralisieren (1 M Tris pH 5,0, 2 M NaCl)
60 min	Transfer (20xSSC)

Die einzelnen Lösungen wurden jeweils auf das Gel geschichtet und alle 10-15 min erneuert.

Nach dem Transfer wurde der Filter 5 min in 20xSSC gewaschen und kurz auf Filterpapier angetrocknet. Die DNA wurde 3 min auf jeder Seite unter UV-Licht auf dem Filter fixiert.

2.7.8.2 DNA/DNA-Hybridisierung

Der Nylonfilter wurde 8 h in Standard-Hybridisierungspuffer bei 68 °C inkubiert. Die 14-stündige Hybridisierung erfolgte in Standard-Hybridisierlösung mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde bei 68 °C. Die Detektion erfolgte mit Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat (Boehringer Mannheim) und dem Chemoluminiszenz-Substrat CPD-Star (Boehringer Mannheim) nach Herstellerangaben.

2.7.9 Transformation von *Escherichia coli* mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von *E. coli* wurden kompetente Zellen nach der Rubidiumchlorid-Methode, einem modifizierten Protokoll nach HANAHAN (frozen storage III) (1983, 1985) hergestellt. Die Zellen wurden in Aliquots zu je 200 µl in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70 °C gelagert. Zur Transformation wurden 10-200 ng Plasmid verwendet.

2.7.10 Transformation von *Schizosaccharomyces pombe*

Es wurde die Lithiumacetat-Methode nach GIETZ et al. (1992), verändert nach KANTER-SMOLER et al. (1994), durchgeführt.

10 ml einer Kultur in YNB wurden bei 30 °C bis zu einer Optischen Dichte von 0,3 bis 1,0 angezogen. Die Zellen wurden einmal mit sterilem Wasser und einmal mit 200 µl LiAc/EDTA gewaschen. Sie wurden in 50 µl LiAc/EDTA aufgenommen und nach Zusatz von 300 µl PEG-Lösung und etwa 1 µg DNA unter leichtem Schütteln 30 min bei 30 °C inkubiert. Nach 15-minütiger Inkubation bei 42 °C wurden die Zellen pelletiert und in 1 ml TE resuspendiert. 100 bis 300 µl der Zellen wurden auf EMM-Agarplatten bei 30 °C bis zum Erscheinen von Kolonien inkubiert.

2.7.11 Biolistische Transformation von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Biolistische Transformation führte ich in der Arbeitsgruppe von Prof. T. D. Fox (Cornell-Universität, Ithaca, U.S.A., Department of Genetics) durch.

Bei der Biolistischen Transformation wird die DNA auf Mikropartikel (Wolfram, 0,5 µm Durchmesser, AESAR) präzipitiert, die durch eine Heliumschockwelle auf eine Agarplatte mit Zellrasen geschossen werden (SANFORD et al., 1987 und 1993). Dabei gelangt die DNA in die verschiedenen Zellkompartimente. Bei der Transformation von Mitochondrien wird meist ein Kern-Marker-Gen zusammen mit dem Plasmid, das die eigentlich zu transformierende DNA enthält, transformiert. Dies ermöglicht die Vorselektionierung auf getroffene überlebensfähige Zellen.

Für die Transformation wurde der Stamm DFS160 (rho⁰) vorbereitet und auf SD+Sorb+Ade-Agarplatten ausgestrichen, wie bei FOX et al. (S. 163, 1994) beschrieben.

Die Vorbereitung der Microprojektile (Wolframpartikel mit DNA) erfolgte ebenso wie bei FOX et al. (S. 163/164, 1994) beschrieben. Als Markerplasmid für Kerntransformatanten wurde das Plasmid pRS3/5 mit dem Leu2-Marker (1,0 µg/Macrocarrier) eingesetzt. Vom Plasmid pLF7 (QIAGEN Midi, 2.7.1) wurden 2,5 µg/Macrocarrier eingesetzt.

Die Bombardierung der Zellen wurde in der PDS-1000/He Apparatur (DuPont) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Apparatur wurde durch Auswischen mit 70%igem Ethanol sterilisiert. Es fanden "rupture discs" (Bio-Rad), die bei 1.300 psi platzen, Verwendung. Entgegen den Herstellerangaben wurden diese nicht mit Isopropanol gereinigt, da dies die Transformationseffizienz herabsetzt. Die Platte, die den Macrocarrier enthielt, wurde auf der 5. Position vom Boden der Apparatur aus gesehen eingeschoben, der Petrischalenhalter auf der 2. Position.

Die Platten wurden nach der Bombardierung etwa 1 Woche bei 30 °C inkubiert, bis einzelne Klone von nukleär transformierten Zellen zu sehen waren. Unter diesen wurden diejenigen selektioniert, in deren Mitochondrien das Plasmid pLF7 enthalten war (synthetische rho⁻). Dazu wurde verfahren wie bei FOX et al. (S. 164, 1994) beschrieben (vergleiche auch 3.5.2).

2.7.12 Replikaplattierung

Sollte das Wachstum von Hefekolonien auf verschiedenen Medien mit und ohne Zellrasen eines Hefestammes getestet werden, wurde replikaplatziert.

Die Ausgangsplatte wurde auf sterilen Samt gedrückt und anschließend die neue Agarplatte auf den Samt gedrückt. Zur Sicherung der Kolonien der Ausgangsplatte wurde immer zuerst ein Abdruck auf das Medium der Ausgangsplatte vorgenommen.

2.7.13 Paarung von *Saccharomyces cerevisiae*

Bei der Paarung von Zellen von *S. cerevisiae* kommt es zum Kontakt der mitochondrialen Genome, was zu homologer Rekombination führt.

Paarung zur Erzeugung neuer Stämme von *S. cerevisiae*:

Die zu paarenden Stämme wurden über Nacht zur logarithmischen Wachstumsphase in YPD angezogen. Jeweils gleiche Kulturmengen der zu paarenden Stämme wurden gemischt, in 10 µl Portionen auf YPD-Platten aufgetrocknet und etwa 12 h zur Paarung bei 30 °C inkubiert. Einzelne „Spots“ wurden in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert und geeignete Verdünnungen auf SD-Selektionsplatten ausplattiert, so daß Einzelkolonien resultierten.

Testpaarungen:

Für die Testpaarung wurden 150 µl einer Kultur in der stationären Phase auf YPD ausplattiert. Darauf wurden durch Replikaplattierung die zu testenden Kolonien übertragen. Die Platte wurde zwei Tage bei 30 °C inkubiert und zum Test auf Atmungsdefizienz auf YPEG replika-plattiert und 1-2 Tage bei 30 °C inkubiert. Wurde die Ausgangsplatte auf Platten mit Rasen von verschiedenen Paarungspartnern replikaplatziert, wurde jeweils frischer Samt verwendet.

2.8 Arbeiten mit RNA

Alle Lösungen und Verbrauchsmaterialien zum Arbeiten mit RNA wurden zweimal autoklaviert.

2.8.1 *in vitro* Transkription

Um definierte Transkripte zu erhalten, wurden die Plasmide vor der Transkription linearisiert (3.3.1). Der Ansatz wurde phenolisiert (2.7.5) und die DNA durch Fällern mit Ethanol konzentriert (2.7.4).

Folgende Transkriptions-Systeme wurden verwendet:

T7-Cap-Scribe (Boehringer Mannheim):

Es wurde wie vom Hersteller angegeben verfahren.

T7-Ampli-Scribe (Biozym):

Es wurde wie vom Hersteller angegeben für „Transkription mit Capping“ verfahren, jedoch wurde pro 20 µl Reaktionsansatz 0,6 µl RNasin (33u/µl, Promega) zugesetzt. Die RNA wurde nach Beendigung der Reaktion, wie beim T7-Cap-Scribe-Kit angegeben, aufgereinigt.

SP6-RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim):

Reaktionsansatz:	DNA	3,0 µg
	dNTP-Mix (Biozym)	4,0 µl
	10x-SP6-Puffer (Boehringer Mannheim)	4,0 µl
	7mG(5')G (Cap) (5 mM) (Biozym)	4,0 µl
	RNasin (33 u/µl, Promega)	1,2 µl
	SP6-RNA-Polymerase (Boehringer Mannheim)	1,0 µl
	Wasser	ad 40,0 µl

dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dUTP und 2 mM dGTP

Die RNA wurde nach Beendigung der Reaktion wie beim T7-Cap-Scribe-Kit angegeben aufgereinigt.

Die RNA wurde nach der Aufreinigung in Wasser gelöst und in Portionen bei -70 °C gelagert.

2.8.2 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von Gesamt-RNA wurde der RNeasy-Kit der Firma QIAGEN nach Angaben des Herstellers verwendet. Die isolierte RNA wurde in Portionen bei -70 °C gelagert.

Zum Zellaufschluß fanden dabei folgende Methoden Anwendung:

Halobacterium salinarum:

Ein Aliquot einer Kultur von S9 in PM, das $1,2 \times 10^{10}$ Zellen enthielt, wurde in der Heraeus-Zentrifuge bei 4.000 Upm für 5 min bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgegossen. Die Zellen wurden vorsichtig im verbleibenden Medium resuspendiert und in einen mit flüssigem Stickstoff gekühlten Mörser überführt. Die Zellen wurden 10 min unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff zerrieben und möglichst vollständig in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 250 µl TE wurde mit Schritt 3 der QIAgen RNeasy-Anleitung fortgefahren.

Saccharomyces cerevisiae:

Es wurde nach dem „Enzymatische-Lyse-Protokoll“ in der Standardversion von QIAGEN vorgegangen. Statt 50 units „Yeast lysing enzyme“ wurden 2,5 mg/g Zellen Zymolyase 20T (Seikagaku) verwendet.

2.8.3 RNA/DNA-Hybridisierung zum Nachweis von RNA (Northernblotanalyse)**2.8.3.1 Denaturierende RNA-Gelelektrophorese**

Vor Benutzung wurden die Laufkammer, der Gelträger und der Kamm über Nacht zum Entfernen von RNAsen in 0,1 % (w/v) SDS inkubiert und mit Wasser gründlich ausgespült. Die elektrophoretische Auftrennung von RNA erfolgte in 0,9%igen (w/v) Agarosegelen in 1xMOPS mit 17 % (v/v) Formaldehyd. Pro Gelspur wurden 5 µg Gesamt-RNA oder 5 ng Produkt der *in vitro* Transkription aufgetragen. Die RNA-Proben wurden in 10 µl RNA-Auftragsgemisch 10 min bei 95 °C denaturiert und in Eiswasser abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte für 4 h bei 70 Volt in 1xMOPS.

2.8.3.2 Transfer von RNA auf Nylonfilter (Northernblot)

Die elektrophoretisch aufgetrennte RNA wurde im Vakuumblotter VacuGene XL (Pharmacia) auf den Nylonfilter NY 13 N (Millipore) transferiert. Der Aufbau erfolgte wie von der Herstellerfirma beschrieben. Es wurde ein Vakuum von 50 mbar angelegt.

Folgende Inkubationen wurden durchgeführt:

5 min	Wasser
20 min	Denaturierung (50 mM NaOH, 10 mM NaCl)
10 min	Neutralisieren (0,1 M Tris/HCl pH 7,4)
90 min	Transfer (20xSSC)

Die jeweilige Lösung wurde auf das Gel geschichtet und alle 10-15 min erneuert.

Nach dem Transfer wurde der Filter kurz in 20xSSC getaucht, kurz auf Filterpapier getrocknet und die RNA durch UV-Licht (3 min) auf dem Filter fixiert.

2.8.3.3 RNA/DNA-Hybridisierung

Der Nylonfilter wurde 8 h in Hybridisierungspuffer bei 46 °C inkubiert. Die 14-stündige Hybridisierung erfolgte in Hybridisierlösung mit einer Digoxigenin-markierten DNA-Sonde (random primed labelling) bei 46 °C. Die Detektion erfolgte wie in der Anleitung des „Digoxigenin-labelling and detection kit“ von Boehringer Mannheim beschrieben. Als Chemoluminiszenzsubstrat wurde beim Nachweis von *in vitro* Transkripten CSPD (Boehringer Mannheim) und beim Nachweis von RNA aus *S. cerevisiae* CPD-Star (Boehringer Mannheim) verwendet.

2.9 Arbeiten mit Proteinen

2.9.1 *in vitro* Translation

Die *in vitro* Translation wurde mit dem Retikulozytenlysats-System oder dem Weizenkeimextrakt-System (Promega) durchgeführt.

Reaktionsansatz:	1,0 µg	<i>in vitro</i> -transkribierte RNA
	ad 50,0 µl	Wasser
		10 min 67 °C, Eis
	25,0 µl	Retikulozytenlysats oder Weizenkeimextrakt
	1,0 mM	Aminosäuregemisch ohne Methionin (doppelte Menge bei Verwendung von Weizenkeimextrakt)
	1,4 µl	RNasin (33 u/µl, Promega)
	1,0 mCi	[³⁵ S]Methionin (Amersham)

Translatiert wurde 1,5 h bei 30 °C (Retikulozytenlysats) oder 25 °C (Weizenkeimextrakt).

Zur Lagerung in flüssigem Stickstoff wurden 5 µl eines Gemischs aus je 58 mM L-Methionin und L-Cystein und 10 µl 1,5 M Saccharose zugegeben.

2.9.2 Herstellen von Gesamtzellextrakten im analytischen Maßstab aus *Schizosaccharomyces pombe*

1,5 ml *S. pombe*-Kultur wurden zentrifugiert (Mikrozentrifuge, 13.000 Upm, 2 min), das Zellpellet wurde in 1 ml Protoplastierungspuffer (mit je 1 mg „lysing enzymes“ und Zymolyase 20T) resuspendiert und 30 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zentrifugation (siehe oben) wurde das Zellpellet in 1 ml Harnstoffprobenpuffer resuspendiert und 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Behandlung mit Ultraschall (2x 15 sek mit 30 sek Pause, 0 °C, Labsonic L von Braun, kleine Nadel TL40, 90 Watt output) wurden die Proben erneut 5 min bei 95 °C erhitzt und anschließend zentrifugiert (15 min, 13.000 Upm in der Mikrozentrifuge). Der Niederschlag wurde verworfen und geeignete Aliquots des Überstands mittels SDS-Gelelektrophorese (2.9.7) und Westernblotanalyse (2.9.8) analysiert.

2.9.3 Herstellen von Gesamtzellextrakten im analytischen Maßstab aus *Saccharomyces cerevisiae*

1,5 ml einer Übernachtskultur in YPRaf (OD600 zwischen 1 und 2) wurden auf Eis gekühlt und in der Mikrozentrifuge 1 min mit 13.000 Upm abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Wasser resuspendiert. Nach Zugabe von 150 µl frisch angesetzter 1,85 M NaOH mit 7,4 % (v/v) β-Mercaptoethanol wurde kräftig gemischt und 10-15 min auf Eis inkubiert. Nach Zusatz von 150 µl 50 % (w/v) Trichloressigsäure wurde durch mehrmaliges Umdrehen des Reaktionsgefäßes gemischt und für 15 min auf Eis inkubiert. Die Proteine wurden in der Mikrozentrifuge für 5 min mit 5.000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1,5 ml eiskaltem Aceton gewaschen und in 2 µl 1 M Tris-Base und 70 µl 1xSDS-Probenpuffer resuspendiert. Nach 5-minütiger Inkubation im kochenden Wasserbad wurden unlösliche Bestandteile 5 min in der Mikrozentrifuge mit 13.000 Upm abzentrifugiert.

2.9.4 Herstellen von Extrakten überexprimierter Proteine aus *Escherichia coli*

50 ml dYT-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin wurden mit 1 ml einer Übernachtskultur des Expressionsstamms im selben Medium inokuliert und bis zu einer optischen Dichte von 0,70 bei 600 nm geschüttelt. Die eine Hälfte der Kultur wurde als nicht induzierte Kontrolle bei 30 °C geschüttelt, zur anderen Hälfte wurde 1 mM IPTG zur Induktion zugegeben. Beide Kulturen wurden noch 5 h bei 30 °C geschüttelt.

Zur Aufarbeitung wurden die Zellen abzentrifugiert, in 1 ml Rückfaltungspuffer resuspendiert und bei -20°C eingefroren. Die Zellsuspension wurde aufgetaut und 3x 30 sek auf Eis sonifiziert (Labsonic L von Braun, kleine Nadel TL40, 90 Watt output) mit 45 sek dauernden Pausen auf Eis. Anschließend wurden die Einschlusskörper mit dem Fusionsprotein GST-BOS in der Mikrozentrifuge bei 4 °C für 15 min mit 13.000 Upm abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 1 ml Rückfaltungspuffer resuspendiert und noch 2x 30 sek wie oben beschrieben sonifiziert. Nach Zentrifugation (wie oben) wurde das Pellet in 1,24 ml Rückfaltungspuffer durch kurzes Sonifizieren aufgenommen und bei -20 °C gelagert.

2.9.5 Solubilisierung und Denaturierung von Bacterioopsin

BO aus Purpurmembranen:

Für die Solubilisierung von Bacteriorhodopsin aus gereinigten Purpurmembranen stellte sich SDS in einer Konzentration von 0,5 % (w/v) als bestes Agens heraus, da es das Protein aus der Membran herauslöst und somit der denaturierenden Wirkung zugänglich macht. Es wurde aus dem *Halobacterium salinarum* Stamm S9 gereinigte Purpurmembran in einer Konzentration von 1 µg/µl Solubilisierungsansatz in Wasser eingesetzt. Zur Solubilisierung wurden die Ansätze (20 µl) im Eppendorf-Inkubator mit 1.000 Upm bei 30 °C 1 h geschüttelt. Unlösliche Bestandteile wurden 1 h in der Mikrozentrifuge bei 4 °C mit 13.000 Upm abzentrifugiert.

BO aus Einschlußkörpern als Fusionsprotein mit Glutathion-S-Transferase (GST-BOS):

Um andere Proteine aus den Einschlußkörpern (2.9.4) zu entfernen, fand ein Vorreinigungsschritt durch Inkubation in 8 M Harnstoff statt. Dazu wurden etwa 20 µg isoliertes GST-BOS durch 30 sek Beschallung im Ultraschallbad in 20 µl Harnstoff-Puffer aufgenommen und im Eppendorfinkubator bei 30 °C mit 1.000 Upm für 2 h geschüttelt. Nach Zentrifugation in der Mikrozentrifuge für 1 h bei 4 °C mit 13.000 Upm wurde das Pellet, das das Fusionsprotein enthielt, mit 1 % SDS in Wasser solubilisiert. Dazu wurde der Ansatz 2 h bei 30 °C mit 1.000 Upm im Eppendorfinkubator geschüttelt. Unlösliche Bestandteile wurden für 1 h in der Mikrozentrifuge bei 4 °C mit 13.000 Upm abzentrifugiert.

2.9.6 *in vitro* Testsystem zum Nachweis einer Wechselwirkung von Bacterioopsin mit dem Chaperonin GroEL

Zum Nachweis einer Wechselwirkung von Bacterioopsin (BO) mit dem Chaperonin GroEL wurden die solubilisierten Bacterioopsin-Proteine (2.9.5) verwendet. Die Solubilisierungsansätze wurden 1:100 in Rückfaltungspuffer mit aktivem GroEL-Komplex (in äquimolarer Menge zu BO) verdünnt. Entsprechende Kontrollen wurden ebenso behandelt, jedoch ohne Chaperonin. Bei der Verdünnung sollte die Konzentration des SDS so herabgesetzt werden, daß ungebundenes BO ausfällt. Wird dem Verdünnungsansatz GroEL zugesetzt, sollte bei einer Wechselwirkung zwischen GroEL und BO ein Teil von BO in Lösung bleiben. Wird einem Komplex aus GroEL, GroES und gebundenem Protein ATP zugeführt, wird das spezifisch im GroEL/ES Komplex gebundene Protein unter ATP-Verbrauch freigesetzt. Ist das freigesetzte Protein korrekt gefaltet, verläßt es den GroEL/ES-Komplex. Ist es falsch oder unvollständig gefaltet, wird es erneut gebunden. Im Fall von BO wäre Präzipitation zu erwarten, so daß Versuche mit Zusatz von GroES und ATP durchgeführt wurden. GroES wurde im 3-fachen Überschuß und/oder 2 mM ATP eingesetzt.

Für die Verdünnungsansätze wurde GroEL (Boehringer Mannheim), gegebenenfalls GroES (Boehringer Mannheim) und/oder ATP in 100 µl Rückfaltungspuffer vorgelegt und unter Schütteln 1 µl denaturiertes Bacterioopsin zugegeben. Die Ansätze wurden 1 h bei 1.000 Upm im Eppendorf-Inkubator bei 37 °C geschüttelt. Nach 1-stündiger Zentrifugation bei 4 °C in der Mikrozentrifuge mit 13.000 Upm wurden sowohl der Überstand als auch das Pellet mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.9.6) und anschließender Westernblotanalyse (2.9.8) analysiert.

2.9.7 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht erfolgte mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (LAEMMLI 1970) in der vertikalen Gelapparatur PROTEAN II xi (Bio-Rad). Für das Trenngel wurde eine Acrylamidkonzentration von 15 % (w/v) und für das Sammelgel von 3,8 % (w/v) eingesetzt. Sammel- und Trenngel wurden entsprechend folgender Angaben angesetzt:

Trenngel:

15,0 % (w/v) Acrylamid
0,4 % (w/v) Bisacrylamid
0,1 % (v/v) Temed
in Trenngelpuffer

Sammelgel:

3,8 % (w/v) Acrylamid
0,1 % (w/v) Bisacrylamid
0,1 % (v/v) Temed
in Sammelgelpuffer

Die Polymerisation wurde jeweils durch Zusatz von 0,1 % (w/v) Ammoniumpersulfat gestartet. Zuerst wurde das Trenngel zwischen zwei Glasplatten (16x16 cm, Abstand 1,5 mm) zu einer Höhe von 11,5 cm gegossen. Die Oberfläche wurde mit Wasser überschichtet, und das Gel zur Polymerisation 40 min stehengelassen. Das Wasser wurde entfernt, und das Sammelgel aufgegossen. Nach der Polymerisation wurde das Gel in die Gelapparatur eingesetzt, und diese mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinproben wurden mit dem gleichen Volumen 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer versetzt oder, wenn es sich um Pellets handelte, in 1-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer aufgenommen und 7 min bei 95 °C denaturiert. Die elektrophoretische Trennung erfolgte über Nacht bei konstantem Strom von 12 mA. Sobald das im Probenpuffer enthaltene Bromphenolblau das Ende des Trenngels erreichte, wurde die Elektrophorese beendet, und das Gel gefärbt (2.9.7.1).

Wenn sehr kleine Polypeptide (kleiner als 14 kD) aufzutrennen waren, wurde die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach SCHÄGGER, VON JAGOW (1987) wie beschrieben durchgeführt. Dabei wurde der Geltyp 10 % T, 3 % C eingesetzt (T=Konzentration von Acrylamid und Bisacrylamid, C=Anteil von Bisacrylamid von T). Probenvorbereitung, Färbung und Autoradiographie (2.9.10) erfolgten wie für das System nach LAEMMLI oben beschrieben.

2.9.7.1 Färben von SDS-Polyacrylamid-Gelen

Zur Färbung von Gelen standen zwei Methoden zur Verfügung: Coomassie und Sypro-orange (Bio-Rad). Dabei hat die Färbung mit Sypro-orange den Vorteil, daß anschließender Westernblot noch möglich ist.

Färben mit Coomassie:

Das Gel wurde für 20 min in Coomassie-Färbelösung gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wurde mit 10 % (v/v) Essigsäure ausgewaschen.

Färben mit Sypro-Orange:

Das Gel wurde 2,5 h in einer 0,02%igen (v/v) Lösung von Sypro-Orange in Westernblot-Puffer im Dunkeln gefärbt. Dann wurde kurz mit 7,5 % (v/v) Essigsäure gewaschen. Das Sichtbarmachen der Proteinbanden erfolgte unter UV-Licht.

2.9.8 Immunochemischer Nachweis von Proteinen (Westernblotanalyse)

Zur immunochemischen Detektion von Proteinen im Westernblotverfahren wurden die Proteine nach Auftrennung im SDS-Polyacrylamid-Gel auf Membranen übertragen. Der spezifische Nachweis von Proteinen erfolgte über Antikörper. Zur Detektion wurde ein Peroxidase-gekoppelter Sekundär-Antikörper eingesetzt. Dieser setzte ein Chemoluminiszenz-Substrat frei, dessen Leuchten mit Röntgenfilmen festgehalten wurde.

2.9.8.1 Transfer von Proteinen auf Nitrocellulose- oder PVDF-Membranen

Der Transfer von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen erfolgte auf Nitrocellulose-Membranen (ECL, Amersham) oder PVDF-Membranen (Immobilon P, Millipore) im „semi-dry“-Verfahren in einer Transferkammer der Firma Hoelzel. Die Membranen und 8 Lagen 3MM Whatman Papier wurden auf Trenngel-Größe zugeschnitten. Die Nitrocellulose-Membran wurde vor dem Transfer mit Blot-Puffer benetzt, die PVDF-Membran zunächst mit Methanol und anschließend mit Blot-Puffer. Das Trenngel wurde für 5 min mit Blot-Puffer äquilibriert. Je 4 Lagen des Whatman-Papiers wurden mit Blot-Puffer durchfeuchtet. Die Graphitplatten der Transferkammer wurden gut mit Blot-Puffer befeuchtet und die einzelnen Lagen wie folgt luftblasenfrei geschichtet:

Kathode (- Pol)

4 Lagen Whatman Papier

Trenngel

Transfermembran

4 Lagen Whatman Papier

Anode (+ Pol)

Der Transfer erfolgte für 2,5 h bei 1 mA/cm² Trenngel.

2.9.8.2 Immunochemische Detektion von auf Membranen transferiertem Bacterioopsin

Zunächst wurde die Blotmembran zum Sichtbarmachen der transferierten Proteine mit einer 0,2%igen (w/v) Ponceau S-Lösung in 3 % (w/v) Trichloressigsäure 10 min lang gefärbt. Nicht gebundener Farbstoff wurde mit Wasser abgewaschen. Durch zweimaliges jeweils 10minütiges Waschen der Membran in TBS wurde vollständig entfärbt.

Die Membran wurde 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C mit 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS abgesättigt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper in 10 % (w/v) Magermilchpulver in TBS erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur oder bei 4 °C über Nacht. Folgende gegen den C-terminalen Teil von Bacterioopsin gerichtete polyklonale Antikörper fanden in folgender Verdünnung Verwendung:

αBR (affinitätsgereinigt (2.9.9), G. Rosenberg, 30.09.1993)	1:2.500
αBR (VH, V. Hildebrandt)	1:200

Die Membran wurde 3x mit TBS-T (TBS + 0,1 % (v/v) Tween 20) und 1x mit TBS für je 15 min bei Raumtemperatur gewaschen. Peroxidase gekoppelter Anti-Kaninchen Antikörper aus der Ziege (Sigma) wurde in 5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS für 1 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Dabei wurden je nach Detektionslösung folgende Verdünnungen eingesetzt:

1:10.000 ECL (Amersham)

1:20.000 Super Signal (Pierce) oder Super Signal Ultra (Pierce)

Die Membran wurde wie nach Inkubation mit dem ersten Antikörper gewaschen.

Zur Detektion wurden die oben aufgeführten Substrate nach Herstellerangaben eingesetzt. Röntgenfilme (XAR oder Biomax-ML, Kodak) wurden je nach Leuchtintensität 10 sek bis 2 h exponiert. Die Filme wurden nach Herstellerangabe per Hand mit Lösungen der Firma Kodak entwickelt.

2.9.9 Antikörperaufreinigung über Westernblot

Da das von G. Rosenberg hergestellte Antiserum bei Westernblots Kreuzreaktionen mit anderen Proteinen zeigte, mußte der spezifische Antikörper gegen den C-Terminus von Bacterioopsin gereinigt werden.

20 Gelspuren mit je 9,3 µg Purpurmembran aus *Halobacterium salinarum* S9 wurde wie unter 2.9.7 beschrieben auf Nitrocellulose transferiert. Nach Färben mit PonceauS (2.9.7.2) wurden die Bacterioopsin entsprechenden Banden ausgeschnitten und durch mehrmaliges Waschen in TBS entfärbt. Die Filterstreifen wurden über Nacht bei 4 °C in 3 % (w/v) BSA und 1 % (w/v) Magermilchpulver in TBS abgesättigt. Dann wurde 3x 5 min mit TBS bei Raumtemperatur gewaschen. Anschließend wurden die Filterstreifen mit einem Skalpell in kleine Stücke geschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 ml Antiserum mit 0,02 % (w/v) Natriumazid wurde 23 h bei 4 °C im Eppendorfkubator mit 500 Upm geschüttelt. Das Serum wurde abgenommen, und die Streifen wurden 6x 20 min mit je 1,7 ml TBS bei Raumtemperatur gewaschen. Die Elution des Antikörpers erfolgte unter Schütteln in 500 µl 0,1 M Glycin, pH 2,4 für 5 min bei 4 °C. Die Lösung wurde abgenommen und mit 30 µl 1 M Tris/HCl, pH 9,4 neutralisiert. Eine zweite Elution erfolgte unter Schütteln für 1 min mit 250 µl 0,1 M Glycin, pH 2,4. Beide Eluate wurden unter Zusatz von weiteren 10 µl 1 M Tris/HCl, pH 9,4 vereinigt. Das Eluat wurde in TBS in Centricon 10-Konzentratoren (Amicon) durch Zentrifugation mit 5.000 x g bei 4 °C umgepuffert und nach Zusatz von 0,02 % (w/v) Natriumazid bei 4 °C gelagert.

2.9.10 Autoradiographie

Nitrocellulosemembranen mit radioaktiv-markierten Proteinen wurden getrocknet und mit eine Folie abgedeckt. Darauf wurden Röntgenfilme (X-omat AR, Kodak) gelegt. Diese wurden wie vom Hersteller der Entwicklerchemikalien (Kodak) angegeben entwickelt.

Um radioaktiv markierte Proteine im SDS-Polyacrylamid-Gel sichtbar zu machen, wurde das Trenngel mit Coomassie gefärbt und anschließend 3 h in 15 % (v/v) Glycerin geschüttelt, um das Reißen des

Gels beim Trocknen zu verhindern. Getrocknet wurde 2,5 h 50 °C im PAGE-Zyklus nach Herstellerprotokoll auf einem Filterpapier im beheizbaren Vakuum-Geltrockner (Bio-Rad). Zur Dokumentation wurden Röntgenfilme aufgelegt.

2.10 Arbeiten mit Mitochondrien

2.10.1 Isolierung von Mitochondrien aus Hefezellen

Mitochondrien wurden nach Zellaufschluß durch differentielle Zentrifugation in Anlehnung an das von DAUM (1982) entwickelte Verfahren aus Zellen von *S. cerevisiae* oder *S. pombe* isoliert.

Die Anzucht der Zellen für die Isolation von Mitochondrien für *in vitro* Import Experimente erfolgte in YPGlyc-Medium. Sollten Mitochondrien zur Analyse des Proteingehalts isoliert werden, wurden die Zellen in YPGal angezogen. Die Kulturen wurden 14 bis 18 h bei 30 °C geschüttelt (150 Upm), bis eine Optische Dichte von 1-3 erreicht war.

Die Hefezellen einer Kultur von 1,3 l oder 5 l wurden bei Raumtemperatur in 400 ml Bechern mit 2.600 x g abzentrifugiert. Die Zellen wurden gewaschen, indem sie in destilliertem Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in 0,1 M Tris/SO₄, pH 9,4 mit 10 mM DTT (2 ml pro g Frischgewicht) resuspendiert und 15 min bei 25 °C leicht geschüttelt. Die Zellen wurden mit 2.600 x g abzentrifugiert und einmal mit 1,2 M Sorbitol gewaschen. Zum Abbau der Zellwände wurden sie in Zymolyase-Puffer (7 ml pro g Frischgewicht) mit 2-3 mg Zymolyase 20T (Seikagaku) pro g Frischgewicht 30-60 min bei 30 °C unter leichtem Schütteln inkubiert. Die Reaktion der Zymolyase wurde überprüft, indem 10 µl der Suspension in 990 µl Wasser oder 1,2 M Sorbitol geschüttelt wurden. Anschließend wurde die Optische Dichte bei 578 nm bestimmt. War der Wert in Sorbitol 10x (bei Arbeit mit *S. cerevisiae*) oder 2x (bei Arbeit mit *S. pombe*) höher als in Wasser, wurde die Zymolyase-Behandlung gestoppt. Bei Verwendung von *S. pombe*-Zellen wurde noch eine 2-minütige Behandlung mit Novozym (3-4 mg pro g Frischgewicht) angeschlossen. Die Sphäroplasten wurden einmal mit 1,2 M Sorbitol gewaschen und dann durch osmotischen Schock geöffnet. Dazu wurde in 3,5 ml Homogenisierungspuffer pro g Frischgewicht resuspendiert. Die Suspension wurde auf Eis gekühlt und in einem leichtgängigen Dounce-Homogenisator mit 20 Strichen des Stempels homogenisiert. Zur Abtrennung der nicht lysierten Zellen und der schweren Zellbestandteile wurde bei 1.300 x g 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in 3,5 ml Homogenisierungspuffer im Dounce-Homogenisator mit 20 Strichen des Stempels homogenisiert und wie nach dem ersten Homogenisieren zentrifugiert. Die Überstände wurden vereinigt und 5 min bei 2.700 x g und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde zur Isolierung der Mitochondrien 10 min mit 11.000 x g bei 4 °C zentrifugiert. Das Mitochondrienpellet wurde in 25 ml SEM mit 0,8 mM PMSF vorsichtig resuspendiert. Es wurde bei 4 °C 5 min mit 2.700 x g abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde im letzten Schritt erneut mit 11.000 x g bei 4 °C abzentrifugiert. Die isolierten Mitochondrien wurden in wenig SEM resuspendiert und eine Proteinbestimmung (2.10.2) durchgeführt. Die Mitochondriensuspension wurde auf 5 mg Protein/ml in SEM verdünnt, in 50-100 µl Portionen in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

2.10.2 Proteinbestimmung

Die Bestimmung von Proteinen aus Mitochondrien wurde nach der von BRADFORD (1976) beschriebenen Methode durchgeführt. 10 µl und 20 µl 1:10 in SEM verdünnter Mitochondrien-suspension wurden mit 2,5 ml eines 1:5 in Wasser verdünnten Bio-Rad-Protein-Assay-Farbstoff-konzentrats (Bio-Rad) gemischt und 10 min inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion bei 595 nm gegen reine Farbstoff-Verdünnung gemessen. Als Standard für die Eichkurve wurde Immunglobulin G (7,5 bis 60 µg/2,5 ml Farbstoff-Verdünnung) (Bio-Rad) verwendet.

2.10.3 *in vitro* Import von Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien

Im Anschluß an die Synthese im Retikulozytenlysat wurden die Vorstufenproteine posttranslational in isolierte Mitochondrien von *S. cerevisiae* bzw. *S. pombe* importiert.

Die Importansätze hatten ein Volumen von 100 µl. Die Standardansätze enthielten:

6,0 µg	Mitochondrien
2,0 µl	[³⁵ S]-markiertes Vorstufenprotein in Retikulozytenlysat
2,0 mM	NADH
80,0 mM	KCl
5,0 mM	MgCl ₂
20,0 mM	Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,2)
0,1 mM	ATP (pH 7,0)
in BSA-Puffer	

Durch Kontrolle mit Valinomycin-entkoppelten Mitochondrien konnte geprüft werden, ob von den Mitochondrien durch eine Schädigung der Membran Prozessierungsenzym freigesetzt worden war, oder ob die Prozessierung des Vorstufenproteins als Kriterium für Import herangezogen werden konnte. Die Inkubation der Importansätze erfolgte bei 25 °C für 30 min. Danach wurde der Import durch Zusatz von 1 µM Valinomycin gestoppt.

Durch Inkubation mit ProteinaseK ließ sich die Translokation des Proteins ins Mitochondrium demonstrieren. Hierbei wurde die eine Hälfte des Importansatzes ohne ProteinaseK, die andere Hälfte mit 2 µg ProteinaseK 10 min auf Eis inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde 0,2 mM PMSF zu beiden Ansätzen zugegeben. Nach weiteren 5 min auf Eis wurden die Mitochondrien reisoliert (Zentrifugation in der Mikrozentrifuge mit 13.000 Upm bei 4 °C). Die Probengefäße wurden einmal mit 200 µl SEM gespült (ohne die Mitochondrien zu resuspendieren) und nochmals zentrifugiert, um überschüssiges BSA zu entfernen. Die Proben wurden mit 25 µl 1x SDS-Probenpuffer 7 min lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Nach 5-minütiger Inkubation bei 95 °C wurden sie durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2.9.7) mit anschließender Autoradiographie (2.9.10) analysiert.

Bei einigen Versuchen wurde zum Import mit Harnstoff denaturiertes Vorläuferprotein eingesetzt. Dazu wurden 15 µl Translationsansatz von coxIV-BOP in Retikulozytenlysat bei 4 °C unter Schütteln in 6 µl Schritten mit einer gesättigten Lösung von Ammoniumsulfat in MOPS-Puffer (pH 7,2) versetzt, bis eine Sättigung von 66 % an Ammoniumsulfat erreicht war. Nach weiterer 20minütiger Inkubation

auf Eis wurde 10 min bei 4 °C mit 13.000 Upm in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Das Pellet dieser Zentrifugation, das coxIV-BO enthielt, wurde in 10 µl Harnstoffpuffer (120 mg Harnstoff, 130 µl Wasser, 12,5 µl 1 M MOPS pH 7,2 und 5 µl 0,1 M DTT) aufgenommen. Davon wurden pro 100 µl Importansatz 3 µl eingesetzt.

3 ERGEBNISSE

Bisher wurde Bacterioopsin (BO) mit verschiedenen mitochondrialen Signalsequenzen, zum Beispiel der mitochondrialen Signalsequenz coxIV (Signalpeptid der Untereinheit IV der Cytochrom-c-Oxidase) in *Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) exprimiert. Dies führte zwar zum Import und funktionalen Einbau von BR in die innere Mitochondrienmembran, jedoch wurde der größte Teil des exprimierten Proteins in die Plasmamembran eingebaut (HOFFMANN et al., 1994).

Um mehr BR in die Mitochondrien zu leiten, wurden eine Reihe von Versuchsansätzen verfolgt, die in den folgenden Abschnitten beschrieben werden:

Eine weitere mitochondriale Präsequenz (3.1) und der Import von BR-Teilstücken (3.2) wurden getestet.

Um für den mitochondrialen Import von BR wichtige Faktoren näher analysieren zu können, wurden *in vitro* Untersuchungen zum Import in Mitochondrien durchgeführt (3.3). Im Rahmen dieser Experimente wurde die Wechselwirkung zwischen denaturiertem BR und Chaperonen untersucht (3.4).

Ein für BR codierendes Gen wurde durch Biolistische Transformation in Mitochondrien gebracht, um die Expression von BR in diesem Kompartiment und den Einbau in die innere Mitochondrienmembran zu ermöglichen (3.5).

3.1 *in vivo* Import von Bacterioopsin in die innere Mitochondrienmembran von *Schizosaccharomyces pombe* mit der Signalsequenz SU9

Zur Verbesserung des *in vivo* Imports von Bacterioopsin (BO) in die innere Mitochondrienmembran wurde die Sequenz für das Signalpeptid der Untereinheit 9 der F₁-ATPase aus Mitochondrien von *Neurospora crassa* (SU9) gewählt. Dieses Signalpeptid soll einen besonders effizienten Import in Mitochondrien von *S. cerevisiae* ermöglichen (persönliche Kommunikation mit J. Rassow, Universität Freiburg).

Die Signalsequenz SU9 wurde mittels PCR amplifiziert und vor das bop-Gen (codierend für BO mit BO eigener Präsequenz) in den Expressionsvektor pNEU kloniert. pNEU (Abb. 7) ist ein Derivat von pREP1 (MAUNDRELL, 1993). Die Expression von Genen steht unter Kontrolle des Promotors des nmt1-Gens und ist damit Thiamin regulierbar. Bei genügend Thiamin im Zellinneren ist die Expression reprimiert. Bei völligem Thiaminmangel ist der Promotor vollständig dereprimiert. Der nmt1-Promotor zeigt unter diesen Bedingungen eine sechsmal höhere Aktivität als der adh-Promotor.

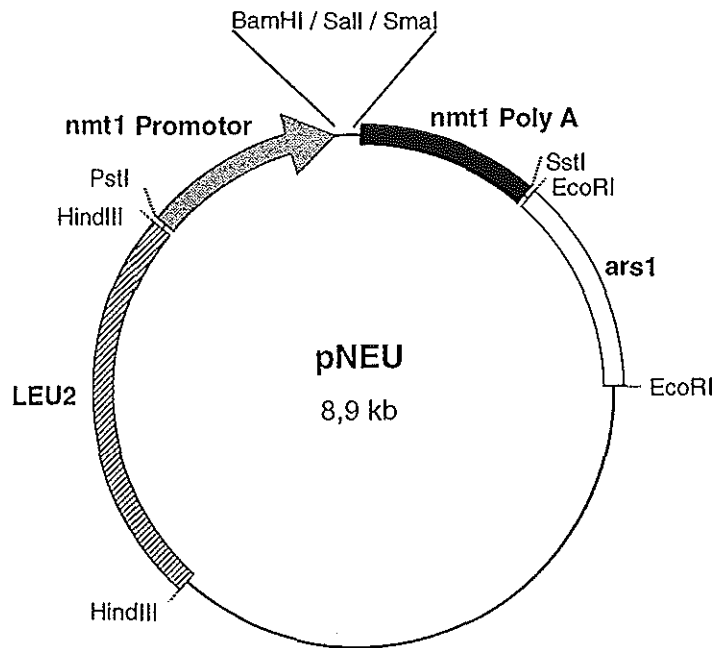


Abb. 7: pNEU

pNEU mit dem Genkonstrukt bestehend aus SU9 und bop wurde in *S. pombe* transformiert. Die Expression von BO wurde über Westernblotanalyse untersucht. Damit BR in Mitochondrien funktional vorliegt, muß der Chromophor Retinal zugeführt werden. Unter dieser *in vivo*-Regeneration von BR versteht man die Wiederherstellung der Protonenpumpaktivität von BR durch Bindung des lichtabsorbierenden Chromophors all-*trans*-Retinal als Schiff'sche Base an Lys216 im BO-Molekül. HILDEBRANDT et al. (1989) zeigten, daß die *in vivo*-Regeneration von BR in *S. pombe* durch wiederholte Retinalzugabe ins Kulturmedium erzielt werden kann. Dies zeigt sich durch Rotfärbung der Hefezellen nach Pelletierung.

3.1.1 Herstellen des Genkonstrukts bestehend aus SU9-Präsequenz und bop-Gen

Die Amplifizierung der SU9-Präsequenz erfolgte mittels PCR (2.7.6). Als Template wurde das Plasmid pGEM4Su9DHFR (PFANNER et al., 1987) verwendet, als Primer die Oligonukleotide SU9R und SU9H. Die Klonierung des PCR-Produkts erfolgte mit dem Sure Cloning Kit (Pharmacia). Die Richtigkeit der Sequenz wurde durch Sequenzierung (2.7.7) überprüft.

Das bop-Gen wurde mit BamHI und HindIII aus pUC19-coxIV-bop (HOFFMANN, 1994) ausgeschnitten und in den mit denselben Enzymen geschnittenen Vektor pGEM3z kloniert. Der so erhaltene Vektor wurde mit EcoRI und BamHI geschnitten und mit SU9 ligiert. SU9 liegt im resultierenden Plasmid im gleichen Leseraster wie bop am 5'-Ende vor bop. Das Hybridgen SU9-bop wurde in die SmaI Schnittstelle des Vektors pNEU (V. Hildebrandt, Abb. 7) kloniert, so daß die Expression unter Kontrolle des nmt1-Promotors steht (pLF1).

Um eine gleichwertige Kontrolle zu haben, wurde die coxIV-bop-Fusion über EcoRI und HindIII aus pUC19-coxIV-bop (HOFFMANN, 1994) isoliert. Die Enden wurden zum Erzeugen glatter Enden mit Klenow behandelt, und das Hybridgen in die SmaI-Restriktionsschnittstelle von pNEU inseriert, so daß die Expression unter Kontrolle des nmt1-Promotors steht (pLF2).

3.1.2 Expression von Genkonstrukten aus BO-Gen mit mitochondrialen Präsequenzen und *in vivo* Regeneration von BR

Zur Expression von SU9-BOP (Vorläufer von BO mit N-terminaler SU9-Signalsequenz) wurden die Plasmide pLF1 und pLF2 (3.1.1) in den *S. pombe* Stamm „leu“ transformiert (2.7.10). Die Expression der Fusionsproteine erfolgte in EMM-Medium mit Zusatz von all-*trans*-Retinal. Anschließend wurden Mitochondrien aus den Zellen isoliert (2.10.1) und die mitochondrialen Proteine mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Westernblotanalyse auf ihren BO-Gehalt untersucht (Abb. 8).

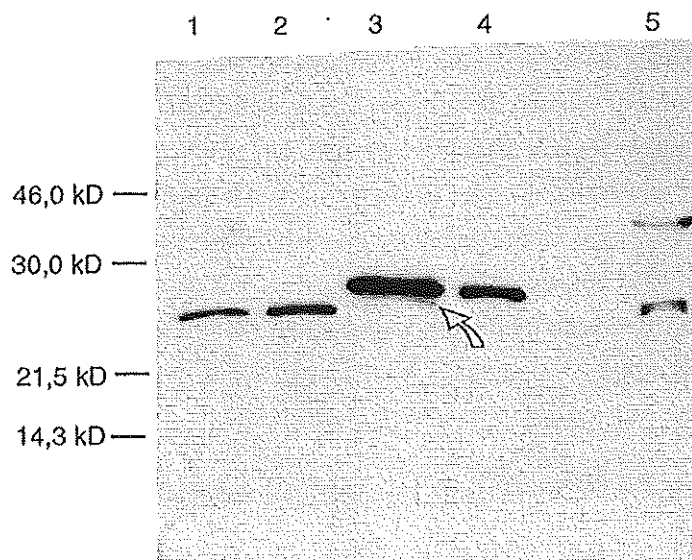


Abb. 8: Westernblot-Analyse nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (15%iges Trenngel) mitochondrialer Proteine:
 Der Nachweis von BO erfolgte mit affinitäts-gereinigtem Antikörper in einer 1:2.500 Verdünnung. Die Detektion erfolgte mit ECL (Amersham).
 Spuren 1 und 2: 100 ng und 200 ng Purpurmembran
 Spuren 3-6: mitochondriale Proteine aus Zellen die ein BO-Hybridprotein exprimieren:
 Spuren 3 und 4: 60 µg und 20 µg coxIV-BOP
 Spur 5 : 75 µg SU9-BOP

Die Westernblot-Analyse (Abb. 8) zeigt, daß sowohl coxIV-BOP als auch SU9-BOP exprimiert werden konnten. Zum Größenvergleich ist in den Spuren 1 und 2 Purpurmembran mit maturem BR aufgetragen. In den Spuren mit mitochondrialem Protein aus *S. pombe* mit coxIV-bop Genkonstrukten (Spuren 3 und 4) ist eine Doppelbande zu erkennen. Die obere Bande entspricht BOP

(262 Aminosäuren, 28,3 kD) mit *coxIV* Präsequenz (22 Aminosäuren, 3,0 kD), die sehr schwache untere Bande (in Abb. 8 mit Pfeil markiert) stammt von BOP (vergleiche auch HOFFMANN et al., 1994). Ähnliches gilt für das Protein aus *S. pombe* mit SU9-bop Genkonstrukten (Spur 5). Hier entspricht die oberste Bande BOP mit SU9 Signalsequenz (71 Aminosäuren, 6,0 kD). Die darunter liegende Bande konnte als BOM (BO in maturer Form) identifiziert werden.

Aus Abbildung 10 geht hervor, daß bei vergleichbaren geladenen Proteinmengen das größere Hybridprotein SU9-BOP in wesentlich geringeren Mengen als das Hybridprotein *coxIV*-BOP in isolierten Mitochondrien nachweisbar ist. Dies kann auf unterschiedlich starke Genexpression oder unterschiedlich starken Abbau der Hybridproteine zurückgeführt werden.

Bei Zugabe von all-*trans*-Retinal zur *in vivo* Regeneration von BR (3.1) zeigten Zellpellets von *S. pombe* ohne BO-Gen eine weiße Färbung mit Gelbanteil durch das aufgenommene Retinal. Die Zellpellets der *coxIV*-BOP oder SU9-BOP exprimierenden Klone zeigten eine deutliche Rosafärbung.

Es konnte die Expression von BO mit mitochondrialer Präsequenz der Untereinheit 9 der F₁-ATPase aus *Neurospora crassa* (SU9-BOP) in *S. pombe* gezeigt werden. Diese war jedoch schwächer als die Expression des Hybridproteins aus BO mit mitochondrialer Präsequenz der Untereinheit IV der Cytochrom-c-Oxidase aus *S. cerevisiae* (*coxIV*-BOP). In beiden Fällen führte die *in vivo* Regeneration des BR zur Rosafärbung der Zellen.

3.2 *in vivo* Import von BO in Teilstücken

CLAROS et al. (1995) exprimierten Apocytochrom *b*, ein mitochondrial codiertes Membranprotein, als Fusion mit mitochondrialen Signalsequenzen im Cytoplasma der Hefe. Die mitochondrialen Signalsequenzen sollten das Protein ins Mitochondrium dirigieren. Sie stellten dabei fest, daß in ihrem Fall nicht mehr als vier Helices zusammen ins Mitochondrium importiert werden können. Da es sich bei BR um ein sehr hydrophobes Protein mit sieben Transmembranhelices handelt, könnte der schlechte Import von BR in Hefemitochondrien auch mit der Anzahl der zu importierenden Helices in Zusammenhang stehen. LIAO et al. (1984) zeigten, daß BR-Teilstücke *in vitro* zu vollständigem BR rekonstituiert werden können. Daher sollte BO in zwei Teilstücken mit jeweils der *coxIV* Signalsequenz importiert werden: *coxIV*-AB (Helices A und B) und *cox IV*-CG (Helices C bis G). Bei beiden Genkonstrukten wurde an das 3'-Ende im Leseraster die Sequenz für die Aminosäurenabfolge MGRS6His gesetzt. Diese C-terminale Verlängerung ermöglicht den Nachweis der Proteine über einen gegen diese Sequenz gerichteten Antikörper.

Es wurde wie folgt vorgegangen:

1. Amplifizierung der BO-Teilstücke und Klonierung dieser Sequenzen hinter die *coxIV*-Sequenz in Expressionsvektoren
2. Transformation von *S. pombe* mit diesen Expressionsvektoren und Untersuchung der BO-Expression mittels Westernblotanalyse
3. *in vivo* Regeneration von BO mit all-*trans*-Retinal

3.2.1 Herstellen der Genkonstrukte aus BO-Teilstücken mit coxIV-Signalsequenz

Herstellen von coxIV-AB:

Dieses DNA-Fragment wurde über PCR mit dem Plasmid pGEM3zbop (3.1.1) als Template und den Oligonukleotiden COXAB und ENDEAB (2.7.6; 2.6) als Primer hergestellt. Anschließend wurde das PCR-Produkt in die SmaI-Restriktionsschnittstelle von pUC18 mit dem Sure Cloning Kit (Pharmacia) eingefügt. Es resultierte pUC18CAB mit einem Gen bestehend aus 96 Nukleotiden der coxIV Signalsequenz und 291 Nukleotiden der Sequenz für den AB-Teil sowie einer für die Aminosäureabfolge MRGS6His kodierenden Sequenz am 3'-Ende. Die Überprüfung der Sequenz erfolgte mittels Sequenzierung (2.7.7).

Das coxIV-AB-Genkonstrukt wurde mit EcoRI am 5'-Ende und HindIII am 3'-Ende aus pUC18 ausgeschnitten. Es wurden mit Klenow glatte Enden erzeugt. Dieses DNA-Stück wurde in den mit SmaI geschnittenen Expressionsvektor pNEU (3.1) kloniert. Der so entstandene Expressionsvektor mit richtiger Orientierung des Fragments zum nmt1-Promotor erhielt den Namen pLF3.

Herstellen von coxIV-CG:

Zur Herstellung dieses Konstruktes wurde der CG-Anteil über PCR amplifiziert. Als Template wurde pGEM3zbop (3.1.1) eingesetzt. Als Primer wurden die Oligonukleotide COXCD und ENDECD (2.7.6; 2.6) verwendet. Hierbei wurde der hintere Teil des BO-Gens, der 546 Nukleotide mit zusätzlichen 30 Nukleotiden der Sequenz für MRGS6His umfaßt, amplifiziert. Mit den Primern wurde am 5'-Ende eine SmaI Schnittstelle und am 3'-Ende eine HindIII Schnittstelle eingeführt. Das PCR-Produkt wurde mit dem Sure Cloning Kit (Pharmacia) in die SmaI-Schnittstelle von pUC18 kloniert (pUC18CG). Das DNA-Fragment wurde mit SmaI und HindIII isoliert und in den Vektor pEH8 (HURT et al., 1984), der zuvor mit EcoRV und HindIII geschnitten wurde, hinter die in diesem Vektor enthaltene coxIV-Signalsequenz kloniert (pEH8CCG). Aus dem daraus resultierenden Plasmid wurde das coxIV-CG Genkonstrukt mit EcoRI und HindIII ausgeschnitten und in die SmaI Schnittstelle von pREP2 (MAUNDRELL, 1993, Abb. 9) (pLF4). Im Vektor pREP2 liegt im Vergleich zu pNEU eine im Verhältnis zum nmt1-Promotor umorientierte multiple Klonierungsstelle vor. Des weiteren ist der Marker Leu2 in pREP2 durch den Marker ura4⁺ ersetzt.

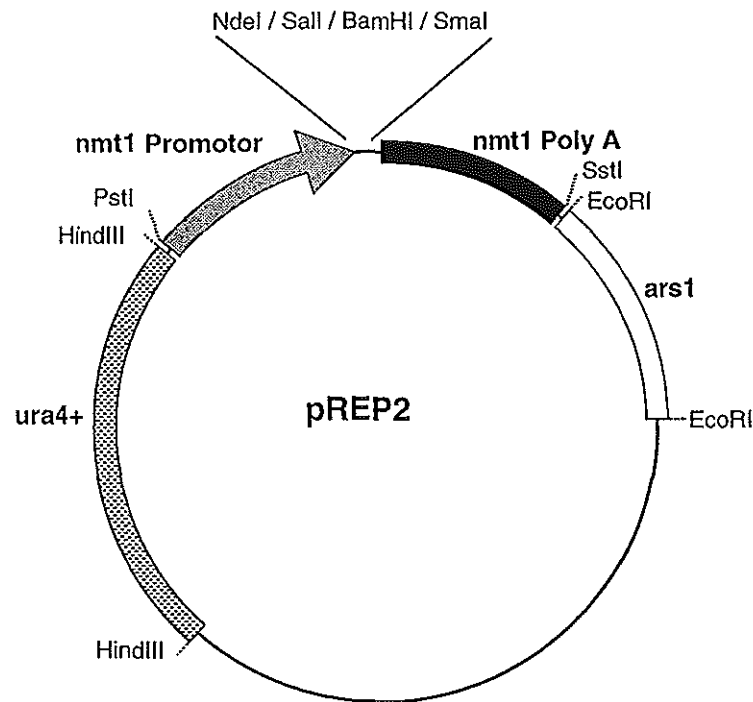


Abb. 9: pREP2

3.2.2 Expression von coxIVAB und coxIVCG und *in vivo* Regeneration von BR

Die Plasmide pLF3 und pLF4 (Kapitel 3.2.1) wurden sowohl getrennt als auch zusammen in den *S. pombe* Stamm „UL“, ein Stamm mit Mangelmutationen in der Leucin- und Uracil-Produktion, transformiert (2.7.10). Da pLF2 den Leu2-Marker und pLF3 den *ura4⁺*-Marker enthält, ist eine Selektion auf beide Vektoren über den jeweiligen Marker im Stamm „UL“ möglich.

Die Expression der BO-Teilstücke erfolgte wie in Kapitel 2.4.2.3 beschrieben. Für die Auftrennung im SDS-Gel wurden Gesamtzellextrakte hergestellt (2.9.3). Die Proteine wurden auf PVDF transferiert, und das BO wurde immunochemisch nachgewiesen (Kapitel 2.9.8) (Abb. 10).

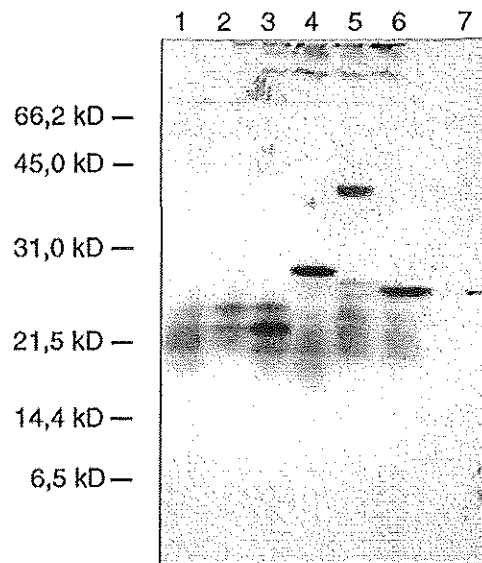


Abb. 10: Westernblot nach SDS-Gelelektrophorese (15%iges Trenngel) von Gesamtzellextrakten von *S. pombe* mit verschiedenen BO-Genkonstrukten. Der immunochemische Nachweis von BO erfolgte mit dem Antikörper VH in einer Verdünnung von 1:500. Zur Detektion wurde das Chemoluminiszenz-Substrat Super Signal (Pierce) eingesetzt.

Spuren 1 bis 6: Gesamtzellextrakte exprimierender Zellen:
 Spur 1: coxIV-AB
 Spur 2: coxIV-CG
 Spur 3: coxIV-AB und coxIV-CG
 Spur 4: coxIV-BOP
 Spur 5: SU9-BOP
 Spur 6: BOP
 Spur 7: Purpurmembran

Abbildung 10 zeigt die Westernblot-Analyse von Gesamtzellextrakten von Hefen, die verschiedene BO-Genkonstrukte exprimieren. Zum Vergleich wurde Purpurmembran und Gesamtzellextrakt von BOP (im Vektor pNEU) und von coxIV-BOP exprimierenden Zellen aufgetragen.

Spur 7 zeigt die Bande des prozessierten Bacteriorhodopsin (BOM, 26,5 kD) aus halobakterieller Purpurmembran. WÖLFER et al. (1988) fanden bei Analyse der halobakteriellen Purpurmembran über der Bande des reifen BO zwei weitere schwächere Banden, von denen sie die oberste Prä-BO (BOP, 28,3 kD) und die mittlere einem Prozessierungsintermediat von BO zuordneten. Das Fehlen dieser Banden in Spur 7 kann auf eine zu geringe Proteinmenge zurückzuführen sein. In Spur 6 ist Gesamtzellextrakt BOP exprimierender Zellen von *S. pombe* aufgetragen. Hier wird wie in Spur 7 nur eine Bande in Höhe des reifen BO detektiert. Wie bereits von HILDEBRANDT et al. (1991) beschrieben wurde, ist auch hier in *S. pombe* Prä-BO zur reifen Form prozessiert worden. Der unter der klaren Bande liegende diffuse geschwärzte Bereich ist auf Kreuzreaktionen der eingesetzten Antikörper zurückzuführen; er erscheint in allen Spuren, in denen Hefe-Gesamtzellextrakt aufgetragen wurde. Betrachtet man die Spuren 4 (coxIV-BOP) und 5 (SU9-BOP), erkennt man eine schwache Bande, die der reifen BO-Form (vergleiche Spur 7) entspricht. Bei den obersten Banden handelt es sich jeweils um Hybridprotein. Die ermittelten Molekulargewichte von 28,5 kD für coxIV-BOP und 38,9 kD für SU9-BOP (3.1.1) stimmen mit den erwarteten Molekular-

gewichten überein. Die schwachen direkt über BO liegenden Banden stellen wahrscheinlich wie bei Purpurmembranen Prozessierungsintermediate dar.

In Spur 3 wurde Gesamtzellextrakt von Zellen, die beide BO-Teilstücke (AB und CG) mit coxIV-Signalsequenz exprimieren, aufgetragen. Mit dem gegen den C-Terminus von BO gerichteten Antikörper kann das AB-Stück nicht nachgewiesen werden. Entsprechend fehlen die Banden in Höhe des coxIVAB-Molekulargewichts (10,9 kD) in den Spuren 1 und 3. Mit einem gegen die Aminosäuresequenz MRGS6His gerichteten Antikörper (QIAGEN) konnten die BO-Teilstücke in einer Westernblotanalyse nicht nachgewiesen werden. Vermutlich ist die Sequenz MRGS6His trotz SDS-Behandlung für den Antikörper nicht zugänglich.

In Spuren 2 und 3 ist im oberen Bereich der Kreuzreaktionen jeweils eine stärker geschwärzte signifikante Bande zu erkennen. Diese könnte aufgrund des ermittelten Molekulargewichts von 24,5 kD dem Hybridprotein coxIV-CG zugeordnet werden. Die darunter liegende Bande kann als Prozessierungsprodukt (Abspaltung der coxIV-Sequenz) gedeutet werden. Da in Spuren 2 und 3 vergleichbare Gesamtzellextraktmengen in Bezug auf die Kulturdichten aufgetragen wurden, sollte die Intensität der CG Bande etwa gleich sein. In Spur 3 wurde aber eine deutlich stärkere Bande detektiert. Dies könnte auf unterschiedliche Expressionsraten von coxIV-CG und coxIV-AB zusammen mit coxIV-AB zurückgeführt werden oder auf eine höhere Stabilität des CG-Teilstücks von BO, wenn es mit dem AB-Stück in Wechselwirkung treten kann.

Zur *in vivo* Regeneration von BR wurde dem Medium bei der Expression all-*trans*-Retinal zugegeben (vergleiche 3.1). Zellpellets von *S. pombe* ohne BO-Gen oder mit nur einem BO-Gen-Teil zeigten eine weiße Färbung mit Gelbanteil durch das aufgenommene Retinal. Die Zellpellets der coxIV-BOP oder SU9-BOP exprimierenden Klone zeigten eine deutliche Rosafärbung (3.1.2). Wurde BO in Teilstücken exprimiert, zeigte das Zellpellet eine braune Farbe.

Es konnte die Expression von BO-Teilstücken mit mitochondrialer Präsequenz der Untereinheit IV der Cytochrom-c-Oxidase aus *S. cerevisiae* in *S. pombe* gezeigt werden. Die *in vivo* Regeneration des BR führte zur Braunfärbung der Zellen.

3.3 *in vitro* Import von Bacterioopsin in die innere Mitochondrienmembran von *Schizosaccharomyces pombe*

In vitro Import Experimente bieten ein einfaches und schnelles Testverfahren, um verschiedene Proteine auf die Importierbarkeit in Mitochondrien zu untersuchen. Im Vergleich zu *in vivo* Experimenten liegt ein weitaus weniger komplexes System vor, welches die Möglichkeit bietet, den Importweg eines Proteins besser zu verfolgen.

Ein *in vitro*-Importansatz für Mitochondrien enthält isolierte Mitochondrien, zu importierendes [³⁵S]-Methionin-markiertes Protein und Reagenzien zum Antrieb der Atmungskette.

Es wurden isolierte Mitochondrien von *S. pombe* und *S. cerevisiae* eingesetzt (2.10.1). Die Atmungskette wurde mit ATP, NADH in Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,2) angetrieben (2.10.3). Die Markierung mit [³⁵S]-Methionin erfolgte in *in vitro*-Translationssystemen mit *in vitro* transkribierter mRNA (2.8.1).

3.3.1 *in vitro* Transkription

Für die *in vitro* Translation sollte *in vitro* hergestellte mRNA verwendet werden. Diese hat gegenüber zellulärer mRNA den Vorteil, daß nur eine RNA-Spezies vorliegt. Für die *in vitro* Transkription wurden alle BO-Genkonstrukte hinter den T7-Promotor des Vektors pGEM3z (Promega, Abb. 11) kloniert.

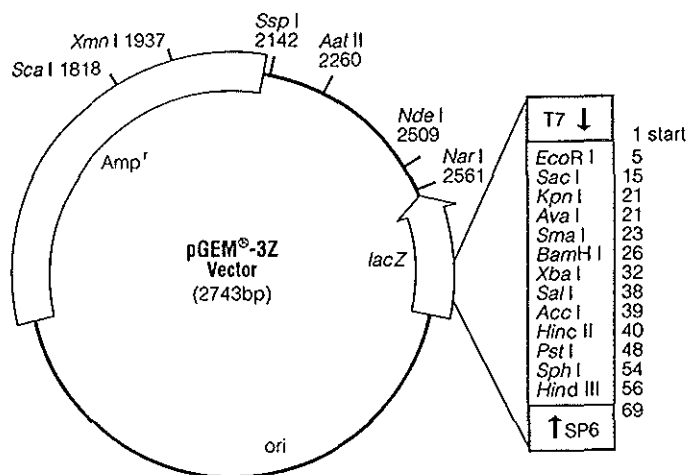


Abb. 11: pGEM3z

Zur Klonierung des bop-Gens für den BO-Vorläufer und des bom-Gens für das reife BO (V. Hildebrandt) in pGEM3z wurden die Restriktionsschnittstellen BamHI und HindIII genutzt. Die Genkonstrukte coxIV-bop und coxIV-bom (aus pUC19-coxIV-bop und pUC19-coxIV-bom, HOFFMANN, 1994) wurden über EcoRI und HindIII kloniert. Diese Restriktionsschnittstellen wurden auch bei der Klonierung von SU9-bop (3.1), coxIV-AB (3.2) und coxIV-CG (3.2) verwendet. Die so erhaltenen Plasmide wurden zur *in vitro* Transkription unmittelbar hinter den Genen mit HindIII linearisiert, um Transkripte definierter Länge zu erhalten. Um RNasen aus den Restriktionsansätzen zu entfernen, wurde die DNA durch Phenolextraktion gereinigt (2.7.5).

Zur Herstellung von Proteinen als Kontrollen des *in vitro* Imports wurden folgende Plasmide eingesetzt: pSP65-coxIVDHFR, pGEM3-SU9DHFR, pGEM4-AAC, pGEM3-F₁β (2.5). In diesen Plasmiden steht die Transkription unter Kontrolle des SP6-Promotors. Das Plasmid pSP65-coxIVDHFR wurde wie die Plasmide mit den BO-Genkonstrukten mit HindIII linearisiert und aufgereinigt. Bei den anderen Plasmiden wurde auf die Linearisierung verzichtet, da dies nach Auskunft von J. Rassow (persönliche Kommunikation) nicht notwendig ist.

Die Transkription der Gene unter Kontrolle des T7-Promotors wurde mit dem T7 AmpliScribe Kit (Biozym) oder dem T7 Cap Scribe Kit (Boehringer) unter Einführung eines „Caps“ am 5'-Ende der mRNA durchgeführt. Die veränderte Base an der mRNA verstärkt die Translation, und sie führt zu höheren Proteinsyntheseraten. Die Transkription von Genen unter Kontrolle des SP6-Promotors erfolgte ebenfalls mit 5'-Capping der mRNA jedoch entsprechend mit der SP6-Polymerase (Boehringer Mannheim). Die Aufreinigung der RNA erfolgte in allen Fällen gemäß den Angaben des T7 Cap Scribe Kit. Die RNA wurde in Wasser zu einer Konzentration von 0,5 bis 1,5 µg/µl aufgenommen (2.8.1).

Um zu zeigen, daß es sich bei den Transkriptionsprodukten der BO-Genkonstrukte um BO-mRNA handelt und daß keine Nebenprodukte gebildet werden, wurde exemplarisch für die Genkonstrukte bop, bom, coxIV-bop und coxIV-bom eine Northernblot-Analyse durchgeführt. RNA wurde aus *in vitro* Transkriptionsansätzen in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Zum Vergleich wurden Präparationen halobakterieller RNA eingesetzt (2.8.2). Als Kontrolle wurde ein Transkriptionsansatz ohne DNA aufgetragen. Die RNA wurde auf einen Nylonfilter transferiert, und mit einem Digoxigenin markierten DNA-Stück des bom-Gens (546 Nukleotide, KpnI bis HindIII, Boehringer Mannheim, Digoxigenin labelling and detection kit) hybridisiert. Die Detektion des Digoxigenin erfolgte mit Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat und dem Chemoluminiszenz-Substrat CSPD (Boehringer Mannheim) (Abb. 12).

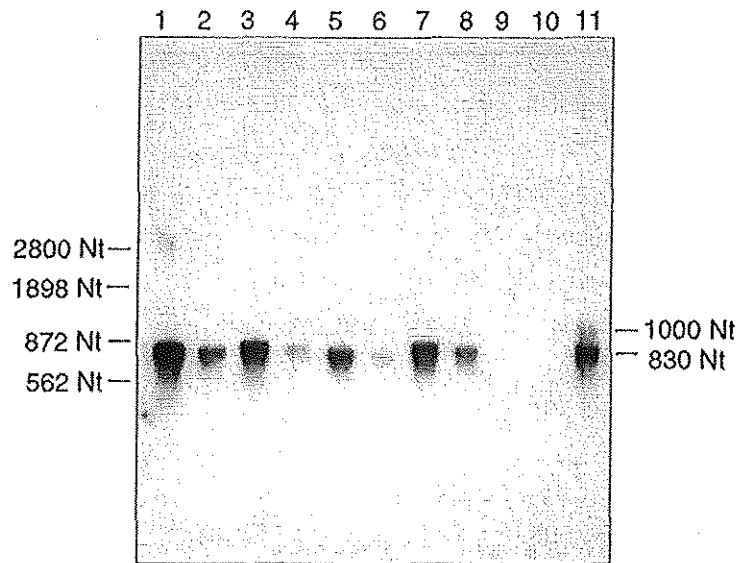


Abb. 12: Northernblotanalyse von *in vitro* Transkriptions-Produkten im Vergleich zu halobakterieller Gesamt-RNA
 Spuren 1-8: Transkriptionsansätze von:
 Spuren 1 und 2: coxIV-bom
 Spuren 3 und 4: coxIV-bop
 Spuren 5 und 6: bom
 Spuren 7 und 8: bop
 Spuren 9 und 10: Transkriptionsansatz ohne RNA
 Spur 11: Gesamt-RNA aus *Halobacterium salinarum*
 Die Hybridisierung erfolgte mit einem Digoxigenin markierten DNA-Stück des bom-Gens (546 Nukleotide, KpnI bis HindIII)

Wie von DAS SARMA et al. (1984) berichtet, findet man in halobakterieller RNA zwei BO-mRNA Spezies. Die Hauptkomponente hat eine Länge von 830 Nukleotiden, die in geringerer Menge vorhandene Komponente eine Länge von 1000 Nukleotiden. Wie beim Auftrag halobakterieller Gesamt-RNA (Spur 11, Abb. 12) zu sehen ist, konnten beide Spezies nachgewiesen werden. In den Spuren 1 bis 8 (Abb. 12), in denen Produkte verschiedener *in vitro* Transkriptionsansätze aufgetrennt sind, wurde jeweils nur eine einzige Bande detektiert. Aufgrund der DNA-Längenanalyse konnten die Banden den jeweiligen zu erwartenden mRNA-Spezies zugeordnet werden. Das Fehlen von Banden in der Kontrolle (Spuren 9 und 10, Abb. 12) zeigt die RNA-Abhängigkeit des verwendeten *in vitro* Transkriptions-Systems und schließt unspezifische Reaktionen zwischen Komponenten des Transkriptionsansatzes und der eingesetzten Sonde aus.

Damit konnte gezeigt werden, daß die *in vitro* Transkription verschiedener BO-Genkonstrukte im Vektor pGEM3z jeweils zu einer spezifischen mRNA-Spezies führt.

3.3.2 *in vitro* Translation

Zur *in vitro* Translation wurden käufliches Weizenkeimextrakt und Retikulozytenlysat (Promega) eingesetzt. Zur Translation wurden entsprechende mRNA und ein Gemisch aus Aminoacyl-tRNAs zugefügt. Die Markierung der translatierten Proteine erfolgt über [³⁵S]-markiertes Methionin (2.9.1).

BAUER (1990) zeigte, daß die *in vitro* Translation von BO mit Weizenkeimextrakt möglich ist. Für *in vitro* Import Experimente war es notwendig, die *in vitro* Translation der BO-mRNA-Spezies (3.3.1) in Retikulozytenlysat zu etablieren.

Pro Standardansatz (25 µl) wurde 1 µg *in vitro* hergestellter mRNA eingesetzt (2.8.1). Für die Proteine Prä-BO und reifes BO (3.3.1) wurde mRNA sowohl im Weizenkeimsystem als auch mit Retikulozytenlysat translatiert (2.9.1). Als Kontrollen wurden Translationsansätze ohne Zugabe von mRNA eingesetzt. Von den Translationsansätzen wurden je 12,5 µl gelelektrophoretisch (15%iges SDS-Polyacrylamidgel) aufgetrennt. Nach Färben mit Coomassie R250 wurde das Gel getrocknet und mittels Autoradiographie analysiert (2.9.7; 2.9.10) (Abb. 13).

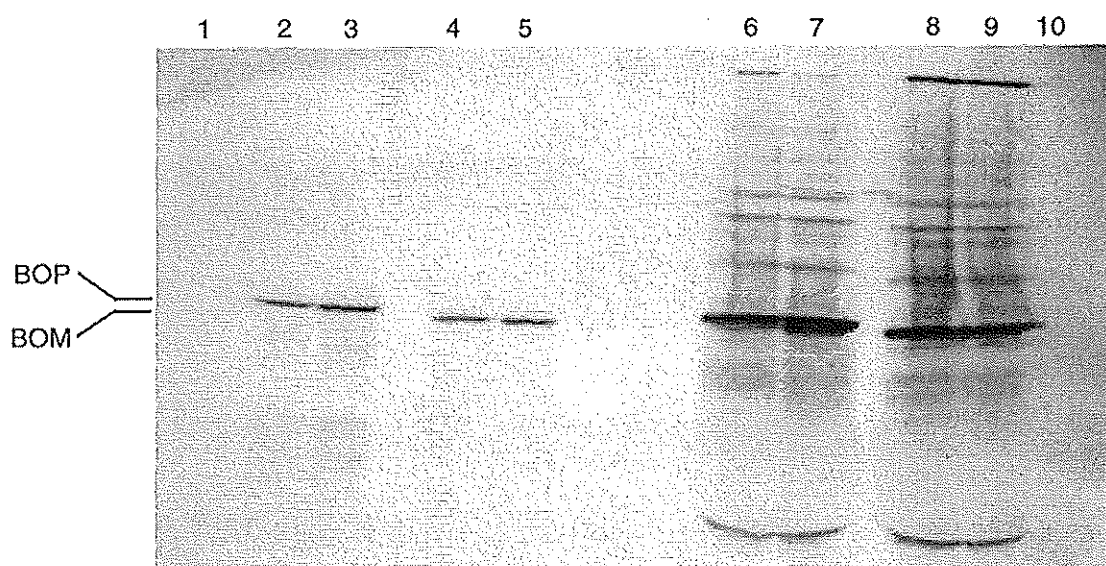


Abb. 13: Autoradiographie nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Translationsansätzen
 Spur 1: Kontrolle 1, Weizenkeimextrakt, ohne mRNA
 Spuren 2 und 3: Weizenkeimextrakt, bop-mRNA (verschiedene Ansätze)
 Spuren 4 und 5: Weizenkeimextrakt, bom-mRNA (verschiedene Ansätze)
 Spuren 6 und 7: Retikulozytenlysat, bop-mRNA (verschiedene Ansätze)
 Spuren 8 und 9: Retikulozytenlysat, bom-mRNA (verschiedene Ansätze)
 Spur 10: Kontrolle 2, Retikulozytenlysat, ohne mRNA

Wie Abbildung 13 zeigt, wurde in allen *in vitro* Translationsansätzen ein Hauptprodukt im Bereich des erwarteten Molekulargewichts synthetisiert. Die schwachen Nebenbanden erscheinen nicht bei den Translationsansätzen ohne mRNA. Sie müssen also Produkte der Translation von BO-mRNA sein. Die Banden mit geringerem Molekulargewicht als das der Hauptbande sind wahrscheinlich durch vorzeitigen Kettenabbruch oder späteren Translationsstart entstanden. Die Herkunft der Banden mit höherem Molekulargewicht wurde nicht weiter analysiert.

Die Zuordnung der Banden zu den verschiedenen BO-Proteinen wurde durch Westernblot-Analyse (2.9.8) bestätigt. 25 µl der Translationsansätze wurden im 15%igen SDS-Polyacrylmidgel elektrophoretisch aufgetrennt und auf Nitrocellulose transferiert. Der immunochemische Nachweis erfolgte mit dem gegen den C-Terminus von BR gerichteten Antikörper VH und dem Chemoluminiszenz-Substrat ECL (Amersham) (Abb. 14).

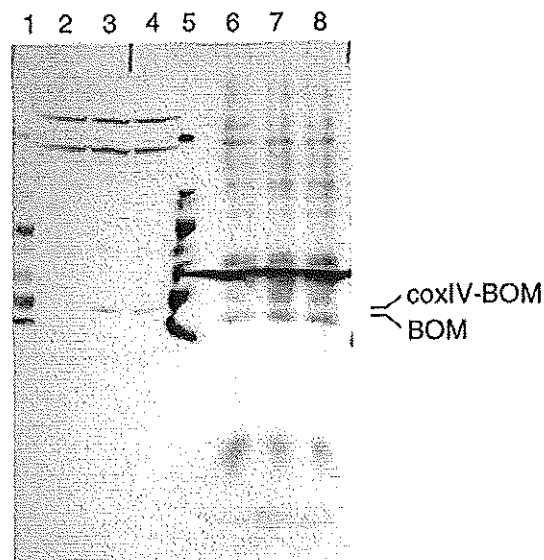


Abb. 14: Westernblotanalyse translierter Proteine im Weizenkeimextrakt und Retikulozytenlysat (coxIV-bom)

- Spur 1: 5 ng Purpurmembran
 - Spur 2: Kontrolle 1: Translationsansatz im Weizenkeimextrakt ohne RNA
 - Spuren 3 und 4: Translation im Weizenkeimextrakt mit coxIV-bom-mRNA (verschiedene Ansätze)
 - Spur 5: 25 ng Purpurmembran
 - Spuren 6 und 7: Translation im Retikulozytenlysat mit coxIV-bom-mRNA (verschiedene Ansätze)
 - Spur 8: Kontrolle 2: Translationsansatz im Retikulozytenlysat ohne RNA
- Als Erst-Antikörper wurde der polyklonale, gegen den C-Terminus von BO gerichtete Antikörper VH in einer Verdünnung von 1:6.000 eingesetzt. Die Detektion erfolgte über das Chemoluminiszenz-Substrat ECL (Amersham).

Die jeweils unterste Bande der Spuren 1 und 5 (Purpurnembran) und 3 und 4 (Translation von coxIV-bom-mRNA in Weizenkeimextrakt) (Abb. 14) entspricht BO bzw. BO-Fusionsprotein. Die über den BO-Banden (Spuren 3 und 4) sichtbaren Banden sind auf Kreuzreaktionen des Weizenkeimextrakts mit den eingesetzten Antikörpern zurückzuführen, wie die Kontrolle (Spur 2, Abb. 14) zeigt.

Die Westernblotanalyse von Proteinen aus Translationen im Retikulozytenlysat (Spuren 6, 7 und 8, Abb. 14) zeigen sehr starke Kreuzreaktionen der Antikörper mit Proteinen aus dem Retikulozytenlysat, was eine spezifische Identifikation des Translationsproduktes coxIV-BOM unmöglich macht.

Zusammenfassend ist zu vermerken, daß verschiedene *in vitro* hergestellte BO-mRNA-Spezies erfolgreich im Weizenkeimextrakt und Retikulozytenlysat translatiert werden konnten.

3.3.3 *in vitro* Import in Mitochondrien

Für *in vitro* Experimente zum mitochondrialen Import wurden Mitochondrien aus dem meist genutzten Modellorganismus *S. cerevisiae* eingesetzt. Da der Import von BO mit mitochondrialen Signalsequenzen *in vivo* bisher nur in *S. pombe* erfolgreich war, wurde der Import auch mit Mitochondrien aus *S. pombe* durchgeführt.

Analog zum *in vivo* Import (Kapitel 3.1) wurden verschiedene BO-Hybridproteine eingesetzt: coxIVBOP, SU9BOP, coxIV-AB und coxIV-CG. Als Kontrollproteine des hier verwendeten *in vitro* Importsystems wurden der ATP/ADP-Translokator (AAC, PFALLER et al., 1989), die β -Untereinheit der mitochondrialen F_1 -ATPase ($F_1\beta$, PFALLER et al., 1989) und die Dihydrofolatreduktase (DHFR) mit den Signalsequenzen coxIV (HURT et al., 1984) oder SU9 (PFANNER et al., 1987) eingesetzt. Für diese Proteine konnte der Import in isolierte Mitochondrien von *S. cerevisiae* bereits gezeigt werden.

Die zu importierenden Proteine wurden im Retikulozytenlysat (3.3.2) mit [35 S]-Methionin hergestellt. Der Standardansatz enthielt isolierte Mitochondrien, zu importierendes Protein, Puffer mit allen zur Energieregeneration nötigen Reagenzien und Saccharose zur Stabilisierung der Mitochondrien. Es wurde 30 min bei 25°C inkubiert. Bis auf AAC verfügen alle eingesetzten Proteine über eine N-terminale Signalsequenz, die beim Import durch eine Matrixpeptidase abgespalten wird. Um zu zeigen, daß diese Prozessierung bei den *in vitro* Experimenten nicht auf Freisetzung der Matrixpeptidasen durch Schädigung der mitochondrialen Membranen zurückzuführen ist, wurde der Import in Parallelansätzen mit Valinomycin inhibiert. Die Inhibierung des Imports durch Valinomycin beruht auf der Zerstörung des Potentials über die innere Membran, welches für den Transport über die innere Mitochondrienmembran essentiell ist. Eine Hälfte eines jeden Importansatzes wurde mit ProteinaseK behandelt, um nicht importiertes Protein zu beseitigen, die andere Hälfte blieb unbehandelt (2.10.3). Die Mitochondrien wurden reisoliert und die enthaltenen Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt. [35 S]-markierte Proteine wurden durch Autoradiographie sichtbar gemacht (2.9.7; 2.9.10) (Abb. 15a bis 15d).

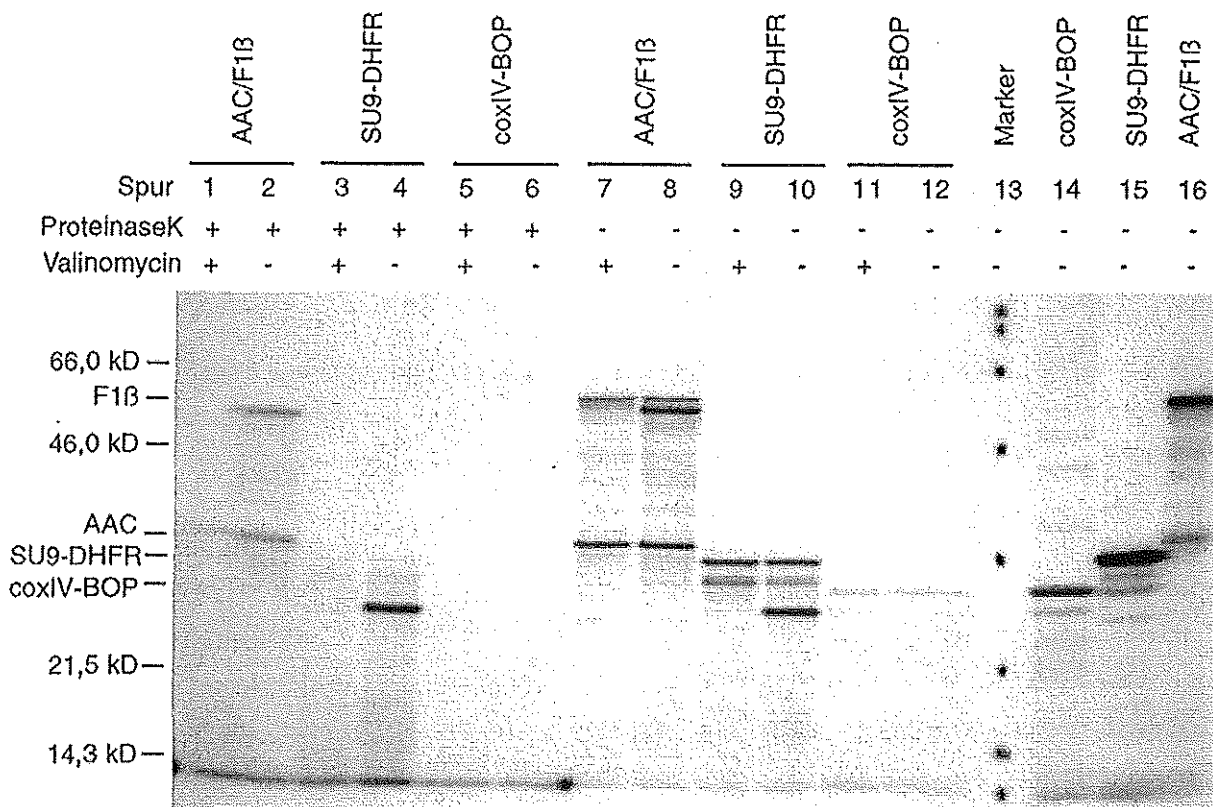


Abb. 15a: Autoradiographie nach SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 15%iges Gel) von Importexperimenten in Mitochondrien von *S. pombe* mit:
 AAC (32,0 kD), F1 β (56,0 kD), SU9-DHFR (29,0 kD), coxIV-BOP (31,3 kD)
 Die Spuren 14-16 zeigen die Auftrennung der für den Import eingesetzten Translationsansätze. AAC und F1 β wurden jeweils zusammen in einem Ansatz importiert.
 Einige Banden des Protein-Molekulargewichts-Standards (Amersham, rainbow, high molecular weight, Spur 13) wurden mit radioaktiver Tinte gekennzeichnet.

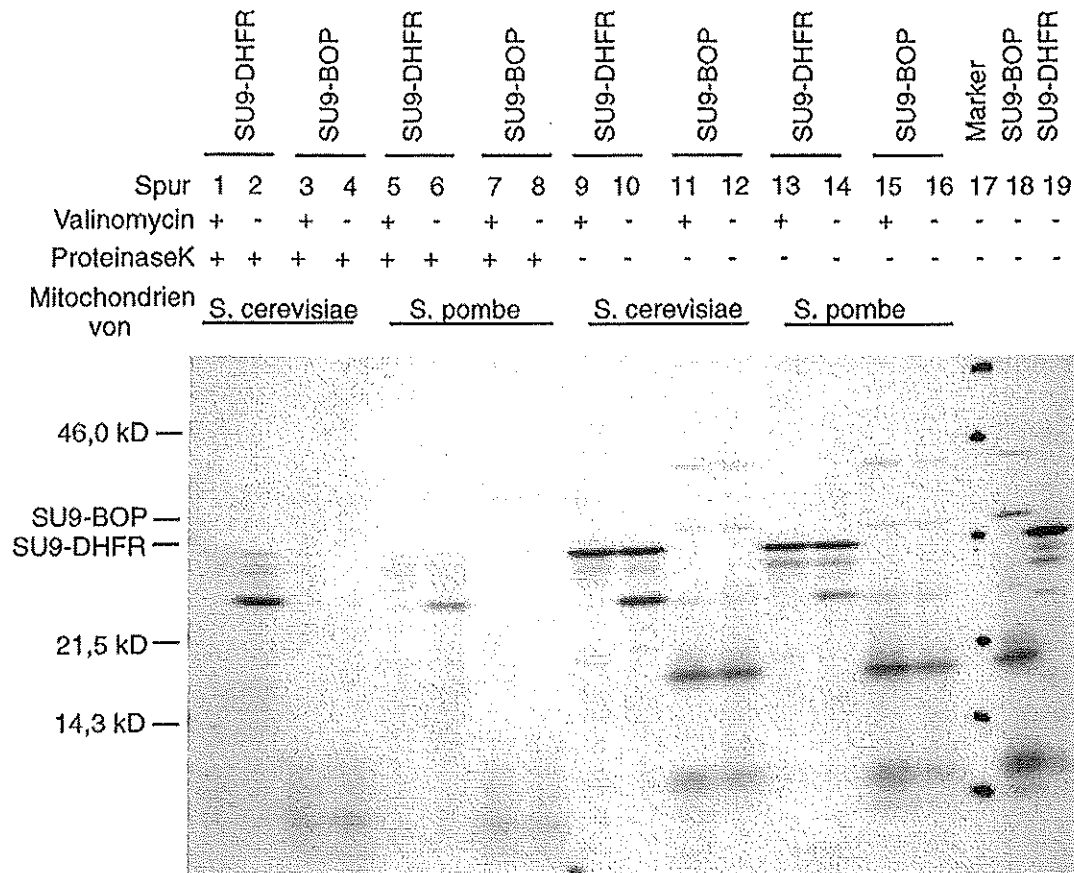


Abb. 15b: Autoradiographie nach SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 15%iges Gel) von Importexperimenten mit SU9-BOP (34,2 kD) und SU9-DHFR (29,0 kD). Die Spuren 18 und 19 zeigen die Auftrennung der für den Import eingesetzten Translationsansätze. Einige Banden des Protein-Molekulargewichts-Standards (Amersham, rainbow, high molecular weight, Spur 18) wurden zur Orientierung mit radioaktiver Tinte gekennzeichnet.

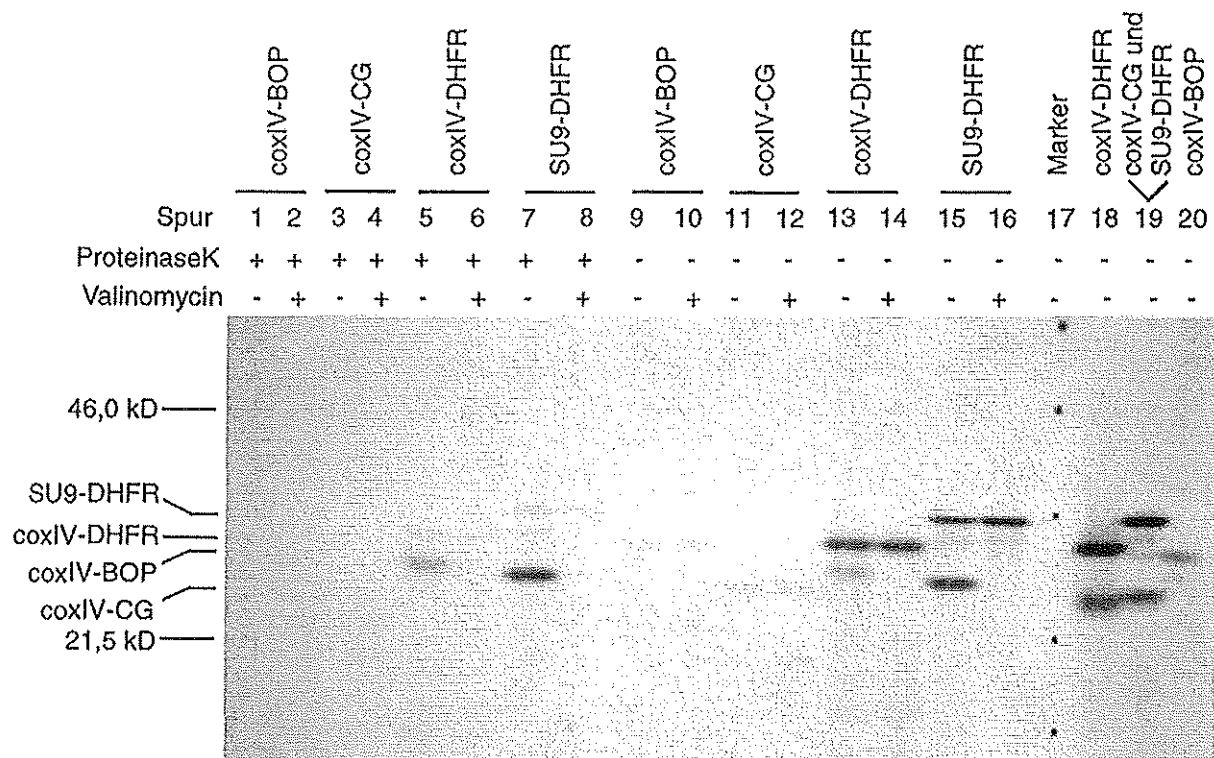


Abb. 15c: Autoradiographie nach SDS-Gelelektrophorese (Laemmli, 15%iges Gel) von Importexperimenten in Mitochondrien von *S. pombe* mit coxIV-CG (24,5 kD), coxIV-BOP (31,3 kD), coxIV-DHFR (26,1 kD) und SU9-DHFR (29,0 kD). Die Spuren 18 bis 20 zeigen die Auftrennung der für den Import eingesetzten Translationsansätze. Einige Banden des Protein-Molekulargewichts-Standards (Amersham, rainbow, low molecular weight, Spur 17) wurden zur Orientierung mit radioaktiver Tinte gekennzeichnet.

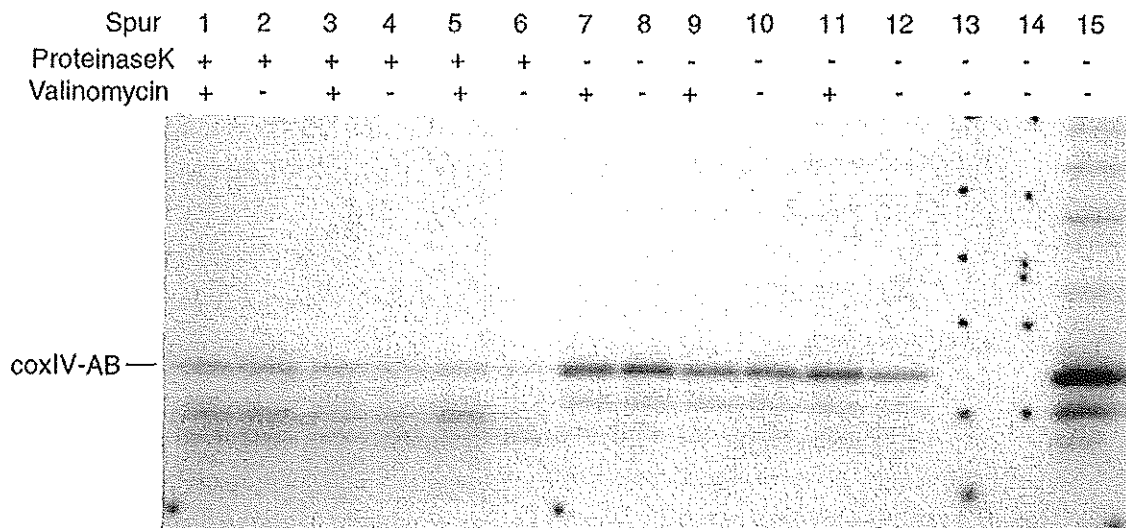


Abb. 15d: Autoradiographie nach SDS-Gelelektrophorese (Schägger, von Jagow, 10%iges Gel) von Importexperimenten mit coxIV-AB (10,9 kD)
 Spuren 1, 2, 7, 8: Mitochondrien aus *S. cerevisiae*
 Spuren 3, 4, 9, 10: Mitochondrien aus *S. pombe*
 Spuren 5 und 11: Importansatz ohne KCl
 Spuren 6 und 12: Importansatz mit 270 mM KCl
 Die Spur 15 zeigt die Auftrennung des für den Import eingesetzten Translationsansatzes. Einige Banden der Protein-Molekulargewichts-Standards (Spur 13: Biorad, broad range; Spur 14: Amersham, rainbow, high molecular weight) wurden zur Orientierung mit radioaktiver Tinte gekennzeichnet.

In den Abb. 15a bis 15d ist jeweils ein Aliquot des für den Import verwendeten Translationsansatzes aufgetragen. In allen Ansätzen bis auf den Ansatz zur Translation von SU9-BOP ist immer eine Hauptbande zu erkennen, deren Molekulargewicht dem erwarteten Molekulargewicht entspricht (vergleiche Angaben in den Legenden der Abb. 15a bis 15d). Die jeweils am stärksten ausgeprägte Nebenbande liegt im Bereich des prozessierten Proteins. Wahrscheinlich entsteht sie durch falsche Initiation der Translation nach der Präsequenz oder durch unspezifische Prozessierung im Translationsansatz. Im Fall der Translation von SU9-BOP ist die Bande, die dem erwarteten Molekulargewicht von 36,9 kD entspricht (Abb. 15b, Spur 19) nicht deutlicher ausgeprägt als drei der stärksten Nebenbanden.

Der hier verwendete Test ist geeignet für Importstudien von Proteinen in isolierte Mitochondrien, wie die Experimente mit den Kontrollproteinen zeigen. Alle getesteten Kontrollproteine wurden durch oder in die Membran transportiert. SU9-DHFR (Abb. 15a) wird beim Import in zwei Schritten prozessiert. Die Banden des Vorläuferproteins, des Intermediats und des reifen Proteins sind im Importansatz, der nicht mit ProteinaseK behandelt wurde, zu erkennen (Spur 10, Abb. 15a). Nur das vollständig ins Mitochondrium importierte reife Protein ist vor Behandlung mit ProteinaseK geschützt und im Gel

detektierbar (Spur 4, Abb. 15a). Der Zusatz des Entkopplers Valinomycin verhindert den Import durch die innere Mitochondrienmembran. Daher kommt es nicht zur Prozessierung des Vorläufers. So findet weder Import noch Prozessierung von SU9-DHFR zu DHFR statt (Spuren 3 und 9, Abb. 15a). Abb. 15b zeigt, daß der Import von SU9-DHFR in Mitochondrien von *S. cerevisiae* und *S. pombe* gleich gut funktioniert. Ähnlich erfolgreich konnte der Import der anderen Kontrollproteine gezeigt werden. F₁β und coxIV-DHFR werden in einem Schritt zum reifen Protein prozessiert. Da AAC keine abspaltbare Signalsequenz enthält, verändert das Protein nicht sein Molekulargewicht beim Import. Alle Kontrollproteine können sowohl in Mitochondrien von *S. cerevisiae* als auch von *S. pombe* importiert werden (es sind nicht alle Daten gezeigt).

Beim Import von coxIV-BOP, SU9-BOP, coxIV-AB und coxIV-CG in Mitochondrien von *S. cerevisiae* und *S. pombe* wurde entsprechend dem Import der Kontrollproteine vorgegangen (Abb. 15a-d). Nach Behandlung mit ProteinaseK sind schwache Banden in Höhe der prozessierten Fusionsproteine zu sehen. Doch gibt es keinen Unterschied in der Bandenintensität von [³⁵S]-markierten Proteinen aus Importansätzen mit und ohne Valinomycin. Dies bedeutet, daß entweder der Proteinabbau durch ProteinaseK nicht vollständig war, oder daß ein vom Potential über die innere Mitochondrienmembran unabhängiger Import stattgefunden hat. Weitere Experimente zum Abbau von BO-Fusionsproteinen aus *in vitro* Translationsansätzen, in denen verschiedene Mengen ProteinaseK eingesetzt wurden, zeigten, daß die Fusionsproteine mit ProteinaseK nicht vollständig abgebaut werden können (Daten nicht gezeigt). Die beobachtete Menge [³⁵S]-markierten Proteins in der Fraktion der reisolierten Mitochondrien ist vermutlich auf an den Mitochondrien aggregiertes Protein zurückzuführen. Daraus ist zu folgern, daß entweder gar kein Import stattgefunden hat, oder daß die Importeffizienz so gering ist, daß die Menge des importierten Proteins zum Nachweis durch Autoradiographie nicht ausreicht.

Es wurden weitere Importbedingungen mit verschiedenen Zusätzen getestet. Als zu importierendes Protein wurde coxIV-BOP eingesetzt, da dieses Hybridprotein *in vivo* in Mitochondrien von *S. pombe* erfolgreich importiert werden konnte. Da diese Versuche keine Veränderung des Imports im Vergleich zum Standardansatz zeigten, wird hier auf Abbildungen verzichtet.

Da der Import von AAC bei erhöhter Ionenstärke verdoppelbar ist, wurde im Standardansatz für den Import die Menge an Kaliumchlorid von 90 mM bis 270 mM variiert. Es zeigte sich jedoch kein Einfluß auf die Importierbarkeit von coxIV-BOP.

Der Import von F₁β kann durch Zugabe von Retikulozytenlysat zum Importansatz gesteigert werden. Für coxIV-BOP zeigte sich jedoch, daß der Zusatz von 2 µl Retikulozytenlysat pro 100 µl Importansatz keinen Einfluß auf die Importierbarkeit hat.

Nachdem gezeigt wurde, daß ungefaltete Proteine besser in Mitochondrien importiert werden (PFANNER et al., 1987), wurde coxIV-BOP vor dem Import mit Harnstoff denaturiert (2.10.3). Auch nach dieser Behandlung wurde kein Import von coxIV-BOP beobachtet.

Cytosolische Chaperone (1.3.2) beeinflussen den Import von Proteinen in Mitochondrien, indem sie die falsche und/oder frühzeitige Faltung der Proteine verhindern. Da der Gehalt und die Art der Chaperone in Weizenkeimen und Retikulozyten verschieden sind, wurde zum Import in Weizenkeimextrakt translatiertes coxIV-BOP eingesetzt. Zum Vergleich wurde in Weizenkeimextrakt translatiertes F₁β, AAC und SU9-DHFR herangezogen. Während die drei Kontrollproteine in Mitochondrien von *S. cerevisiae* importiert wurden, wenn auch mit geringerer Effizienz als aus

Retikulozytenlysat, wurde kein Import von coxIV-BOP beobachtet. Zugabe des Hsp70-Chaperons DnaK aus *E. coli* (Boehringer Mannheim) in Konzentrationen von 2 bis 20 ng/ μ l Importansatz zum Importansatz von coxIV-BOP und F₁ β in Retikulozytenlysat zeigte keinen Einfluß auf den Import beider Proteine.

Der Einfluß von Retinal auf die korrekte Faltung von BO in Membranen ist nach heutigem Wissen nicht auszuschließen. CoxIV-BOP wurde im Vergleich unbehandelt oder nach Vorbehandlung mit Harnstoff (2.10.3) zum Import in Ansätzen mit Zugabe von all-*trans*-Retinal in Konzentrationen von 0,1 μ M, 0,5 μ M und 1 μ M eingesetzt. Auch hier zeigte sich kein Einfluß auf den Import von coxIV-BOP.

Des Weiteren wurden Mitoplasten (Mitochondrien ohne äußere Membran) für Importexperimente hergestellt, um auszuschließen, daß die äußere Mitochondrienmembran die Importbarriere für coxIV-BOP darstellt. Mitochondrien (1mg mitochondriales Protein/ml in SEM) wurden 1:10 in EM-Puffer verdünnt und 17 min auf Eis inkubiert. Die Mitoplasten wurden durch Zentrifugation (15 min, 2 °C, 13.000 Upm in der Mikrozentrifuge) isoliert und im Standardansatz anstelle der Mitochondrien zum Import eingesetzt. Auch hier konnte kein Import von coxIV-BOP gezeigt werden.

Trotz umfassender Untersuchungen unter verschiedenen Bedingungen konnte kein Import von BO-Hybridproteinen in isolierte Mitochondrien von *S. pombe* oder *S. cerevisiae* nachgewiesen werden.

3.4 Wechselwirkung von Bacterioopsin mit dem Chaperonin GroEL

Es wurden *in vitro* Translationsansätze von Hybridprotein bestehend aus Bacterioopsin mit N-terminaler coxIV-Signalsequenz in Retikulozytenlysat bei 100.000 x g zentrifugiert. Die Analyse des Überstands dieser Zentrifugation im Vergleich zu einem nicht zentrifugierten Translationsansatz erfolgte durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und anschließende Autoradiographie (2.9.7; 2.9.10). Fast das gesamte synthetisierte coxIV-BOP und BOP, letzteres ist ein Nebenprodukt der Translation, ist im Überstand zu finden (Abb. 16). Dies bedeutet, daß neu synthetisiertes BO-Hybridprotein in Lösung vorliegt. Um zu ermitteln, durch welche Faktoren BO in Lösung gehalten werden kann, wurden exemplarisch Untersuchungen mit dem Chaperonin GroEL (*E. coli*) durchgeführt.

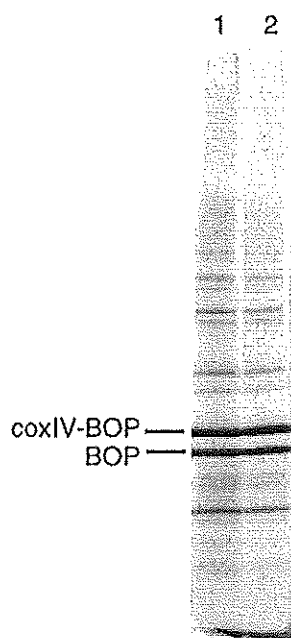


Abb. 16: *in vitro* Translationsansätze (coxIV-BOP) vor und nach Zentrifugation bei 100.000 x g (Autoradiographie nach SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese im 15%igen Gel)
 Spur 1: Gesamtansatz vor Zentrifugation
 Spur 2: Überstand nach Zentrifugation

Da die Wechselwirkung von Proteinen mit GroEL gut untersucht ist (1.3.3), wurde dieses Chaperonin für Untersuchungen mit BO gewählt. In der Literatur sind bisher nur Versuche mit löslichen Proteinen beschrieben. Die Proteine werden mit Harnstoff oder Guanidiniumhydrochlorid denaturiert, was zum Funktionsverlust führt. Der Denaturierungsansatz wird um Faktor 50 bis 100 in GroEL-haltigen Puffer verdünnt. Findet eine Wechselwirkung mit GroEL (unter Zusammenwirken mit GroES und ATP) statt, so daß das Protein wieder seine korrekte Faltung einnimmt, ist ein Anstieg der Funktionalität zu messen (ZHENG et al., 1993; HLODAN et al., 1995; MAYHEW et al., 1996)

Für Membranproteine muß bei Verwendung dieses Ansatzes folgender Gedankengang vollzogen werden: Membranproteine sind nur in Lösungen mit Detergenzien löslich. Wird BO also unter Zusatz eines Detergens denaturiert, ist es zunächst löslich. Nach Verdünnung des denaturierenden Agens und des Detergens fällt das Membranprotein aus und kann abzentrifugiert werden. Wird aber in GroEL-haltigen Puffer verdünnt und findet eine Wechselwirkung mit GroEL statt, sollten die hydrophoben Bereiche des Membranproteins so abgeschirmt sein, daß die Aggregation verhindert wird. Das Membranprotein bleibt löslich. Zusatz von GroES und ATP bewirkt die Freisetzung von Proteinen aus ihrer Wechselwirkung mit GroEL. Fertig gefaltete Proteine verlassen GroEL, während falsch gefaltete Proteine erneut gebunden werden (1.3.3). Nach Zusatz von GroES und ATP können Membranproteine GroEL verlassen. Sie aggregieren oder binden erneut an GroEL und bleiben weiterhin in Lösung. Setzt man neben GroES und ATP geeignete Lipide zu, wäre anzunehmen, daß es zur korrekten Faltung des Membranproteins kommt.

Bacteriorhodopsin ist ein gut geeignetes Membranprotein für Untersuchungen zur Wechselwirkung mit Chaperonen, da seine Aktivität relativ einfach gemessen werden kann. Ein sehr leicht zu detektierendes Merkmal ist die Rosafärbung, wenn der Chromophor *all-trans*-Retinal an korrekt gefaltetes BO gebunden ist.

3.4.1 Bacteriorhodopsin/Bacterioopsin zur Untersuchung einer Wechselwirkung mit GroEL

Zur Untersuchung einer Wechselwirkung zwischen GroEL und Bacteriorhodopsin wurden Purpurmembran und in *E. coli* exprimiertes Fusionsprotein GST-BOS (BO mit N-terminalem Glutathion-S-Transferase (GST)-Teil) verwendet. Während BO in Purpurmembranen in funktionaler Konformation zusammen mit *all-trans*-Retinal und Lipiden vorliegt, ist es als Fusion mit GST in Einschlußkörpern (englisch: inclusion bodies) ohne *all-trans*-Retinal und Lipide aggregiert.

Die Überexpression des GST-BOS in *E. coli* (2.9.4) führt zu Einschlußkörpern, in denen das unlösliche Fusionsprotein enthalten ist. Das Fusionsprotein wurde nach den Angaben in 2.9.4 aus *E. coli* aufgearbeitet. Als Kontrolle wurde Protein aus nicht induzierten Zellen aufgearbeitet (Abb. 17).

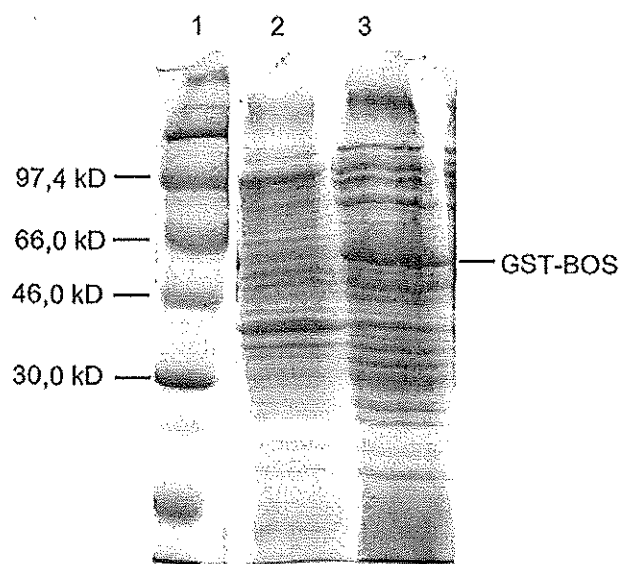


Abb. 17: SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese von Einschlußkörpern nach Expression von GST-BOS in *Escherichia coli*
 Spur 1: Protein-Molekulargewichtsmarker
 Spur 2: ohne Induktion, Kontrolle
 Spur 3: nach Induktion
 Das Gel wurde mit Coomassie R250 gefärbt.

Neben der Hauptbande des GST-BOS-Fusionsproteins (57,2 kD, Spur 3, Abb. 17) sind zahlreiche Nebenbanden zu erkennen. Um eine weitere Aufreinigung des GST-BOS-Fusionsproteins zu erzielen, wurde eine Behandlung mit 8 M Harnstoff angeschlossen. Dazu wurde das Pellet einer Aufarbeitung in 0,1 M Tris/HCl (pH 8) mit 8 M Harnstoff durch Ultraschallbehandlung im Wasserbad resuspendiert. Der Ansatz wurde mit 1.000 Upm im Eppendorffinkubator bei 30 °C für 2 h geschüttelt und anschließend für 60 min bei 4 °C mit 13.000 Upm in der Mikrozentrifuge zentrifugiert. Überstand und

Pellet dieser Zentrifugation im Vergleich zu Überstand und Pellet derselben Zentrifugation einer nicht behandelten Probe wurden gelelektrophoretisch analysiert (Abb. 18).

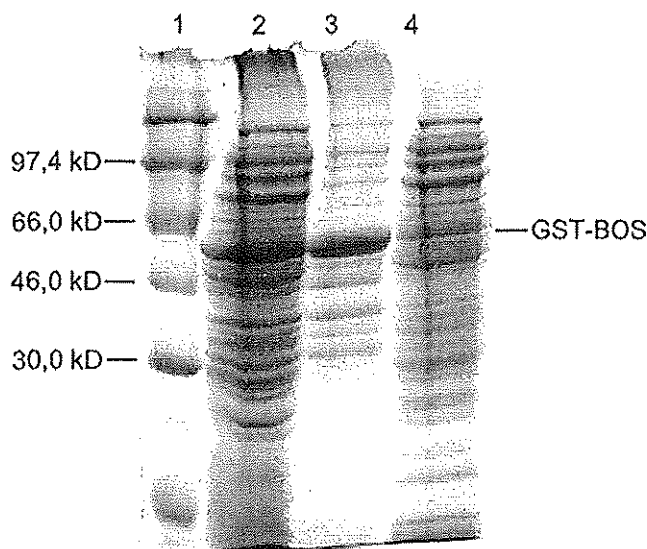


Abb. 18: Partielle Aufreinigung von GST-BOS aus Einschußkörpern durch Behandlung mit Harnstoff

Es wurden pro Spur gleiche Aufschlußmengen in einem 15%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie R250 gefärbt.

- Spur 1: Protein-Molekulargewichtsmarker
- Spur 2: unbehandeltes Pellet
- Spur 3: Pellet nach Behandlung mit 8 M Harnstoff
- Spur 4: Überstand nach Behandlung mit 8 M Harnstoff

Das Fusionsprotein GST-BOS ist auch nach Behandlung mit 8 M Harnstoff zum größten Teil in der Pelletfraktion zu finden (Spuren 3 und 4, Abb. 18). Der Vergleich der Pelletfraktionen von unbehandelten und mit 8 M Harnstoff inkubierten Einschußkörpern (Spuren 2 und 3, Abb. 18) zeigt den deutlichen Aufreinigungseffekt nach Behandlung mit Harnstoff. Die Anzahl und Intensität der Nebenbanden hat deutlich abgenommen.

3.4.2 Solubilisierung und Denaturierung von BO aus Purpurmbranen und als Fusion mit GST

Üblicherweise werden bei Untersuchungen zur Wechselwirkung von löslichen Proteinen mit Chaperonen als denaturierende Agenzien Harnstoff (8 M) oder Guanidiniumhydrochlorid (6 M) eingesetzt. Das Fusionsprotein GST-BOS kann jedoch weder mit Harnstoff (Abb. 18, Kapitel 3.4.1) noch Guanidiniumhydrochlorid (Daten nicht gezeigt) solubilisiert werden. Dies gilt auch für BO aus Purpurmbranen. Wahrscheinlich ist die starke Hydrophobizität von BO dafür verantwortlich.

SDS erwies sich als geeignetes Detergens, um das Membranprotein BO zu solubilisieren und denaturieren. Es wurden verschiedene SDS-Konzentrationen für die Solubilisierung der Purpurmembran und des Fusionsproteins GST-BOS eingesetzt. Die Proteine wurden in einer Konzentration von 1 µg/µl Solubilisierungsansatz mit verschiedenen SDS-Konzentrationen versetzt und 1 h bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Nach einstündiger Zentrifugation (4 °C, 13.000 Upm in der Mikrozentrifuge) wurden Überstand und Pellet im 15%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Abb. 19 zeigt Solubilisierungen mit optimalen SDS-Konzentrationen.

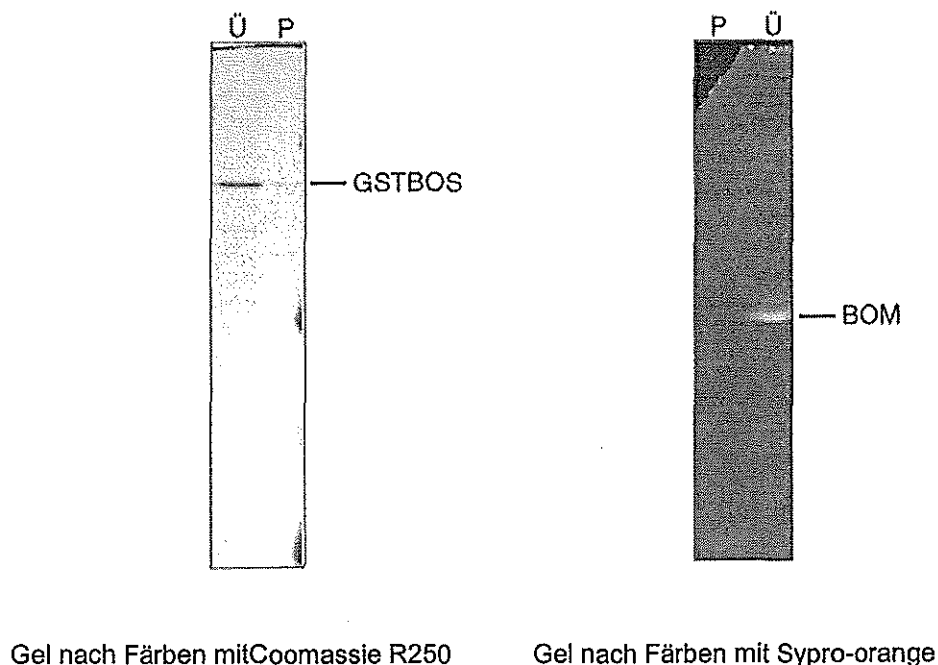


Abb. 19: Solubilisierung von BR aus GST-BOS (links) und Purpurmembranen (rechts) mit SDS
P: Pellet Ü: Überstand

GST-BOS ist nach Solubilisierung fast vollständig im Überstand zu finden, nur ein geringer Teil befindet sich im Pellet (Spuren Ü und P, Abb. 19, links), während BR aus Purpurmembranen vollständig im Überstand zu finden ist (Spur Ü, Abb. 19, rechts).

3.4.3 Wechselwirkung von solubilisiertem BO aus Purpurmembran und GST-BOS-Fusionsprotein mit GroEL

Zur Detektion einer Wechselwirkung zwischen GroEL und den verschiedenen BO-Proteinen wurden letztere mit SDS denaturiert (2.9.5). Nach Zentrifugation wurde der Überstand 1:100 in Renaturierungspuffer mit Kombinationen aus GroEL, GroES und ATP verdünnt. Der GroEL-Komplex wurde in äquimolarer Menge zum eingesetzten BO zugegeben. GroES wurde in dreifachem Überschuß eingesetzt und ATP in einer Konzentration von 2 mM. Nach einstündiger Inkubation bei 30 °C unter Schütteln wurden die Ansätze zentrifugiert. Überstand und Pellet wurden gelelektrophoretisch getrennt. Das SDS-Polyacrylamidgel des Versuchs mit BR aus halobakteriellen

Purpurmembranen wurde mit Sypro-orange gefärbt, um eine Quantifizierung der BO-Banden mit dem Gel-Dokumentationssystem „Molecular Analyst“ (Biorad) zu ermöglichen (Abb. 20). Das Gel zur Analyse des Versuchs mit GST-BOS blieb unbehandelt. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrocellulose transferiert. Die immunochemische Detektion erfolgte mit affinitätsgereinigtem α BR (G. Rosenberg, 1:2.500 verdünnt) als Erstantikörper und mit ECL als Chemolumineszenz-Substrat (2.9.8) (Abb. 20 und 21).

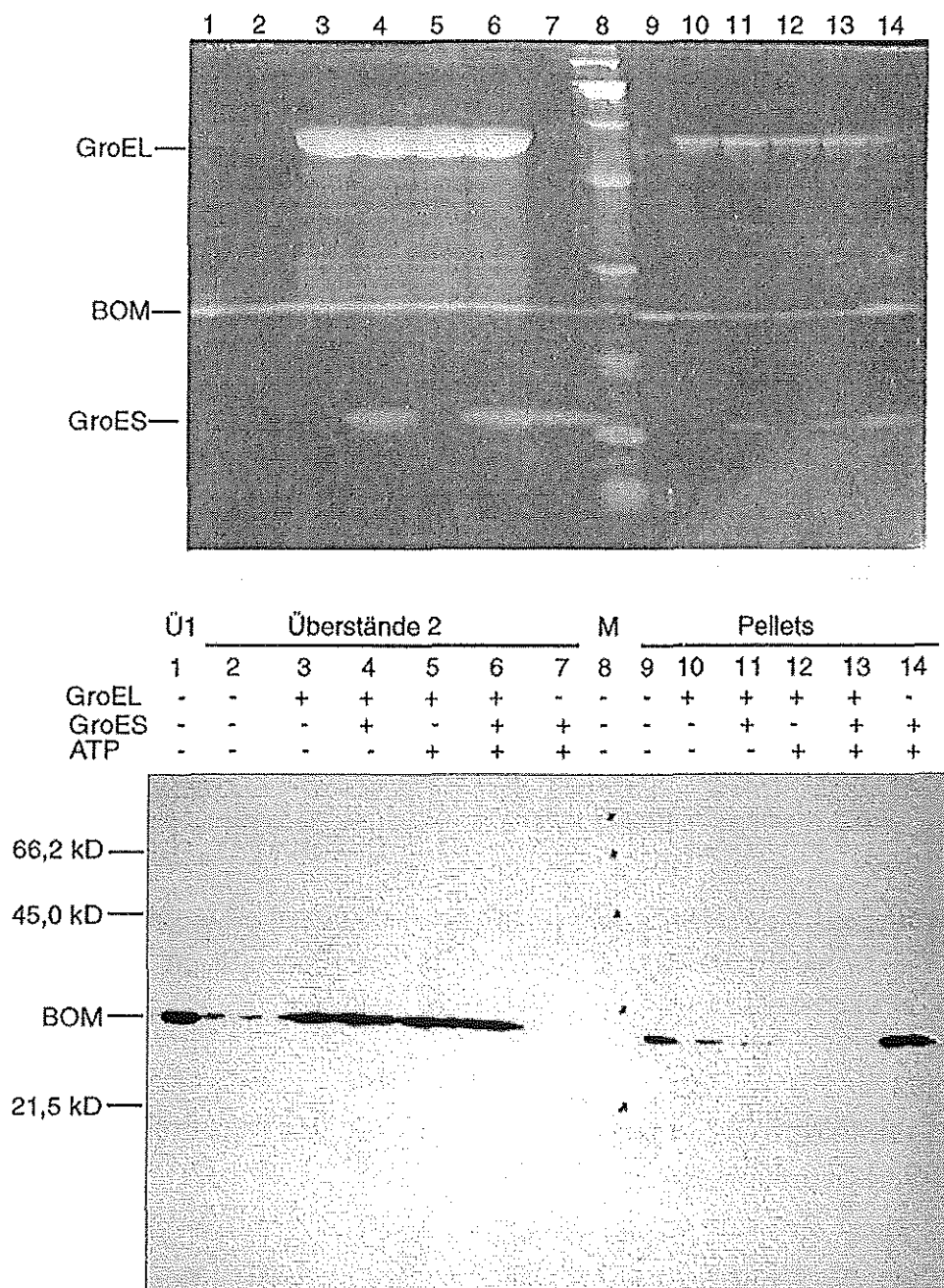


Abb. 20: oben: mit Sypro-orange gefärbtes SDS-Polyacrylamidgel einer Versuchsserie zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen GroEL und BO aus Purpurmembranen
unten: Westernblotanalyse dieses Gels
Ü1: zur Verdünnung eingesetzter Überstand nach Solubilisierung mit SDS
Überstände 2: Überstände nach Verdünnung in Puffer mit oben gezeigten Zusätzen
Spur 8 (M): Protein-Molekulargewichtsstandard (Im Bild der Westernblot-Analyse ist die Lage der Banden durch Kreuze markiert.)
Pellets: Pellets nach Verdünnung in Puffer mit verschiedenen Zusätzen

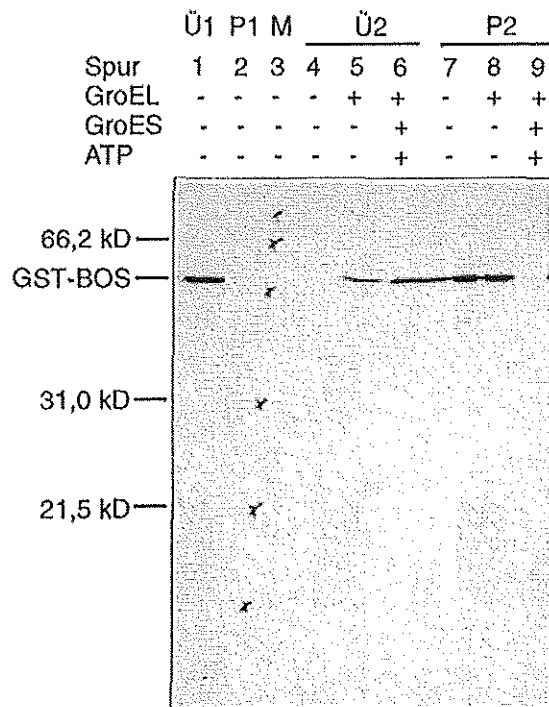


Abb. 21: Westernblotanalyse einer Versuchsserie zum Nachweis einer Wechselwirkung zwischen GroEL und dem Fusionsprotein GST-BOS

Ü1: Überstand nach Solubilisierung mit SDS (wie für Verdünnungs-Experimente eingesetzt)

P1: Pellet nach Solubilisierung mit SDS

Spur 3: Protein-Molekulargewichtsstandard (Die Lage der Banden ist durch Kreuze markiert.)

Ü2: Überstände nach Verdünnung in Puffer mit verschiedenen Zusätzen

P2: Pellets nach Verdünnung in Puffer mit verschiedenen Zusätzen

Die Solubilisierung von BO (im Folgenden für BO aus halobakteriellen Purpurmembranen stehend) und GST-BOS mit SDS war nahezu vollständig. BO und GST-BOS lagen in Lösung vor (Spur 1, Abb. 20 und Spur 2, Abb. 21). Nach Verdünnen in Renaturierungspuffer befindet sich das gesamte GST-BOS in der Pelletfraktion (Spuren 4 und 7, Abb. 21), von BO wird noch ein geringer Teil im Überstand detektiert (Spuren 2 und 9, Abb. 20). Wesentlich mehr BO und GST-BOS bleibt löslich nach Verdünnung in GroEL-haltigen Renaturierungspuffer (vergleiche Spuren 2 und 3, Abb. 20 und Spuren 4 und 5, Abb. 21). Dieser Effekt ist noch verstärkt bei Verdünnung in Renaturierungspuffer mit GroEL, GroES und ATP (Spuren 6, Abb. 20 und Abb. 21). Zur Kontrolle wurde denaturiertes BO auch in Renaturierungspuffer mit GroES und ATP (Spuren 7 und 14, Abb. 20) verdünnt. GroES und ATP haben keinen Effekt auf die Löslichkeit von BO. Eine weitere Kontrolle war die Verdünnung von BO in Renaturierungspuffer mit GroEL und GroES oder ATP (Spuren 4, 5, 11 und 12, Abb. 20). Weder GroES noch ATP als alleiniger Zusatz zu GroEL im Renaturierungspuffer verstärkten die Löslichkeit von BO im Vergleich zu alleinigem GroEL-Zusatz. Dies geht aus den Bandenintensitäten in der Westernblotanalyse nicht deutlich hervor. Vermutlich wurden die Proteine auf die verschiedenen Bereiche des Filters unterschiedlich gut transferiert. Die Analyse der BO-Bandenintensitäten

ausgehend vom Sypro-Orange gefärbten SDS-Polyacrylamidgel (Abb. 20, oben) belegt die vorher gemachten Ausführungen deutlicher. Es sind nur die Pelletspuren ausgewertet, da in den Spuren, in denen der Überstand aufgetragen wurde, ein zu großer Hintergrund durch das im Überstand enthaltene GroEL auftrat. Die Bandenintensität der Spur 2, Abb. 20 (Verdünnung von denaturiertem BO in Puffer ohne Zusatz) wurde auf 100 % gesetzt (Abb. 22).

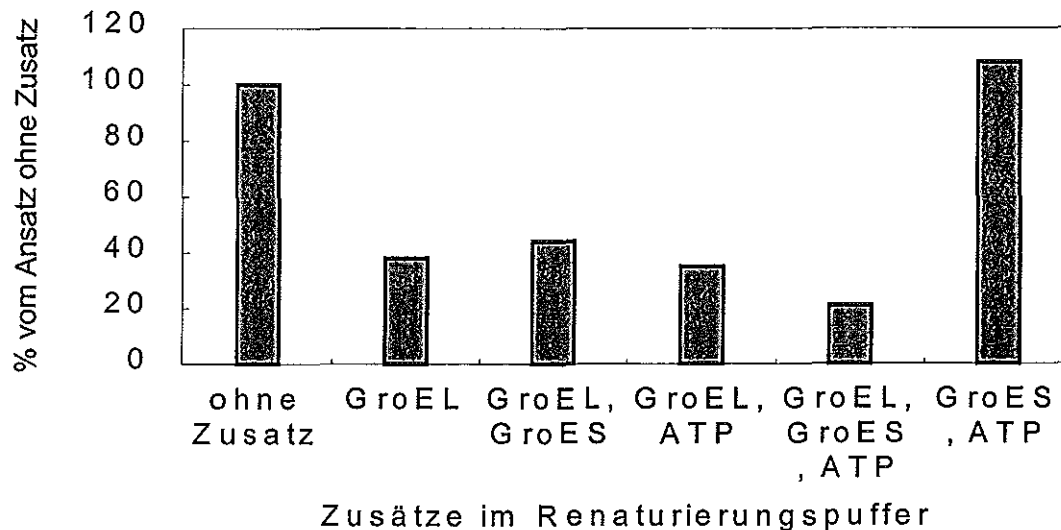


Abb. 22 : prozentualer Anteil an BO im Pellet nach Solubilisierung und Verdünnung in Puffer mit verschiedenen Zusätzen im Vergleich zur Verdünnung in Puffer ohne Zusatz

Die geschilderten Effekte erscheinen bei den Versuchen mit GST-BOS ausgeprägter zu sein als bei Versuchen mit halobakterieller Purpurmembran. Dies kann daran liegen, daß die Zentrifugation der Verdünnungsansätze im Fall von GST-BOS festere Pellets als bei halobakterieller Purpurmembran ergibt. Bei nur losen Pellets besteht die Gefahr der unsauberen Trennung von Pellet und Überstand, was die Ergebnisse verfälschen kann.

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß bei Zusatz von GroEL im Renaturierungspuffer zur Verdünnung von SDS-denaturiertem BO mehr BO in Lösung bleibt als nach Verdünnung in Puffer ohne GroEL. Die Menge an löslichem BO kann durch Zusatz von GroES und ATP in den Renaturierungspuffer gesteigert werden. Ergänzung von GroEL im Renaturierungspuffer mit GroES oder ATP alleine zeigen diesen Effekt nicht.

3.5 Expression von BO in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* durch Biolistische Transformation

In Versuchen, Bacterioopsin (BO) über den zellulären Importapparat in Mitochondrien einzuschleusen, wurde ein Teil des BO auch in die Plasmamembran eingebaut. Um dies zu verhindern, wurde versucht, BO direkt in den Mitochondrien zu exprimieren.

Zur Expression von Fremdgenen, die normalerweise nukleär codiert sind, müssen in Mitochondrien von *S. cerevisiae* alle abweichenden Stellen des zu exprimierenden Gens durch ortsspezifische Mutagenese dem mitochondrialen genetischen Code angepaßt werden (Tab. 5).

Tab. 5: Bekannte Abweichungen des genetischen Codes bei Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae* im Vergleich zum universellen genetischen Code (FOX, 1987)

Codon	Aminosäure im mitochondrialen Code	Aminosäure im universellen Code
UGA	Tryptophan	Kettenabbruch
AUA	Methionin	Isoleucin
CUN	Threonin	Leucin

Ein weiteres Problem stellt die Eingliederung des Fremdgens in das mitochondriale Genom dar. Da mitochondriale Genome effizient homolog rekombinieren, kann das Fremdgen in einem Plasmid zwischen mitochondrialen Sequenzen eingebaut werden, wodurch gezielte Integration in die mitochondriale DNA erreicht werden kann.

Bisher ist die Biolistische Transformation die einzige Methode zur Transformation von Mitochondrien. Bei dieser Technik wird DNA in Zellen geschossen, wobei sie teilweise in die Mitochondrien gelangt (2.7.11). Da die Biolistische Transformation der Hefe *S. cerevisiae* und deren mitochondriale Genetik am besten untersucht sind, wurde dieser Organismus zur Expression von BO in Mitochondrien ausgewählt.

3.5.1 Anpassung des BO-Gens an den genetischen Code der mitochondrialen DNA von *Saccharomyces cerevisiae*

Um die Expression von BO in Mitochondrien von *S. cerevisiae* zu ermöglichen, wurde ein BO-Gen mit dem mitochondrialen genetischen Code dieser Hefe (3.5) durch ortsspezifische Mutagenese hergestellt. Es wurden nur die Änderungen eingebracht, die den Einbau falscher Aminosäuren oder den Kettenabbruch verhindern. Die Häufigkeit, mit der ein bestimmtes Codon im Mitochondriengenom von *S. cerevisiae* benutzt wird, blieb unberücksichtigt.

Als Template für die ortsspezifische Mutagenese diente das Plasmid pLZ1bos (POMPEJUS et al., 1993). Als Primer wurden die Oligonukleotide MTBOS1 bis MTBOS9 eingesetzt (2.6; 2.7.6.4). Eine Genkarte des neuen BO-Gens mtbos mit Markierung der Änderungen im Vergleich zum bos-Gen und der Lage der Primer ist im Anhang (7.1) gezeigt.

Das Gen wurde in zwei durch die BclI-Restriktionsschnittstelle getrennten Stücken amplifiziert. Für den vorderen Genteil wurden drei aufeinanderfolgende PCRs durchgeführt, für den hinteren Teil waren vier aufeinanderfolgende PCR-Schritte notwendig. Durch Ersetzen von zwei aufeinanderfolgenden nukleären Tryptophancodons (Aminosäuren 139 und 140) durch das im universellen Code für Kettenabbruch und im mitochondrialen Code für Tryptophan stehende TGA wurde sichergestellt, daß die Expression von BO im Cytoplasma nicht möglich ist. Die amplifizierten Sequenzen wurden nach der letzten PCR mit dem Sure Cloning Kit (Pharmacia) in die SmaI-Schnittstelle von pUC18 kloniert (2.7.6.3). Daraus resultierten die Plasmide pLF5 (pUC18 mit dem 5'-Ende des mtbos-Gens) und pLF6 (pUC18 mit dem 3'-Ende des mtbos-Gens) (Abb. 23).

Um ein Plasmid für die Biolistische Transformation zu erhalten, wurde aus dem Plasmid pDS24, einem Derivat von pBLUESCRIPT KS, (Abb. 23, STEELE et al. 1996) das Arg8^m-Gen gegen das mtbos-Gen ausgetauscht. Dies geschah in zwei Schritten. Zunächst wurde der hintere Genteil von mtbos eingeführt. Dazu wurde aus pDS24 ein Stück mit BclI und BamHI entfernt und durch den hinteren Teil des mtbos-Gens (aus pLF6 mit BclI und BamHI ausgeschnitten) ersetzt. Aus dem daraus resultierenden Plasmid wurde das Stück zwischen AccI und BclI entfernt. An diese Stelle wurde der vordere Teil des mtbos-Gens, der mit AccI und BclI aus pLF5 ausgeschnitten worden war, eingesetzt. Es resultierte pLF7 (Abb. 23). Die Sequenzen wurden durch DNA-Sequenzierung überprüft (2.7.7).

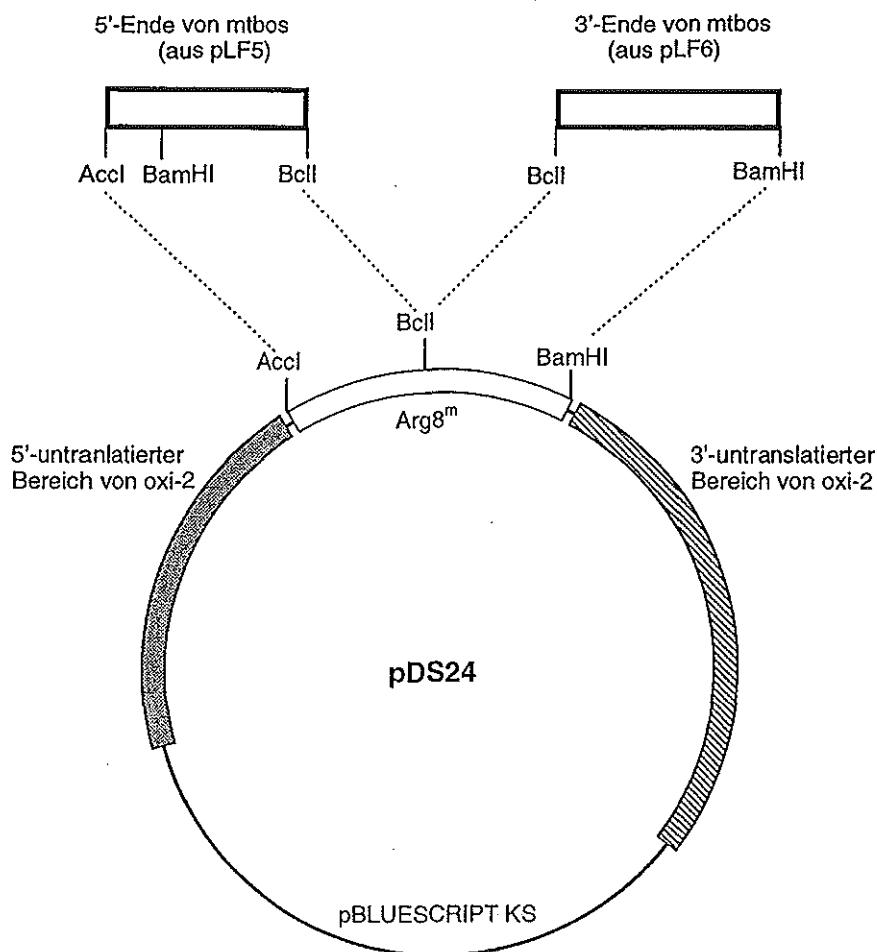


Abb. 23: Konstruktion von pLF7

Das mtbos-Gen in pLF7 ist im Leseraster hinter den ersten 8 Codons der für die Untereinheit III der Cytochrom-c-Oxidase (coxIII) kodierenden Sequenz integriert. Stromaufwärts vor dem kodierenden Bereich befindet sich der 5'-untranslatierte Bereich des mitochondrialen oxi-2-Gens von *S. cerevisiae* (1,6 kb). Der hinter dem mtbos-Gen liegende Bereich entspricht dem 3'-untranslatierten Teil des oxi-2-Gens (2,3 kb). Bei erfolgreicher Biolistischer Transformation kann das mtbos-Gen über homologe Rekombination dieser Randbereiche mit entsprechenden Bereichen des mitochondrialen Genoms an die Stelle des oxi-2-Gens integriert werden.

3.5.2 Biolistische Transformation

Die Biolistische Transformation wurde im Labor von T. D. Fox (Cornell-University, Ithaca, U.S.A.) durchgeführt. Das Plasmid pLF7 (3.5.1) wurde aus dem *E. coli* Stamm DH5 α mit dem QIAGEN Plasmid Midi Kit isoliert und über Biolistische Transformation in die Mitochondrien des *S. cerevisiae* Stammes DFS160 (rho⁰) gebracht (2.4.1, Tab. 4). Zur Selektion auf Kerntransformaten wurde ein weiteres Plasmid mit dem Leu2-Marker eingesetzt, um die Mutation im Leu-Gen des Empfängerstammes DFS160 (rho⁰) zu komplementieren. Die Mischung aus beiden Plasmiden wurde auf Wolframpartikel präzipitiert. Diese wurden in einer Apparatur zur Biolistischen Transformation (DuPont) auf Agarplatten mit einem Zellrasen von DFS160 (rho⁰) geschossen (2.7.11). Zellen mit dem Plasmid mit dem Leu2-Marker können wachsen. Unter diesen Zellen wurden solche gesucht, die das Plasmid pLF7 in den Mitochondrien enthalten. Dies erfolgte durch Kreuzen der Klone mit dem *S. cerevisiae* Stamm GW22, in dessen mitochondrialem Genom eine Mutation im 5'-untranslatierten Bereich des oxi-2-Gens vorliegt. Diese Mutation kann durch homologe Rekombination mit der entsprechenden Sequenz von pLF7 komplementiert werden, wenn GW22 mit Klonen, in deren Mitochondrien pLF7 enthalten ist, gepaart wird. Es wird Cytochrom c-Oxidase gebildet, die Zellen können auf YPEG wachsen.

Die mitochondrialen Transformanten wurden auf Selektionsplatten (SD-Lys) vereinzelt. Klone mit pLF7 in den Mitochondrien wurden erneut durch Testpaarung mit GW22 identifiziert. Vereinzeln und Testpaarung mit GW22 erfolgten insgesamt dreimal, um zu gewährleisten, daß reine und genetisch stabile Klone isoliert wurden. Nach den ersten Selektionsschritten wurde immer Leucin im Medium zugesetzt, so daß das autonom replizierende Plasmid mit dem Leu2-Marker verloren ging.

Der resultierende *S. cerevisiae* Stamm EF2 ist durch folgenden Genotyp gekennzeichnet:

- Kern: ade2-101, [ura3-52], Δ leu2, arg8 Δ ::URA3, kar1-1
- Mitochondrium: pLF7 (synthetischer rho)

3.5.3 Herstellen eines *Saccharomyces cerevisiae* Stammes, der BO in den Mitochondrien exprimiert

Um BO in den Mitochondrien exprimieren zu können, muß das mtbos-Gen in eine geeignete mitochondriale DNA (ρ^+) integriert werden. Der Stamm EF2 (3.5.2) wurde mit einem ρ^+ -Stamm gepaart, so daß nach homologer Rekombination der 5' und 3' Sequenzen von oxi-2 mit den flankierenden homologen Sequenzen um mtbos in pLF7 (3.5.1) das oxi-2-Gen gegen mtbos ausgetauscht wird (2.7.13). Ein solcher Stamm ist GW22, der bereits zur Verifizierung der mitochondrialen Transformanden eingesetzt wurde (3.5.2). Bei der Paarung von EF2 und GW22 entstehen fast ausschließlich haploide Zellen, da die Kernverschmelzung der gepaarten Stämme durch die kar1-1 Mutation im Stamm EF2 verhindert wird. Bei Paarung der Stämme ist die Bildung von Diploiden nicht ganz ausgeschlossen.

Zur Paarung wurden stationäre Kulturen von EF2 und GW22 im Verhältnis 1:1 gemischt und über Nacht auf YPD-Agar inkubiert. Die aus der Paarung hervorgegangenen Zellen wurden zur Selektion Kern-kodierter Marker von GW22 auf SD-Platten mit Lysin als einziger Aminosäure vereinzelt. Die angewachsenen Zellen enthalten verschiedene mitochondriale Genome, da zwischen dem mitochondrialen Genom von GW22 und pLF7 verschiedene Rekombinationsereignisse möglich sind (Abb. 24).

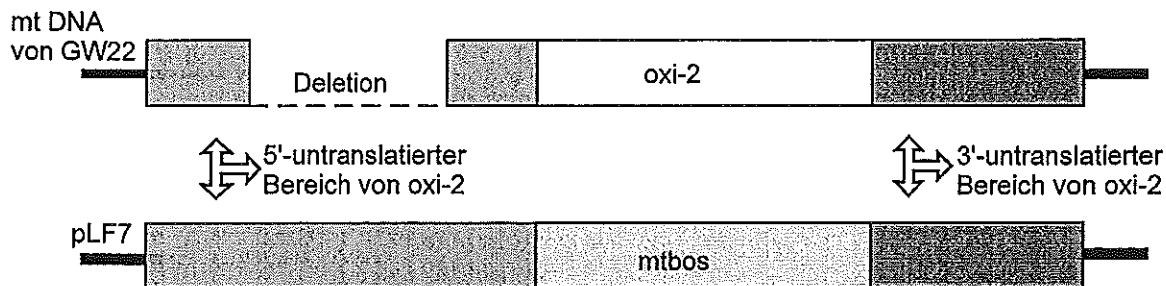


Abb. 24: Schema des mitochondrialen Genoms von GW22 im Vergleich zu pLF7

Unter den auf SD-Lys angewachsenen Kolonien wurden diejenigen mit dem mitochondrialen ρ^+ -mtbos-Genom durch Paarung mit Teststämmen selektiert (Tab. 6) (2.7.13). Alle im Folgenden beschriebenen Testpaarungen und die Selektion durch Wachstum auf YPEG erfolgten parallel. Die Genome, die bereits durch ein Selektionsverfahren ausgeschlossen werden konnten, werden in den sich anschließenden Ausführungen nicht mehr erwähnt.

Als erstes Merkmal diente das Wachstumsverhalten der Kolonien auf YPEG. Es wuchsen nur Zellen mit vollständigem mitochondrialen Genom (D, Tab. 6). Unter den verbleibenden Kolonien (A-C und E-H, Tab. 6) wurden durch Testpaarung mit dem Stamm MCC259 diejenigen selektiert, in denen mtbos oder oxi-2 im ρ^+ -Genom integriert sind. MCC259 Mitochondrien enthalten nur das oxi-2-Gen, die übrigen Sequenzen des wildtypischen Mitochondriengenoms müssen vom Paarungspartner bezogen werden, damit Wachstum auf YPEG möglich ist. Mögliche Partner dafür sind Klone, die das in Tab. 6 mit A, C und E bezeichnete mitochondriale Genom enthalten (D wurde

durch die Wachstumsfähigkeit auf YPEG wie oben beschrieben ausgesondert). Kolonien mit Zielgenom (A) können von Kolonien mit C-Genom oder E-Genom durch Paarung mit dem Stamm GW46 unterschieden werden. Die Deletion im 5'-untranslatierten Bereich von oxi-2 im rho⁺-Genom von GW46 kann nur bei Paarung mit Klonen mit A-Genom komplementiert werden. Nur die aus dieser Paarung hervorgehenden Zellen wachsen auf YPEG (Tab. 6). Durch Paarung von Kolonien mit A-Genom mit den Teststämmen V76 und CAB3, deren mitochondriale Genome Mutationen im oxi-2-Strukturgen enthalten, kann gezeigt werden, daß Kolonien mit A-Genom kein oxi-2-Strukturgen enthalten. Da keiner der Paarungspartner das oxi-2-Strukturgen enthält, kann keine Cytochrom c-Oxidase in den aus der Paarung hervorgegangenen Zellen exprimiert werden, die Zellen können auf YPEG nicht wachsen (Tab. 6).

Tab. 6: Wachstum der Resultierenden einer Paarung von EF2 mit GW22 nach Paarung mit Test-Stämmen

	mögliche Kombinationen des mitochondrialen Genoms	Wachstum auf YPEG	Wachstum auf YPEG nach Paarung mit MCC259	Wachstum auf YPEG nach Paarung mit GW46	Wachstum auf YPEG nach Paarung mit V76 oder CAB3
A	rho ⁺ , 3'-oxi-2, mtbos (Zielgenom)	-	+	+	-
B	rho ⁻ , 3'-oxi-2, mtbos	-	-	+	-
C	rho ⁺ , Δ3'-oxi-2, oxi-2	-	+	-	+
D	rho ⁺ , 3'-oxi-2, oxi-2	+	+	+	+
E	rho ⁺ , Δ3'-oxi-2, mtbos	-	+	-	-
F	rho ⁻ , Δ3'-oxi-2, oxi-2	-	-	-	+
G	rho ⁻ , 3'-oxi-2, oxi-2	-	-	+	+
H	rho ⁻ , Δ3'-oxi-2, mtbos	-	-	-	-

Wiederholte Vereinzelung und erneute Selektion führten zur Isolierung einiger genetisch stabiler Stämme mit einem mitochondrialen Genom, welches das mtbos-Gen und den 3'- und 5'-untranslatierten Bereich des oxi-2-Gens, nicht aber die kodierende Sequenz des oxi-2-Gens enthält. Diese isogenen Stämme erhielten die Namen EF10, EF11 und EF15.

3.5.4 Lokalisation von mtbos in Gesamt-DNA Präparationen von EF11

Aus der Paarung von EF2 (Kapitel 3.5.2) mit GW22 waren drei Stämme hervorgegangen, die laut Testpaarungen im mitochondrialen Genom das mtbos-Gen und den 3'- und 5'-untranslatierten Bereich des oxi-2-Gens, nicht aber die kodierende Sequenz des oxi-2-Gens, enthalten (EF10, EF11, EF15, Kapitel 3.5.3). Genaue Aussagen zur Lokalisation des mtbos-Gens in den Genomen dieser Stämme sind aber durch die Testpaarungen allein nicht möglich. Daher erfolgte der Nachweis des mtbos-Gens

im Genom von EF11 mittels PCR (3.5.3, Abb. 28). Eine Southernblotanalyse diente dem Nachweis der korrekten Lokalisation von mtbos im mitochondrialen Genom von EF11.

PCR:

Primer konnten in der PCR aufgrund der besonders AT-reichen Sequenzen im 5'-untranslatierten Bereich von oxi-2 nur in einem Bereich, der auch schon in pLF7 enthalten ist, gesetzt werden. Versuche mit weiter außerhalb dieser Sequenz liegenden Primern ergaben kein PCR-Produkt.

Als Template wurden Gesamt-DNA-Präparationen von EF11 und GW22 und eine Mischung aus Gesamt-DNA von GW22 mit dem Plasmid pLF7 eingesetzt. Als Primer wurden zur Amplifizierung von mtbos die Oligonukleotide MTBOS1 und MTBOS9 verwendet. Die Amplifizierung eines Teils des 5'-untranslatierten Bereichs vor mtbos und dem ersten Teil von mtbos erfolgte mit den Oligonukleotiden VORCOX und MTBOS3 (2.6) (Abb. 25). Die PCR wurde in 50 µl Ansätzen durchgeführt (2.7.6).

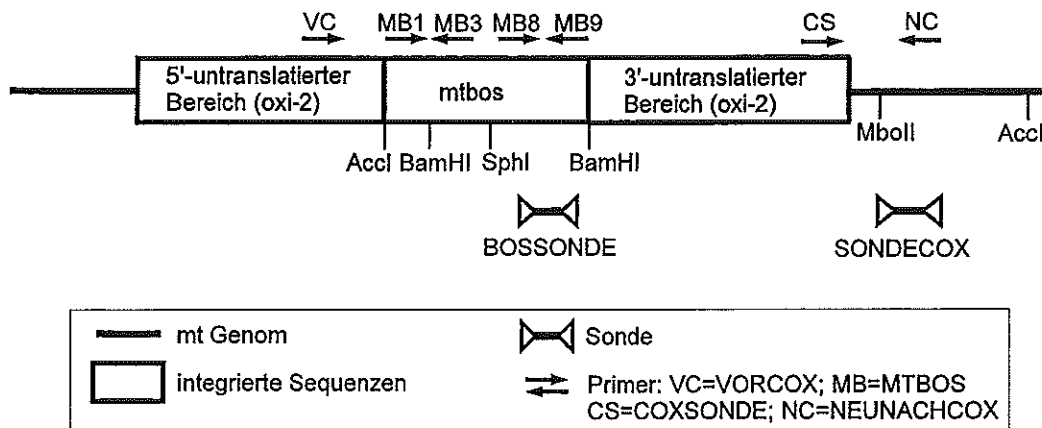


Abb. 29: schematische Darstellung der Lage der Primer und DNA-Sonden in mtbos mit den flankierenden mitochondrialen Sequenzen bei korrekter Insertion von mtbos

Nach der PCR wurden 10 µl des Ansatzes mit EF11-DNA als Template und den Primern MTBOS1 und MTBOS9 mit SphI geschnitten. 10 µl des Ansatzes mit EF11-DNA als Template und den Primern VORCOX und MTBOS3 wurden mit BamHI geschnitten. Die Restriktionsansätze und 10 µl der PCR-Ansätze wurden im 1,5%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt. Die Banden wurden unter UV-Licht sichtbar gemacht (Abb. 26).

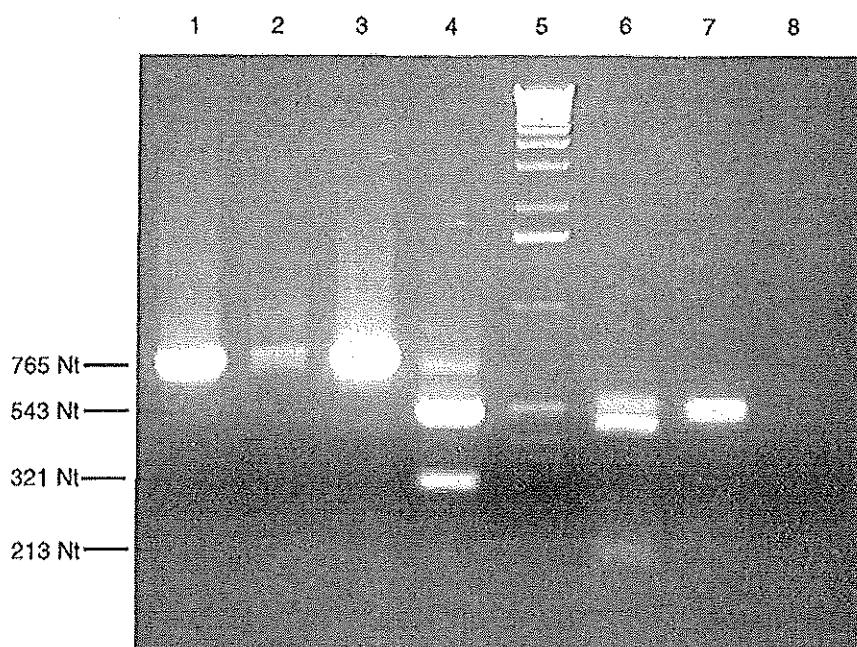


Abb. 26: Agarosegel mit PCR-Ansätzen mit den Primern MTBOS1 und MTBOS9 (Spuren 1-4) bzw. den Primern VORCOX und MTBOS3 (Spuren 6-8). Als Template dienten Gesamt-DNA-Extraktionen von:

- Spur 1: GW22 und das Plasmid pLF7
- Spur 2: GW22
- Spur 3: EF11
- Spur 4: EF11, PCR-Produkt mit SphI geschnitten
- Spur 5: DNA-Längen-Standard (1 kb Leiter, Gibco/BRL)
- Spur 6: EF11, PCR-Produkt mit BamHI geschnitten
- Spur 7: EF11
- Spur 8: GW22

Die Sequenz von *mtbos* konnte aus Gesamt-DNA von EF11 amplifiziert werden (Spur 3, Abb. 26). Die Restriktion des PCR-Produkts mit SphI ergab die für *mtbos* zu erwartenden Banden (Abb. 25) mit Längen von 492 Nukleotiden und 273 Nukleotiden (Spur 4, Abb. 26). Über diesen Banden ist noch eine schwache Bande ungeschnittener DNA zu sehen. Die Amplifikation mit den *mtbos* spezifischen Primern MTBOS1 und MTBOS9 mit Gesamt-DNA von GW22 als Template ergab eine sehr schwache diffuse Bande, die als unspezifisches PCR-Produkt zu deuten ist (Spur 2, Abb. 26). Erst nach Zusatz von pLF7 zu Gesamt-DNA von GW22 kann wie bei Gesamt-DNA von EF11 *mtbos* amplifiziert werden (Spur 1, Abb. 26). Die Amplifikation mit GW22 als Template und den Primern VORCOX und MTBOS3 ergab, wie aufgrund des fehlenden *mtbos* zu erwarten, kein PCR-Produkt (Spur 8, Abb. 26). Wurde dagegen Gesamt-DNA von EF11 als Template eingesetzt, erhielt man ein Produkt mit 535 Nukleotiden Länge (Spur 7, Abb. 26). Dieses Produkt wurde durch BamHI in zwei Stücke (434 und 101 Nukleotide) geschnitten (Spur 6, Abb. 26). Die darüber liegende Bande ist ungeschnittenes PCR-Produkt. Es konnte ein Stück des 5'-untranslatierten Bereichs von *oxi-2* mit dem anschließenden 5'-Ende von *mtbos* amplifiziert werden. Dies entspricht den Erwartungen, wenn man davon ausgeht, daß in EF11 *mtbos* mit den über pLF7 eingeführten flankierenden Sequenzen vorliegt (Abb. 26).

Southernblotanalyse:

Es wurden zwei Sonden mittels PCR bei gleichzeitigem Einbau von Digoxigenin markiertem dUTP hergestellt (Abb. 25 zeigt die Lage der Sonden.).

Für eine mtbos-spezifische Sonde wurde als Template pLF7 eingesetzt. Als Primer dienten die Oligonukleotide MTBOS8 und MTBOS9. Diese Sonde (BOSSONDE) ist gegen das 3'-Ende von mtbos gerichtet.

Zur Herstellung einer Sonde (SONDECOX), die gegen den 3'-untranslatierten Bereich des oxi-2-Gens gerichtet ist (nicht in pLF7 vorhanden), wurde wie folgt vorgegangen. In einer PCR (2.7.6) wurde mit Gesamt-DNA aus dem *S. cerevisiae*-Stamm D273-10B (Wildtyp) als Template und den Oligonukleotiden COXSONDE und NEUNACHCOX ein Stück des 3'-untranslatierten Bereichs von oxi-2 amplifiziert. Die Sequenz wurde in das Plasmid PCR-Script SK⁺ (Stratagene) in die SrfI-Schnittstelle kloniert (2.7.6.3). Sequenzierung des amplifizierten DNA-Stücks ergab, daß nur der Teil von der MboI-Schnittstelle (Abb. 25) bis zum Primer NEUNACHCOX korrekt war. Im übrigen Bereich war eine kleine Deletion. Deletionen treten in der mitochondrialen DNA besonders in den nicht kodierenden Regionen aufgrund des AT-Reichtums der Sequenzen häufig auf. Der korrekte Bereich wurde durch Schneiden mit MboI und BamHI isoliert, zur Erzeugung glatter Enden mit Klenow behandelt und in die SmaI-Schnittstelle von pUC18 kloniert. Die SONDECOX konnte aus dem resultierenden pUC-Derivat mit den Primern NEUNACHCOX und Universal-Primer unter Einbau von Digoxigenin markiertem dUTP amplifiziert werden.

Für die Southernblotanalyse wurden Gesamt-DNA-Präparationen (1 µg DNA) von EF11 und GW22 mit Accl und Accl/BamHI über Nacht bei 37 °C geschnitten. Die DNA wurde im 0,8%igen Agarosegel elektrophoretisch getrennt (Abb. 27) und auf eine Nylonmembran transferiert. (2.7.8). Die erste Hybridisierung erfolgte mit der Sonde BOSSONDE. Die Detektion erfolgte nach Herstellerangaben mit Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat und dem Chemoluminiszenz-Substrat CPD-Star (Boehringer) (Abb. 27). Anschließend wurde die BOSSONDE von der Membran nach Herstellerangaben (CPD-Star, Boehringer) entfernt. Zur zweiten Hybridisierung wurde SONDECOX eingesetzt. Die Detektion erfolgte wie bei Einsatz der BOSSONDE (Abb. 27)

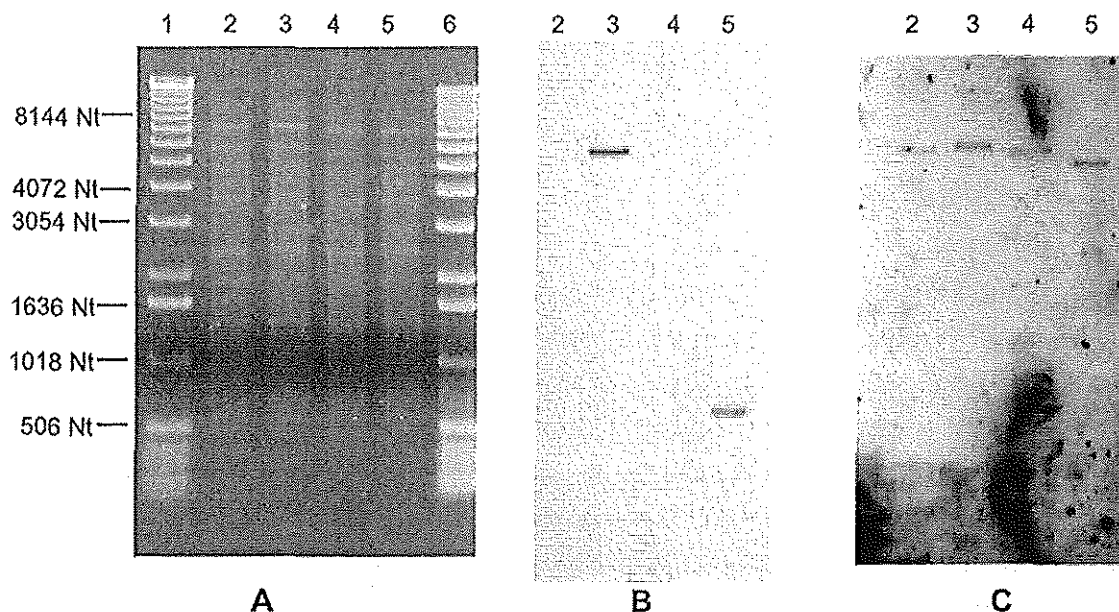


Abb. 27: Southernblotanalyse von geschnittener Gesamt-DNA aus EF11 und GW22
A: Agarosegel nach Färben mit Ethidiumbromid vor dem Transfer
B: Membran, Hybridisierung mit BOSSONDE
C: Membran, Hybridisierung mit SONDECOX
Spuren 1 und 6: DNA-Längen-Standard
Spur 2: Gesamt-DNA aus GW22, geschnitten mit Accl
Spur 3: Gesamt-DNA aus EF11, geschnitten mit Accl
Spur 4: Gesamt-DNA aus GW22, geschnitten mit Accl und BamHI
Spur 5: Gesamt-DNA aus EF11, geschnitten mit Accl und BamHI

Mit der BOSSONDE konnte nur in geschnittener Gesamt-DNA von EF11 jeweils eine Bande detektiert werden (Abb. 27 B, Spuren 3 und 5). GW22 enthält keine zu BOSSONDE homologen DNA-Sequenzen. SONDECOX hybridisiert sowohl mit DNA aus GW22 als auch mit DNA aus EF11 (Abb. 27 C). In jeder DNA ist wie zu erwarten die der SONDECOX homologe DNA-Sequenz enthalten. Im Fall der DNA, die nur mit Accl geschnitten wurde, hybridisiert ein etwa 6 kb langes DNA Stück mit der BOSSONDE (Abb. 27 B, Spur 3) als auch mit SONDECOX (Abb. 27 C, Spur 3). Dies entspricht den Erwartungen, wenn mtbos an der richtigen Stelle in die mitochondriale DNA inseriert ist (Abb. 25). Bei Doppelrestriktion mit Accl/BamHI wird das 6 kb große DNA-Stück in drei Fragmente zerlegt. Dabei wird mit BamHI in der mtbos-haltigen DNA das hintere, 646 Nukleotide lange mtbos-DNA-Stück ausgeschnitten (Abb. 25). Dieses wird in Accl und BamHI geschnittener DNA aus EF11 mit der BOSSONDE detektiert (Abb. 27 B, Spur 5). Weitere Fragmente aus diesem Restriktionsansatz sind der vordere Teil des mtbos-Gens (112 Nukleotide) und schließlich der 3'-untranslatierte Bereich des oxi-2-Gens von BamHI bis Accl (etwa 5,3 kb), der mit SONDECOX detektiert werden kann (Spur 5, Abb. 27 C). Somit wurde gezeigt, daß das mtbos-Gen in richtiger Orientierung vor den 3'-untranslatierten Bereich des oxi-2-Gens in der mitochondrialen DNA von EF11 inseriert ist.

Durch die PCR-Analyse und die Southernblotanalyse konnte gezeigt werden, daß das Gen *mtbos* in korrekter Orientierung in den mitochondrialen Genlocus des *oxi-2*-Gens im *S. cerevisiae* Stamm EF11 ausgetauscht wurde.

3.5.5 Transkription von *mtbos* in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae*

Zum Nachweis von *mtbos* mRNA wurde Gesamt-RNA der Stämme EF10, EF11 und EF15 und als Kontrolle aus GW22 präpariert (2.8.2). Diese RNA wurde mit DNase inkubiert, gelelektrophoretisch (0,8%iges Agarosegel) aufgetrennt und auf eine Nytranmembran transferiert. Als Sonde für die *mtbos*-mRNA wurde das BamHI-Fragment von *mtbos* (646 Nukleotide, vergleiche Anhang) aus dem Plasmid pLF7 isoliert (3.5.1). Die Markierung erfolgte im „random primed“ Verfahren nach Herstellerangaben mit Komponenten des „Digoxigenin Labelling and Detection Kit“ (Boehringer Mannheim). Die Hybridisierung erfolgte über Nacht in High-SDS-Hybridisierungspuffer mit Kalbsthymus-DNA bei 42 °C. Die Detektion wurde nach Herstellerangaben mit Anti-Digoxigenin-Alkalische Phosphatase-Konjugat und dem Chemoluminiszenz-Substrat CPD-Star (Boehringer Mannheim) durchgeführt (Abb. 28).

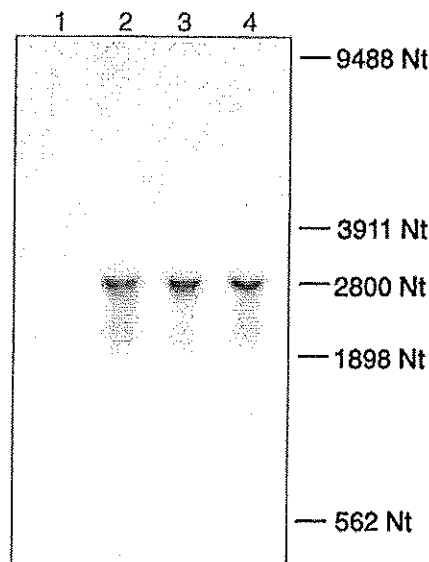


Abb. 33: Northernblot-Analyse von Gesamt-RNA aus den aufgeführten *S. cerevisiae* Stämmen:
 Spur 1: GW22
 Spur 2: EF10
 Spur 3: EF11
 Spur 4: EF15

In den Gesamt-RNA-Präparationen der Stämme EF10, EF11 und EF15 wurde nur eine RNA-Bande von etwa 3000 Nukleotiden detektiert (Spuren 2-4, Abb. 28). Die Kontrolle (Spur 1, Abb. 28) zeigt, daß keine Kreuzreaktion mit anderen DNA-Sequenzen als der von *mtbos* vorliegt.

3.5.6 Translation von BO in Mitochondrien von *Saccharomyces cerevisiae*

Um BO in den Mitochondrien der Stämme EF10, EF11 und EF15 (3.5.3) zu exprimieren, wurden sie in YPGal Medium angezogen. Galaktose steigert die Expression von *oxi-2* durch Induktion des *oxi-2*-Translationsfaktors Pet494 (1.3.1). Damit sollte auch die Expression des unter Kontrolle des *oxi-2*-Promotors stehenden *mtbos* gesteigert sein. Aus den Zellen wurden Mitochondrien isoliert (2.10.1). Die mitochondrialen Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. BO wurde mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper α BR (G. Rosenberg) in einer Verdünnung von 1:250 nachgewiesen. Die Detektion erfolgte mit dem Chemoluminiszenzsubstrat Super Signal Ultra (Pierce) (2.9.8, Abb. 29).

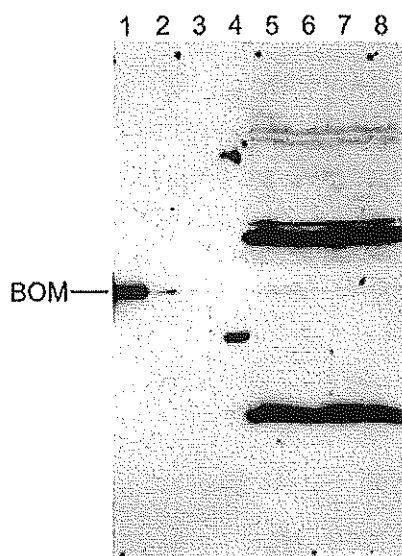


Abb. 29: Westernblotanalyse mitochondrialer Proteine aus verschiedenen Stämmen von *S. cerevisiae*
 Spuren 1-3: 20 ng, 10 ng und 5 ng Purpurmembran
 Spur 4: Protein-Molekulargewichts-Standard
 Spuren 5-8: mitochondriales Protein von EF10, EF11, EF15 und GW22
 Der BO-Nachweis erfolgte mit α BR (G. Rosenberg), der gegen den C-Terminus von BO gerichtet ist. Die in Spur 4 (Protein-Molekulargewichts-Standard, Amersham, rainbow, high molecular weight) auftretenden Banden sind auf Kreuzreaktionen der Proteine mit den Antikörpern zurückzuführen.

Die Nachweisgrenze lag bei 10 ng BO pro Spur (Abb. 29, Spuren 1-3). Die Banden des mitochondrialen Proteins aus den verschiedenen Hefestämmen (Spuren 5-8, Abb. 29) sind auf unspezifische Kreuzreaktionen mit den eingesetzten Antikörpern zurückzuführen, wie die Kontrolle (mitochondriales Protein aus GW22, Spur 8, Abb. 29) zeigt. Es konnte in den Stämmen EF10, EF11, EF15 kein exprimiertes BO nachgewiesen werden.

4 DISKUSSION

In vorangegangenen Arbeiten verknüpften HOFFMANN et al. (1994) Bacterioopsin (BO) mit der N-terminalen Signalsequenz für den Import in Mitochondrien der Untereinheit IV der Cytochrom c-Oxidase (coxIV) von *Saccharomyces cerevisiae*. Die Expression dieses Konstrukts in *Schizosaccharomyces pombe* führte nur zum teilweisen Einbau von BO in die innere Mitochondrienmembran. Ein Großteil des exprimierten BO war in der Cytoplasmamembran lokalisiert. Dies erschwert Untersuchungen Energie-abhängiger Prozesse in den Mitochondrien, so wie auch Untersuchungen zum Einbau von BO in mitochondriale Membranen, da sich hier zwei möglicherweise verschiedene Prozesse, der Einbau von BO in die Cytoplasmamembran und in die innere Mitochondrienmembran, in einer Zelle überlagern.

In der vorliegenden Arbeit sollte ein System entwickelt werden, bei dem Bacteriorhodopsin (BR) ausschließlich in die innere Mitochondrienmembran eingebaut wird. Es wurden zwei Ansätze verfolgt:

Expression von BO und BO-Teilstücken im Cytoplasma und gezielter Import in die Mitochondrien und Einbau in die innere Mitochondrienmembran durch eine effiziente Signalsequenz. Alternativ dazu sollte die Expression bereits im Zielkompartiment Mitochondrien erfolgen, um ausgehend von der mitochondrialen Matrix den Einbau in die innere Mitochondrienmembran zu forcieren.

4.1 Import von Bacterioopsin in Mitochondrien

In allen Experimenten zum Import von BO in Mitochondrien und zum Einbau in die innere Mitochondrienmembran wurde vergleichend das Fusionsprotein aus BOP (BO mit eigener Signalsequenz) und N-terminaler Signalsequenz coxIV für den Import der Untereinheit IV der Cytochrom c-Oxidase in Mitochondrien von *S. cerevisiae* eingesetzt, um den Erfolg der Optimierungsversuche zu verfolgen (HOFFMANN et al., 1994).

Da offenbar die coxIV-Sequenz im Fall von BO nicht stark genug ist, um größere Mengen BO zur inneren Mitochondrienmembran zu dirigieren, war die Intention, andere mitochondriale Signalsequenzen zu testen. Es wurde die Präsequenz der Untereinheit 9 des F_0 -Teils der mitochondrialen ATPase aus *Neurospora crassa* (SU9) ausgewählt. Bei dieser Signalsequenz handelt es sich um eine ungewöhnlich lange und polare Präsequenz von 66 Aminosäuren (VIEBROCK et al., 1982). VIEBROCK et al. postulieren, daß diese Präsequenz den Gegenpol zum extrem hydrophoben reifen Proteolipid darstellt. Die Kombination aus hydrophiler Präsequenz und hydrophobem Protein soll den post-translationalen Import in die Mitochondrien positiv beeinflussen. Da BO ein sehr hydrophobes Membranprotein ist, wurde vermutet, daß SU9 als Signalsequenz im Vergleich zu coxIV mehr BO ins Mitochondrium dirigieren könnte. Ein weiteres Argument für die Verwendung von SU9 ist die Beobachtung, daß auch andere Passagierproteine wie die Dihydrofolatreduktase (DHFR) mit dieser Signalsequenz äußerst effizient in Mitochondrien importiert werden können (PFANNER et al., 1987). Die SU9-Sequenz wurde analog zu Versuchen von PFANNER et al. (1987) N-terminal an die Vorläuferform von BO fusioniert (3.1.1). Das resultierende BOP-Protein enthält am N-Terminus die

Sequenz von SU9 und die ersten drei Aminosäuren der reifen Untereinheit 9 des F_0 -Teils der ATPase, welche für den Import essentiell sind (persönliche Kommunikation mit J. Rassow, Freiburg). Das ATG des BOP-Teils wurde nicht entfernt. Auch coxIV-BOP enthält noch das BOP-eigene ATG. Möglicherweise ist dies der Grund für die beobachtete falsche Initiation hinter der Präsequenz bei der *in vitro* Translation der Konstrukte aus BOP mit den verschiedenen mitochondrialen Präsequenzen.

Die Expression von SU9-BOP in Zellen von *S. pombe* konnte soweit als erfolgreich eingestuft werden. Es wurden allerdings geringere Proteinmengen als bei der Expression von coxIV-BOP erreicht. Zusatz von all-*trans*-Retinal ins Medium führte in beiden Fällen zu rot gefärbten Zellen, was ein Indiz für erfolgreiche Regeneration von BO zu BR ist (3.1.2). Dies ist die Voraussetzung für die Funktionalität des BR, die im Fall von coxIV-BOP bereits nachgewiesen werden konnte (HOFFMANN et al., 1994).

Beim Transport von Vorläuferproteinen in die Mitochondrien wird die N-terminale Signalsequenz abgespalten (HARTL, NEUPERT, 1990). Diese Prozessierung war sowohl bei coxIV-BOP als auch bei SU9-BOP zu beobachten. Allerdings blieb ein großer Teil beider Hybridproteine unprozessiert. Daraus kann man schließen, daß ein nur ungenügender Import in die Mitochondrien stattfindet, oder daß die Fusionsproteine auf einem anderen als dem bekannten Wegen importiert werden. Die letzte Möglichkeit ist jedoch eher unwahrscheinlich, da dabei der N-Terminus des Vorläufers nie den Matrixraum erreicht hätte. Es käme ansonsten zur Prozessierung durch die Matrixpeptidase, es sei denn, daß die Erkennungssequenz für die Matrixpeptidase oder ihre Schnittstelle in den BO-Fusionsproteinen von diesem Enzym nicht erreicht werden kann.

Die Präsequenz SU9 führte wahrscheinlich nicht zu einer Steigerung des Imports von BO in die Mitochondrien von *S. pombe*. Ein möglicher Grund könnte die im Vergleich zur Untereinheit 9 des F_0 -Teils der ATPase (81 Aminosäuren, VIEBROCK et al., 1982) deutlich größere Länge von BR (Präform: 262 Aminosäuren) sein. Diese Vermutung wird durch die Ergebnisse von CLAROS et al. (1995) gestützt. Sie zeigten, daß das Membranprotein Apocytochrom *b* als Fusion mit N-terminalen Signalsequenzen nur importiert wird, wenn nicht mehr als vier Transmembran-Helices gleichzeitig vorhanden sind. Daher wurde BR in zwei Teilstücken AB (Helices A und B: 91 Aminosäuren) und CG (Helices C bis G: 185 Aminosäuren) mit der coxIV-Signalsequenz in *S. pombe* exprimiert. Die Expression von coxIV-CG und coxIV-AB in *S. pombe* zeigte wie bereits die Expression von SU9-BOP und coxIV-BOP nur eine partielle Prozessierung (3.2). Daher kann vom unvollständigen Transport der BO-Teilstücke in die Mitochondrien ausgegangen werden. Die Regeneration zu BR mit all-*trans*-Retinal führte zur Braunfärbung der Zellen, die nicht erklärt werden kann, aber ein Indiz für eine Störung der BR-Funktion sein kann. Die Farbveränderung im Vergleich zu Zellen, die kein BO exprimieren, zeigt aber auch, daß ein Einbau von BO in Membranen stattgefunden hat. LIAO et al. (1984) konnten Teilstücke von BR erfolgreich in Liposomen nach Zusatz von all-*trans*-Retinal zu funktionalem BR rekonstituieren.

Eine Frage ist, wie BO in die Cytoplasmamembran von *S. pombe* gelangt, wenn das Protein über mitochondriale Signalsequenzen verfügt. In Eukaryonten werden kernkodierte mitochondriale Proteine und Proteine der Cytoplasmamembran auf zwei völlig verschiedenen Wegen transportiert. Kernkodierte mitochondriale Proteine werden im Cytosol durch freie Ribosomen synthetisiert und durch eine N-terminale Präsequenz posttranslational ins Mitochondrium dirigiert. Proteine der Plasmamembran werden dagegen an Ribosomen, die ans Endoplasmatische Retikulum (ER)

gebunden sind, synthetisiert und cotranslational in die Membran des ER eingebaut. Von dort gelangen sie über Golgi-Vesikel in die Plasmamembran. Dabei spielen auch N-terminale Signalsequenzen eine Rolle. Sobald die Signalsequenz bei der Translation das Ribosom verläßt, wird sie vom Signalerkennungspartikel (SRP), einem Komplex aus mehreren Proteinen und der sogenannten 7S-RNA, gebunden. Die Elongation der Polypeptidkette wird verlangsamt und der Komplex aus SRP und Ribosom wird an das ER geleitet, wo die weitere Translation stattfindet (WALTER et al., 1984). In Halobakterien wurde eine 7S-RNA, die ein Teil des SRP sein kann, gefunden. Allerdings haben die halobakteriellen Membranproteine wie BR ungewöhnlich kurze Signalsequenzen, die anderen bekannten Signalsequenzen nicht ähneln (GROPP et al., 1992). GROPP et al. diskutieren dennoch die Relevanz dieser Sequenzen beim Einbau der halobakteriellen Membranproteine in die Cytoplasmamembran, da sie eine Assoziation der 7S-RNA mit den Ribosomen und der Plasmamembran bei der Translation nachweisen können. XU et al. (1995) finden allerdings, daß die Präsequenz von BO nicht für den Einbau von BO in die Plasmamembran von *H. salinarum* benötigt wird. Sie verhindert nur die Fehlfaltung und die falsche Lokalisation von BO. Die in *S. pombe* gefundenen SRP translocieren viele Proteine posttranslational. HILDEBRANDT et al. (1991) fanden keinen Unterschied im Einbau von BO mit Präsequenz (BOP) und ohne Präsequenz (BOM) bei der Expression in *S. pombe*. BOM exprimierende Zellen zeigten bei der *in vivo* Regeneration zu BR jedoch eine schwächere Rotfärbung als BOP exprimierende Zellen, was gut mit den Befunden zu falscher Faltung und falscher Lokalisation von BOM von XU et al. zu vereinbaren ist. Anscheinend ist nicht nur die N-terminale Signalsequenz für den korrekten Einbau von BO in die Plasmamembran verantwortlich. Die starke Hydrophobizität oder ein weiteres internes Signal könnten BO in die Plasmamembran leiten. Diese Signale könnten die N-terminalen Signalsequenzen für den Import in Mitochondrien in den verschiedenen BO-Hybridproteinen zum Teil außer Kraft setzen. Es kommt trotz mitochondrialer Signalsequenzen zum Einbau von BO in die Plasmamembran von *S. pombe*.

Um Ursachen für den uneffizienten Import von BO in Mitochondrien von *S. pombe* finden zu können, wurden *in vitro* Experimente durchgeführt (3.3). Diese Experimente werden üblicherweise mit Mitochondrien von *S. cerevisiae* durchgeführt, es wurde jedoch keine funktionale Expression von BO in *S. cerevisiae* nachgewiesen (LANG-HINRICHS et al., 1994). Deshalb wurden die für Mitochondrien von *S. cerevisiae* etablierten Untersuchungsmethoden auf Mitochondrien von *S. pombe* übertragen. Folgende Kontrollproteine konnten in die Mitochondrien beider Hefen mit gleicher Effizienz importiert werden: der ADP/ATP Translokator (AAC), die β -Untereinheit der mitochondrialen F_1 -ATPase ($F_1\beta$), und DHFR mit coxIV oder SU9. Damit wurde gezeigt, daß der *in vitro* Import in Mitochondrien von *S. pombe* und von *S. cerevisiae* mit den gleichen Parametern und Proteinen möglich ist. Dies ist ein erster Hinweis, daß Mitochondrien von *S. cerevisiae* und *S. pombe* eine in ihrer Funktionalität ähnliche Protein-Import-Maschinerie besitzen. Die Universalität der Importmaschinerien in Mitochondrien verschiedener Organismen wird von PFANNER et al. (1990) postuliert.

Es kann weder in isolierte Mitochondrien von *S. pombe* noch von *S. cerevisiae* ein Import von BOP mit den Präsequenzen SU9 oder coxIV oder der BO-Teilstück-Hybridproteine coxIV-AB und coxIV-CG gezeigt werden. Dies steht im Gegensatz zum zumindest teilweise gelungenen *in vivo* Import von coxIV-BOP in Mitochondrien von *S. pombe*. Allerdings scheint der Import bei allen Experimenten mit verschiedenen Kontrollproteinen *in vitro* ineffizienter zu verlaufen als *in vivo*. So fanden VAN STEEG et al. (1986), daß 5 % des in *S. cerevisiae* exprimierten Fusionsproteins,

bestehend aus Invertase mit N-terminaler Sequenz des mitochondrialen Matrixenzyms Mangan Superoxid Dismutase, in die Mitochondrien importiert wurde. Einen Import in isolierte Mitochondrien konnten sie nicht nachweisen. DHFR mit derselben Signalsequenz wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* importiert. Dies zeigt, wie im Fall der verschiedenen BO-Hybridproteine, daß die Importeffizienz nicht nur von der Signalsequenz, sondern auch vom zu transportierenden Protein abhängt. Proteine wie die DHFR, die keine sehr stabile Faltung zeigen, sind für die mitochondriale Importmaschinerie leicht zugänglich. Proteine, die wie die Invertase teilweise stabil gefaltete Domänen enthalten, oder, die wie BR aufgrund starker Hydrophobizität zur Aggregation neigen, können nur schwer durch die mitochondriale Importmaschinerie transportiert werden.

Die Aggregation von coxIV-BOP im Translationsansatz mit Retikulozytenlysat kann ausgeschlossen werden. Nach Zentrifugation von Translationsansätzen war fast das gesamte coxIV-BOP in der löslichen Fraktion zu finden (3.4). Es konnte aber nicht ausgeschlossen werden, daß kleinere Aggregate aus nur wenigen coxIV-BOP Molekülen vorlagen, oder daß das Protein im Importansatz aggregiert.

Denaturierung mit Harnstoff führt zur zumindest teilweisen Entfaltung von Proteinen. Dadurch kann der Import in isolierte Mitochondrien in einigen Fällen verbessert werden. Harnstoff-Vorbehandlung zeigte keinen Einfluß auf die Importierbarkeit von BO. Möglicherweise wurde BO nicht in ausreichendem Maß von Harnstoff denaturiert. Für das Fusionsprotein GST-BOS und BO aus Purpurmbranen konnte gezeigt werden, daß eine Solubilisierung mit Harnstoff nicht möglich ist (3.4.2).

Zur Verhinderung von zu früher und/oder falscher Faltung sind beim mitochondrialen Import cytosolische Faktoren wie zum Beispiel Chaperone beteiligt (HARTL, NEUPERT, 1990; MURAKAMI, MORI, 1990; MURAKAMI et al., 1988; HACHIYA et al., 1994). Ein Hinweis darauf ist der Befund, daß Vorläuferproteine, die in Weizenkeimextrakt synthetisiert wurden, mit geringerer Effizienz in Mitochondrien von *S. cerevisiae* importiert wurden als Vorläuferproteine, die in Retikulozytenlysat synthetisiert wurden (3.3.3). Diese Beobachtung wurde auch von MURAKAMI et al. (1988) gemacht: Der posttranslationale Import von Delta-Pyrrolin-5-carboxylat Dehydrogenase, welche in Weizenkeimextrakt synthetisiert wurde, war vernachlässigbar gering. Erst der Zusatz eines Hefeextrakts führte zu signifikantem Import. PFANNER und NEUPERT (1987) zeigten, daß für den effizienten Import von AAC Komponenten des Retikulozytenlysats nötig sind.

Es könnte für den Import des sehr hydrophoben BO die Menge an vorhandenen Cofaktoren im Retikulozytenlysat nicht ausreichen. Daher wurde der *in vitro* Import mit weiterem Zusatz von Retikulozytenlysat und Zusatz des Chaperons DnaK (*E.coli*) durchgeführt. Der Import von F₁β kann durch Steigerung der Menge des Retikulozytenlysats von 10 % auf 30 % des Importansatzes um ein Vielfaches gesteigert werden (PFANNER et al., 1987). DnaK förderte den Import des Kontrollproteins F₁β jedoch nicht. Import von BO in isolierte Mitochondrien konnte weder durch Erhöhung der Menge an Retikulozytenlysat im Importansatz noch durch Zusatz von DnaK nachgewiesen werden. Dies zeigt, daß vermutlich die Menge an Hsp70-Chaperon und anderen Faktoren aus dem Retikulozytenlysat hier für den Import nicht limitierend ist.

Möglicherweise wurde BO in die Mitochondrien transportiert, konnte aber nicht in die innere Mitochondrienmembran eingebaut werden. Eine Ursache dafür könnte die Verwendung von Mitochondrien aus Wildtyp-Hefestämmen, die bei für die Atmung optimalen Bedingungen kultiviert

wurden, sein. Unter diesen Voraussetzungen sollte die innere Mitochondrienmembran die maximale Menge der Komponenten der Atmungskette beinhalten. TZAGLOFF (1982) gibt für Rinderherz-Mitochondrien an, daß etwa 15-20 % der Masse dieser Mitochondrien aus Cytochrom c-Oxidase besteht. So ist es vorstellbar, daß die Proteindichte in der inneren Mitochondrienmembran für einen effizienten Einbau von BO zu hoch ist. Wird aber BO nicht eingebaut, wird es vermutlich in der mitochondrialen Matrix von Proteasen abgebaut (persönliche Kommunikation mit T. D. Fox).

Vorstellbar ist auch, daß BO importiert wird, aber in der Matrix keine Wechselwirkung mit mitochondrialem Chaperonin eingehen kann. Mitochondriales Hsp60 soll bei der Faltung mitochondrialer Proteine eine Rolle spielen (1.1.2). In Versuchen zur Interaktion gereinigter Purpurmembra n und GST-BOS mit dem käuflichen Chaperonin-System GroEL/GroES konnte gezeigt werden, daß mehr denaturiertes BO nach Verdünnen in Chaperonin-haltigem Puffer in Lösung blieb als nach Verdünnen in Puffer ohne Chaperonin (3.4). Zusatz von GroEL, GroES und ATP im Verdünnungspuffer führt zu gesteigerter Löslichkeit von BO. Daraus kann geschlossen werden, daß BO immer wieder von GroEL gebunden wird, da es ohne Lipidzusatz keine native Faltung einnehmen kann, oder daß es entgegen dem generellen Mechanismus GroEL nicht verläßt. BO hätte nach Zusatz von GroEL, GroES und ATP auch unlöslich und somit präzipitierbar werden können, wenn es den GroEL-Käfig verlassen hätte und nicht erneut gebunden worden wäre. Mit dem gewählten einfachen Versuchsansatz konnte nicht nachgewiesen werden, ob BO im Inneren des GroEL-Käfigs (spezifische Wechselwirkung) oder außen am GroEL-Komplex (unspezifische Wechselwirkung) assoziiert war. So kann nur vermutet werden, daß BO in der mitochondrialen Matrix mit den vorhandenen Chaperoninen in Wechselwirkung treten kann.

Wenn die Wechselwirkung zwischen BO und GroEL spezifisch wäre, wäre dies ein erster Nachweis einer Wechselwirkung eines cytoplasmatischen universellen Chaperon-Systems mit einem Membranprotein. HIGH und LAIRD (1996) diskutieren, daß eine Reihe von Chaperonen des Endoplasmatischen Retikulums mit lumenalen Teilen von Membranproteinen interagieren. Sie zweifeln aber das Vorhandensein einer Wechselwirkung zwischen cytoplasmatischen Chaperonen und Membranproteinen an. Im Gegensatz zu ihrer Vorstellung, daß keine für Membranproteine spezifischen Chaperone vorstellbar sind, mehren sich inzwischen Hinweise auf sehr spezifische Chaperone für die Faltung und Assemblierung einzelner Membranproteine und Membranprotein-komplexe (persönliche Kommunikation mit H. Plücker, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

Der Einbau von BO in Membranen kann in zwei Schritte unterteilt werden (CLADERA et al., 1996; BOOTH et al., 1996). Im ersten Schritt werden die helikalen Bereiche von BO in der Membran gebildet. Im zweiten Schritt kommt es unter Einbau von all-*trans*-Retinal zur Interaktion der Helices zur funktionalen BR-Struktur. Retinal ist laut CLADERA et al. und BOOTH et al. nicht an der Bildung der Sekundärstruktur von BR sondern an der Bildung der nativen Tertiärstruktur beteiligt. Da möglicherweise beim *in vitro* Import in Mitochondrien der Einfluß des Retinals zum Einbau in die innere Mitochondrienmembran fehlt, wurden auch Ansätze mit Zugabe von all-*trans*-Retinal durchgeführt. Retinal zeigte jedoch keinen nachweisbaren Einfluß auf den Import von coxIV-BOP in die innere Mitochondrienmembran (3.3).

4.2 Expression von Bacterioopsin in Mitochondrien

Der Import des sehr hydrophoben Membranproteins BO durch die mitochondrialen Membranen ist offensichtlich problematisch (4.1). Da sehr hydrophobe mitochondriale Proteine in *S. cerevisiae* in der mitochondrialen Matrix exprimiert werden (MC MULLIN, FOX, 1993), sollte auch BO in der mitochondrialen Matrix exprimiert werden. Von dort wäre zur Ziellokalisation in der inneren Mitochondrienmembran kein Transport über andere Membranen nötig.

Um BO in Mitochondrien von *S. cerevisiae* exprimieren zu können, wurde ein neues BO-Gen, mtbos, mit dem mitochondrialen genetischen Code dieser Hefe hergestellt (3.5.1, 7.1). Die Häufigkeit, mit der ein Codon in den mitochondrialen Genen vorkommt, fand bei der Herstellung des Gens keine Berücksichtigung. Um zu verhindern, daß es bei falscher Lokalisation des mtbos-Gens in den Kern von *S. cerevisiae* zur Translation kommt, wurden in der Mitte des Gens zwei TGA-Codons eingeführt. TGA steht im mitochondrialen Code für Tryptophan und im universellen Code für Kettenabbruch. Das fertige Gen mtbos codiert in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* für die reife BO-Form.

Das mtbos-Gen wurde erfolgreich in Mitochondrien von *S. cerevisiae* durch „Biolistische Transformation“ eingeführt. Es konnte durch Testpaarungen, PCR und Southernblotanalyse gezeigt werden, daß es an die Stelle des oxi-2-Gens für die Untereinheit III der Cytochrom c-Oxidase (COX3) in ein vollständiges mitochondriales Genom inseriert ist (3.5.4 und 3.5.3).

Der nächste Schritt war der Nachweis, daß mtbos in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* transkribiert wird. Durch Northernblotanalyse (3.5.5) konnte eine mtbos-spezifische mRNA von etwa 3.000 Nukleotiden Länge nachgewiesen werden. Das mtbos-Gen hat aber nur eine Länge von etwa 760 Nukleotiden. Die Diskrepanz zwischen der RNA-Länge und der Länge von mtbos läßt sich durch die mitochondrialen Transkriptionseignisse erklären. Die mitochondriale Transkription verläuft in zwölf Transkriptionseinheiten (DIECKMANN, STAPLES, 1994). Das erste Transkriptionsprodukt der Transkriptionseinheit um das oxi-2-Gen enthält neben der codierenden Sequenz des oxi-2-Gens (809 bp) die Sequenzen für die tRNA-Moleküle für Phenylalanin und Valin am 5'-Ende und ein offenes Leseraster am 3'-Ende (Abb. 30).

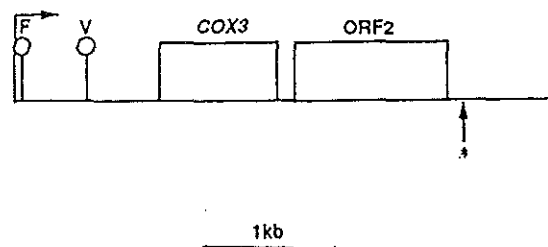


Abb. 30: Die Transkriptionseinheit mit dem oxi-2-Gen
F: tRNA für Phenylalanin, V: tRNA für Valin, COX3: codierende Sequenz des oxi-2-Gens, ORF2: offenes Leseraster. Der Pfeil mit Stern gibt eine Prozessierungsstelle am 3'-Ende an (DIECKMANN, STAPLES, 1994).

Dieses Transkriptionsprodukt wird am 3'-Ende an der mit Pfeil und Stern markierten Stelle prozessiert (Abb. 30). Das 5'-Ende der fertigen COX3-mRNA entsteht durch eine spezifische Endonuclease, die zwischen der tRNA für Valin und der COX3-Sequenz bei -614 oder -489 schneidet. Die fertige COX3-mRNA hat eine Länge von etwa 3.000 Nukleotiden (DIECKMANN, STAPLES, 1994). Ersetzt man *oxi-2* (codierend für COX3) durch *mtbos* ergibt sich eine Differenz in der RNA-Länge von etwa 150 Nukleotiden, somit hat die prozessierte *mtbos*-mRNA eine Länge von etwa 2.850 Nukleotiden. Der Vergleich dieser Länge mit der aus der Northernblotanalyse bestimmten Länge von etwa 3.000 Nukleotiden (3.5.5) ergibt eine gute Übereinstimmung.

Damit sind alle Voraussetzungen für eine erfolgreiche Translation gegeben. Die Zellen zur Isolierung der Mitochondrien zum Nachweis der BO-Genexpression wurden unter optimalen Bedingungen für die *oxi-2*-Genexpression (starke Durchlüftung und Galaktose als Kohlenstoffquelle) angezogen (MARYKWAS, FOX, 1989). Bei der Regulation der Translation der COX3 mRNA scheint PET494 als limitierender Faktor zu fungieren. Die Expression von PET494 wird über die Sauerstoffzufuhr und die Art der Kohlenstoffquelle reguliert. Die Regulation über Sauerstoff erfolgt auf Translationsebene. Unter anaeroben Wachstumsbedingungen, wird nur ein Fünftel der PET494-Menge exprimiert, wie sie unter aeroben Wachstumsbedingungen zu finden ist. Die Regulation über die Kohlenstoffquelle geschieht anscheinend sowohl auf Transkriptions- als auch auf Translationsebene. Dabei wirkt Glukose reprimierend, auf Glukose gewachsene Zellen enthalten vier- bis sechsmal weniger PET494 als Zellen von Medien mit Glycerin oder Ethanol. Ethanol oder Galaktose können zur Verdopplung der Expression von PET494 führen.

Trotz der optimalen Bedingungen konnte in der Westernblotanalyse kein BO nachgewiesen werden (3.5.6), obwohl 500 µg Protein isolierter Mitochondrien eingesetzt wurde. 15-20 % der Masse von Rinderherz-Mitochondrien besteht aus Cytochrom c-Oxidase (TZAGOLOFF, 1982). Selbst wenn man nur ein Zehntel der Masse der Cytochrom c-Oxidase für COX3 ansetzt, und wenn man eine Verunreinigung der für die Westernblotanalyse eingesetzten Mitochondrien von 95 % zugrunde legt, wären 2,5 µg BO in 500 µg Protein isolierter Mitochondrien zu erwarten. Die Nachweisgrenze in der Westernblotanalyse lag bei 10 ng BO. Somit muß von einer äußerst geringen oder sogar keiner Translation von BO in Mitochondrien von *S. cerevisiae* ausgegangen werden.

Bei einem analog angelegten Experiment zur Expression eines löslichen Proteins (*Arg8^m*) in Mitochondrien von *S. cerevisiae* konnte das Protein in 8 µg einer Gesamtzellextraktion nachgewiesen werden, also wesentlich weniger mitochondrialem Protein als zum Nachweis von BO eingesetzt wurde (STEELE et al., 1996). Auch die Expression des „Green Fluorescent Protein“ (GFP), einem löslichen Protein aus *Aequorea victoria*, gelang in diesem Genlocus (persönliche Kommunikation mit T. D. Fox, Cornell University, Ithaca, U.S.A.). Das *Arg8^m*-Gen und das GFP-Gen waren optimal an den genetischen Code der Mitochondrien von *S. cerevisiae* angepaßt. Dagegen enthielt *mtbos* zahlreiche im mitochondrialen Code selten genutzte Triplets. Dies könnte bei der Translation der *mtbos*-mRNA zu frühzeitigem Kettenabbruch führen. Da zum BO-Nachweis ein gegen den C-Terminus von BO gerichteter Antikörper genutzt wurde, können die Produkte dieser Kettenabbrüche nicht detektiert werden.

Eine weitere Erklärung für den Mangel an BO in den Mitochondrien könnte ein schneller Abbau des neu synthetisierten BO sein, wenn der Import in die innere Mitochondrienmembran nicht stattfinden kann. Das *mtbos*-Gen enthält nicht die eigene Präsequenz. Die Präsequenz von BO

könnte als Exportsignal für den Transport des Proteins zur Membran und den Einbau in dieselbe dienen. Allerdings wurden keine Sequenzhomologien zu anderen prokaryotischen oder eukaryotischen Signalsequenzen gefunden (XU et al., 1995). XU et al. finden, daß die Präsequenz von BO in *H. salinarum* essentiell für die mRNA-Stabilität und Ribosomenbindung an die BO-mRNA in *H. salinarum* ist. Einführen einer neuen Ribosomenbindestelle im BO-Gen führt zwar zur Stabilisierung der BO-mRNA, jedoch ist diese nicht so effizient wie bei BO mit eigener Präsequenz. Das ohne Präsequenz synthetisierte BO wird aber korrekt in die Plasmamembran von *H. salinarum* eingebaut. Zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase von *S. pombe* Zellen werden bei Expression von BOM geringere BO-Mengen detektiert als im Vergleichsexperiment mit BOP exprimierenden Zellen (HILDEBRANDT et al., 1991). Dieser Unterschied in der BO Expression tritt in der mittleren exponentiellen Wachstumsphase nicht mehr auf. Die BOM exprimierenden Zellen zeigen bei der *in vivo* Regeneration mit all-*trans*-Retinal eine schwächere Färbung als BOP exprimierende Zellen. BAUER et al. (1992) finden keinen Unterschied beim Einbau von *in vitro* hergestelltem BOP oder BOM in Hundepankreas-Mikrosomen. Die von XU et al., HILDEBRANDT et al. und BAUER et al. aufgeführten Daten deuten darauf hin, daß die BO-Präsequenz sowohl im heterologen System als auch im homologen System keinen entscheidenden Einfluß auf den Einbau von BO in Membranen hat.

Einen weiteren Hinweis, daß die BO eigene Präsequenz beim Einbau von BO in die innere Mitochondrienmembran keine Rolle spielt, liefern neuere Überlegungen zum Einbau der Untereinheit III der Cytochrom c-Oxidase (COX3), an deren Stelle das BO-Gen exprimiert wird, in die innere Mitochondrienmembran von *S. cerevisiae*. Es wurde gezeigt, daß der Translationskomplex aus nukleär kodierten Translationsfaktoren, einem mitochondrialen Ribosom und der COX3-mRNA an der inneren Mitochondrienmembran assoziiert ist (BROWN et al., 1994, Abb. 31). Daher wird vermutet, daß diese Assoziation mit der inneren Mitochondrienmembran in kausalem Zusammenhang zum korrekten Einbau von COX3 in die Membran steht.

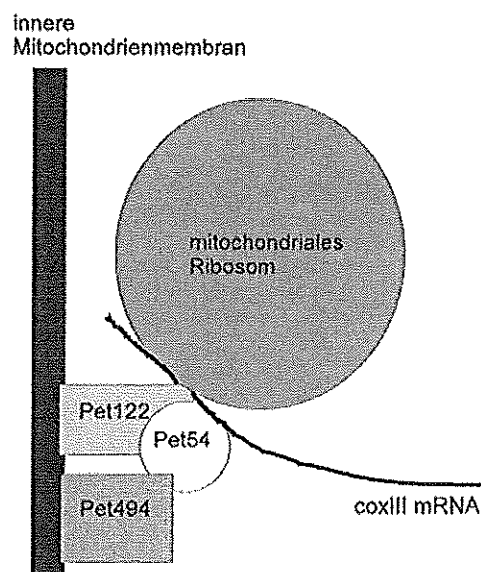


Abb. 31: Hypothetisches Modell zum Translationskomplex mit der coxIII mRNA (BROWN et al., 1994). Die Zahlen markieren die drei an der Translation der coxIII-mRNA beteiligten nukleär codierten Pet-Proteine.

Möglicherweise handelt es sich beim Einbau des neu synthetisierten COX3 um ein so spezifisches System, daß das fremde Membranprotein BO von dieser Maschinerie nicht akzeptiert wird und, wenn es in der Matrix vorliegt, von der mitochondrialen Proteinabbaumaschinerie erfaßt wird. Lösliche Proteine wie Arg8^m und GFP können translatiert werden und sind in der Matrix stabil, sie konnten im COX3-Genlocus erfolgreich translatiert werden.

Eine Alternative zur Expression von BO im mitochondrialen COX3-Genlocus wäre die Expression im mitochondrialen Genlocus der Untereinheit II der Cytochrom c-Oxidase (COX2). COX2 wird als Vorläufer mit einer N-terminalen Signalsequenz zum Export in die innere Mitochondrienmembran synthetisiert. Deletion dieser Signalsequenz führt zu fehlendem Import in die innere Mitochondrienmembran. COX2 bleibt in der Matrix und wird schnell abgebaut (TORELLO et al., 1997). Ein weiterer Punkt, der für den Versuch der Expression von BO im COX2-Genlocus spricht, ist die Lokalisation der N-Termini von COX2 und COX3. Der N-Terminus von COX3 ist in der Matrix lokalisiert, wohingegen der N-Terminus von COX2 im Intermembranraum lokalisiert ist. BO sollte so in die innere Mitochondrienmembran eingebaut werden, daß der N-Terminus im Intermembranraum lokalisiert ist. Denn in diesem Fall würde funktionales BR einen für die mitochondriale ATPase nutzbaren Protonengradienten aufbauen können.

Diese Ausführungen zeigen neue Ansatzpunkte zur Expression von BO in Mitochondrien von *S. cerevisiae* auf. Das mtbos-Gen kann dahingehend optimiert werden, daß am 5'-Ende die Sequenz für die BO-Präsequenz eingeführt wird. Wenn auch die Rolle der BO-eigenen Präsequenz bei der Integration in Membranen in Frage steht, so könnte sie doch für eine spätere Regeneration von BO zu funktionalem BR eine Rolle spielen. Der Austausch von im mitochondrialen genetischen Code selten genutzten Tripletts gegen häufig verwendete Tripletts wäre ein weiterer Schritt zur Optimierung von mtbos. Des Weiteren kann versucht werden, mtbos im COX2-Genlocus zu exprimieren.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Bacterioopsin (BO) wurde als Fusion mit der mitochondrialen Signalsequenz der Untereinheit IV der Cytochrom c-Oxidase (coxIV) in *S. pombe* exprimiert. Nur ein Teil des exprimierten Proteins wurde in die Mitochondrien importiert. Der größte Teil wurde in die Cytoplasmamembran eingebaut (HOFFMANN et al., 1994).

In dieser Arbeit wurde in einem analog angelegten Ansatz BO mit der mitochondrialen Signalsequenz der Untereinheit 9 der ATPase aus *Neurospora crassa* (SU9) exprimiert. Diese als für mitochondrialen Import besonders effizient geltende Signalsequenz führte nicht zur Steigerung des BO-Imports. Ebenso erfolglos war der Versuch, den Import von BO zu steigern, indem das Protein in zwei Teilstücken (Helices A und B und Helices C-G), die N-terminal mit coxIV verknüpft wurden, in *S. pombe* exprimiert wurde.

In Experimenten zum Import in isolierte Mitochondrien von *S. pombe* und *S. cerevisiae* konnte kein Import von coxIV-BO, SU9BO, coxIVAB und coxIVCG nachgewiesen werden. Verschiedene Kontrollproteine wurden dagegen effizient in die Mitochondrien beider Hefen importiert. Auch nach Zusatz von DnaK oder Retikulozytenlysat –Komponenten, deren positiver Einfluß auf die Importierbarkeit von Proteinen in Mitochondrien bereits gezeigt wurde– konnte kein Import von coxIVBO nachgewiesen werden. Durch Vorbehandlung mit Harnstoff kann die Importierbarkeit von Vorläuferproteinen gesteigert werden. So behandeltes coxIVBO konnte nicht importiert werden. Da all-trans-Retinal einen Einfluß auf den Einbau von BO in Membranen haben könnte, wurde coxIVBO auch in Anwesenheit von Retinal im Importansatz eingesetzt. Es erfolgte kein Import von coxIVBO.

Als möglicher Grund für die schlechte Importierbarkeit von BO in Hefemitochondrien wird die starke Hydrophobizität des Proteins oder Fehlen einer für den Import wichtigen Wechselwirkung von BO mit Komponenten, die die Aggregation von Proteinen verhindern, diskutiert.

In Versuchen mit käuflichem Chaperonin GroEL, dem Co-Chaperonin GroES, ATP und gereinigter Purpormembran oder durch Harnstoff vorgereinigtem Fusionsprotein GST-BOS konnte eine Wechselwirkung zwischen BO und GroEL nachgewiesen werden. Allerdings kann keine Aussage über die Spezifität dieser Wechselwirkung getroffen werden.

Zur Expression von BO im Zielkompartiment, den Mitochondrien von *S. cerevisiae*, wurde ein dem genetischen Code der Mitochondrien angepaßtes Gen für das reife BO hergestellt (mtbos). Dieses Gen wurde über Biolistische Transformation in die Mitochondrien transformiert und über homologe Rekombination in ein vollständiges mitochondriales Genom an Stelle des Gens für die Untereinheit III der Cytochrom c-Oxidase integriert. Die Transkription dieses Gens konnte nachgewiesen werden. Es konnte aber kein BO in isolierten Mitochondrien nachgewiesen werden. Die Expression eines fremden Membranproteins in Mitochondrien ist bislang nicht beschrieben.

Als mögliche Gründe dafür, daß kein oder sehr wenig BO in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* exprimiert wurde, wird das Fehlen der BO-eigenen Präsequenz und die hohe Anzahl von im mitochondrialen genetischen Code selten genutzter Tripletts in mtbos diskutiert. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die Maschinerie zum Einbau mitochondrialer Membranproteine BO nicht erkennt, so daß das Protein abgebaut wird.

Diese Arbeit hat gezeigt, daß der *in vivo* und *in vitro* Import von wasserlöslichen und schwach hydrophoben Proteinen in Hefemitochondrien schon fast Routine geworden ist. Demgegenüber ist der Import und Einbau sehr hydrophober Membranproteine weiterhin unverstanden und eine Herausforderung für zukünftige Experimente zum Verständnis der mitochondrialen Importmechanismen.

Es ist jedoch möglich, daß der für Mitochondrien existierende Importmechanismus nicht für sehr hydrophobe Membranproteine geeignet ist. Solche Proteine werden in den Mitochondrien selbst synthetisiert und in die Membranen eingebaut. Die dabei wirksamen Mechanismen sind jedoch auch noch nicht verstanden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

- BAUER, M.F., NEUPERT, W.: Protein transport across the outer and inner membranes of mitochondria. in: „Handbook of biological physics“, Vol. 2, 791-822 (1996)
- BAUER, U.: Biogenese von Bakteriorhodopsin: *In vitro* Translationsexperimente zur Untersuchung des Einbaus in biologische Membranen. Inaugural-Dissertation des Fachbereichs Biologie der Freien Universität Berlin (1990)
- BAUER, U., HILDEBRANDT, V., DENCHER, N.A., WREDE, P.: *In vitro* synthesis of bacterioopsin: Integration into microsomal membranes. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **187**, 1480-1485 (1992)
- BEACH, D., NURSE, P.: High-frequency transformation of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature* **290**, 140-142 (1981)
- BEREITER-HAHN, J.: Behaviour of mitochondria in the living cell. *Int. Rev. Cytol.* **122**, 1-62 (1990)
- BOISVERT, D.C., WANG, J., OTWINOWSKI, Z., HORWICH, A., SIGLER, P.B.: The 2.4 Å crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL complexed with ATP_γS. *Nature struct. biol.* **3**, 170-177 (1996)
- BRADFORD, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254 (1976)
- BRAIG, K., OTWINOWSKI, Z., HEGDE, R., BOISVERT, D.C., JOACHIMIAK, A., HORWICH, A.L., SIGLER, P.B.: The crystal structure of the bacterial chaperonin GroEL at 2.8 Å. *Nature* **371**, 578-586 (1994)
- BROWN, N.G., COSTANZO, M.C., FOX, T.D.: Interactions among three proteins that specifically activate translation of the mitochondrial COX3 mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1045-1053 (1994)
- CLAROS, M.G., PEREA, J., JACQ, C.: Limitations to the *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria: the case of a cytoplasmatically made version of apocytochrome *b*. 17th Int.Conf. on yeast genetics and molecular biology, S302 (1995)
- COSTANZO, M.C., FOX, T.D.: Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Genet.* **24**, 91-113 (1990)
- DAS SARMA S., RAJ BANDHARY, U.L., KHORANA, H.G.: Bacterioopsin mRNA in wildtype or bacterio-opsin-deficient *Halobacterium halobium* strains. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **81**, 125-129 (1984)
- DAUM, G., BÖHNI, P.C., SCHATZ, G.: Import of proteins into mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13028-13033 (1982)
- DIECKMANN, C.L., STAPLES, R.R.: Regulation of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. Rev. Cytol.* **152**, 145-181 (1994)
- DOUGLAS, M.G., GELLER, B.L., EMR, S.D.: Intracellular targeting and import of an F₁-ATPase β -subunit- β -galactosidase hybrid protein into yeast mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 3983-3987 (1984)
- EILERS, M., HWANG, S., SCHATZ, G.: Unfolding and refolding of a purified precursor protein during import into isolated mitochondria. *EMBO J.* **7**, 1139-1145 (1988)

- ELLIS, R.J., HARTL, F.U.: Protein folding in the cell: competing models of chaperonin function. *FASEB J.* **10**, 20-26 (1996)
- FOX, T.D.: Natural variation in the genetic code. *Ann. Rev. Genet.* **21**, 67-91 (1987)
- FOX, T.D., SANFORD, J.C., MC MULLIN, T.W.: Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7288-7292 (1988)
- FOX, T.D., FOLLEY, L.S., MULERO, J.J., MC MULLIN, T.W., THORSNESS, P.E., HEDIN, L.O., COSTANZO, M.C.: Analysis and manipulation of yeast mitochondrial genes. *Meth. Enzymol.* **194**, 149-165 (1991)
- FRYDMAN, J., HARTL, F.U.: Principles of chaperone-assisted protein folding: differences between *in vitro* and *in vivo* mechanisms. *Science* **272**, 1497-1502 (1996)
- GAMBILL, B.D., VOOS, W., KANG, P.J., MIAO, B., LANGER, T., CRAIG, E.A., PFANNER, N.: A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J. Cell Biol.* **123**, 109-117 (1993)
- GLICK, B., SCHATZ, G.: Import of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Genet.* **25**, 21-44 (1991)
- GLICK, B., BEASLEY, E.M., SCHATZ, G.: Protein sorting in mitochondria. *TIBS* **17**, 453-459 (1992)
- GROPP, R., GROPP, F., BETLACH, M.C.: Association of the halobacterial 7S RNA to the polysomes of the membrane protein bacteriorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 1204-1208 (1992)
- HACHIYA, N., KOMIYA, T., ALAM, R., IWAHASI, J., SAKAGUCHI, M., OMURA, T., MIHARA, N.: MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO J.* **13**, 5146-5154 (1994)
- HANAHAN, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580 (1985)
- HANAHAN, D.: Techniques for transformation of *E. coli*. In „DNA cloning, a practical approach“, Vol. 1, Hrsg.: Rickwood, D., Hames, B. D., IRL Press, 109-135 (1985)
- HARTL, F.U., NEUPERT, W.: Protein sorting to mitochondria: Evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* **247**, 930-247 (1990)
- HARTL, F.U.: Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **381**, 571-580 (1996)
- HIGH, S., LAIRD, V.: Membrane protein biosynthesis - all sewn up? *Trends in Cell Biol.* **7**, 206-210 (1997)
- HILDEBRANDT, V., RAMAZANI-RAD, M., SWIDA, U., WREDE, P., GRZESIEK, S., PRIMKE, M., BÜLDT, G.: Genetic transfer of the pigment bacteriorhodopsin into the eukaryote *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Letters* **243**, 137-140 (1989)
- HILDEBRANDT, V., POLAKOWSKI, F., BÜLDT, G.: Purple fission yeast: Overexpression and processing of the pigment bacteriorhodopsin in *Schizosaccharomyces pombe*. *Photochem. and Photobiol.* **54**, 1009-1016 (1991)
- HLODAN, R., TEMPST, P., HARTL, F.U.: Binding of defined regions of a polypeptide to GroEL and its implications for chaperonin-mediated protein folding. *Nature Struct. Biol.* **2**, 587-595 (1995)
- HÖNLINGER, A., KEIL, P., NELSON, R.J., CRAIG, E.A., PFANNER, N.: Posttranslational mitochondrial protein import in a homologous yeast *in vitro* system. *Biol. Chem. Hoppe-Seyler* **376**, 515-519 (1995)

- HOFFMANN, A., HILDEBRANDT, V., HEBERLE, J., BÜLDT, G.: Photoactive mitochondria: *In vivo* transfer of a light-driven proton pump into the inner mitochondrial membrane of *Schizosaccharomyces pombe*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9367-9371 (1994)
- HURT, E.C., PESOLD-HURT, B., SCHATZ, G.: The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. FEBS L. 178, 306-310 (1984)
- HURT, E.C., VAN LOON, A.P.G.M.: How proteins find mitochondria and intramitochondrial compartments. TIBS 11, 204-207 (1986)
- KANTER-SMOLER, K., DAHLKVIST, A., SUMERHAGEN, P.: Improved method for rapid transformation of intact *Schizosaccharomyces pombe* cells. Bio Tech. 16, 798-800 (1994)
- KELLEMS, R.E., ALLISON, V.F., BUTOW, R.A.: Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. J. Cell Biol. 65, 1-14 (1975)
- KHORANA, H.G.: Bacteriorhodopsin, a membrane protein that uses light to translocate protons. J. Biol. Chem. 263, 7439-7442 (1988)
- KOHLI, J.: Genetic nomenclature and gene list of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. Curr. Genet. 11, 575-589 (1987)
- KORENSTEIN, R., HESS, B., KUSCHMITZ, D.: Branching reactions in the photocycle of bacteriorhodopsin. FEBS Lett. 93, 266-270 (1978)
- KÜBRICH, M., DIETMEIER, K., PFANNER, N.: Genetic and biochemical dissection of the mitochondrial protein-import machinery. Curr. Genet. 27, 393-403 (1995)
- LAEMMLI, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature 227, 680-685 (1970)
- LANDT, O., GRUNERT, H.P., HAHN, U.: A general method for rapid site-directed mutagenesis using the polymerase chain reaction. Gene 96, 125-128 (1990)
- LANG-HINRICHS, C., QUECK, I., BÜLDT, G., STAHL, U., HILDEBRANDT, V.: The archaeobacterial membrane protein bacterio-opsin is expressed and N-terminally processed in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Gen. Genet. 244, 183-188 (1994)
- LIAO, M.J., HUANG, K.S., KHORANA, H.G.: Regeneration of native bacteriorhodopsin structure from fragments. J. Biol. Chem. 259, 4200-4204 (1984)
- LILL, R., NEUPERT, W.: Biogenese von Mitochondrien: Import, Sortierung und Faltung von Proteinen. Biospektrum 3/95, 28-32 (1995)
- LILL, R., NEUPERT, W.: Mechanisms of protein import across the mitochondrial outer membrane. Trends in Cell Biol. 6, 56-61 (1996)
- LISOWSKI, T., MICHAELIS, G.: Das Mitochondrien-Genom der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*. Forum Mikrobiol. 9, 121-128 (1986)
- LORIMER, G.H.: A quantitative assessment of the role of the chaperonin proteins in protein folding *in vivo*. FASEB J. 10, 5-9 (1996)
- LORIMER, G.H., TODD, M.J.: GroE structures galore. Nature struct. biol. 3, 116-121 (1996)
- MANNIATIS, T., FRITSCH, E.F., SAMBROOK, J.: Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y. (1982)

- MARYKWA, D.L., FOX, T.D.: Control of the *Saccharomyces cerevisiae* regulatory gene PET494: transcriptional repression by glucose and translational induction by oxygen. *Mol. Cell. Biol.* 9, 484-491 (1989)
- MAUNDRELL, K.: Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123, 127-130 (1993)
- MAYHEW, M., HARTL, F.U.: Lord of the rings: GroES structure. *Science* 271, 161-162 (1996)
- MAYHEW, M., DA SILVA, A.C.R., MARTIN, J., ERDJUMENT-BROMAGE, H., TEMPST, P., HARTL, F.-U.: Protein folding in the central cavity of the GroEL-GroES chaperonin complex. *Nature* 379, 420-426 (1996)
- MC COY, J.M., KHORANA, H.G.: Introduction and characterization of amber mutations in the bacteriorhodopsin gene. *J. Biol. Chem.* 258, 8456-8461 (1983)
- MC MULLIN, T.W., FOX, T.D.: COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268, 11737-11741 (1993)
- MILLAR, D.G., SHORE, G.C.: Assembly of mitochondrial membrane proteins. in: „Membrane protein assembly“, Hrgs.: von Heijne, G., S. 151-171 (1997)
- MURAKAMI, K., PAIN, D., BLOBEL, G.: 70-kD heat shock-related protein is one of at least two distinct cytosolic factors stimulating protein import into mitochondria. *J. Cell Biol.* 107, 2051-2057 (1988)
- MURAKAMI, K., MORI, M.: Purified presequence binding factor (PBF) forms an import-competent complex with a purified mitochondrial precursor protein. *EMBO J.* 9, 3201-3208 (1990)
- NAGEL, G., MÖCKEL, B., BÜLDT, G., BAMBERG, E.: Functional expression of bacteriorhodopsin in oocytes allows direct measurement of voltage dependence of light induced H⁺ pumping. *FEBS L.* 377, 263-266 (1995)
- NICHOLSON, W.D., KÖHLER, H., NEUPERT, W.: Import of cytochrome c into mitochondria: cytochrome c heme lyase. *Eur. J. Biochem.* 164, 147-157 (1987)
- OESTERHELT, D.: Photosynthetic systems in Prokaryotes: The Retinal proteins of Halobacteria and the reaction centre of purple bacteria. *Biochem. Int.* 18, 673-694 (1989)
- OSTERWALDER, A.: *Schizosaccharomyces liquefaciens* n. sp., eine gegen freie schwefelige Säure widerstandsfähige Gärhefe. *Mitt. Geb. Lebensmittelunters. Hyg.* 15, 5-28 (1924)
- PALMER, B.R., MARINAS, M.G.: *Gene* 143, 1-12 (1994)
- PEYBAY-PEYROULA, E., RUMMEL, G., ROSENBUSCH, J.P., LANDAU, E.M.: X-ray structure of bacteriorhodopsin at 2.5 Angstroms from microcrystals grown in lipidic cubic phases. *Science* 277, 1676-1681 (1997)
- PFALLER, R., PFANNER, N., NEUPERT, W.: Mitochondrial protein import. *J. Biol. Chem.* 264, 34-39 (1989)
- PFANNER, N., NEUPERT, W.: Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 262, 7528-7536 (1987)
- PFANNER, N., TROPSCHUG, M., NEUPERT, W.: Mitochondrial protein import: Nucleosid triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell* 49, 815-823 (1987)

- PFANNER, N., RASSOW, J., GUIARD, B., SÖLLNER, T., HARTL, F.-U., NEUPERT, W.: Energy requirements for unfolding and membrane translocation of precursor proteins during import into mitochondria. *J. Biol. Chem.* 265, 16324-16329 (1990)
- PFANNER, N., CRAIG, E.A., MEIJER, M.: The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *TIBS* 19, 368-372 (1994)
- PFANNER, N., DOUGLAS, M.G., ENDO, T., HOOGENRAAD, N.J., JENSE, R.E., MEIJER, M., NEUPERT, W., SCHATZ, G., SCHMITZ, U.K., SHORE, G.C.: Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *TIBS* 21, 51-52 (1996)
- POMPEJUS, M., FRIEDRICH, K., TEUFEL, M., FRITZ, H.-J.: High yield production of bacteriorhodopsin via expression of a synthetic gene in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 211, 27-35 (1993)
- RASSOW, J., HARMEY, M.A., MÜLLER, H.A., NEUPERT, W., TROPSCHUG, M.: Nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for the mitochondrial precursor protein of the β -subunit of F₁-ATPase from *Neurospora crassa*. *Nuc. Acids. Res.* 18, 4922 (1990)
- ROISE, D., SCHATZ, G.: Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.* 263, 4509-4511 (1988)
- SANFORD, J.E., KLEIN, T.M., WOLF, E.D., ALLEN, N.: Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process. *Particulate Sci. Technol.* 5, 27-37 (1987)
- SANFORD, J.C., SMITH, F.D., RUSSEL, J.A.: Optimizing the biolistic process for different biological applications. *Meth. Enzymol.* 217, 483-509 (1993)
- SCHÄGGER, H., VON JAGOW, G.: Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.* 166, 368-379 (1987)
- SCHLEGEL, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie, 7. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York, S. 426 (1992)
- SHERMAN, F., FINK, G.R., HICKS, J.B.: Methods in yeast genetics. Cold Spring Harbour Press, Cold Spring Harbour, New York (1996)
- STEELE, D.F., BUTLER, C.A., FOX, T.D.: Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 5253-5257 (1996)
- STOECKENIUS, W., BOGOMOLNI, R.A.: Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 587-616 (1982)
- STRYER, L.: Biochemie, Spektrum, Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, New York (1991)
- TORRELO, A.T., OVERHOLTZER, M.H., CAMERON, V.L., BONNEFOY, N., FOX, T.D.: Deletion of the leader peptide of the mitochondrially encoded precursor of *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome c oxidase subunit II. *Genetics* 145, 903-910 (1997)
- TZAGLOFF, A.: Mitochondria. Plenum Press, New York und London, S. 111-130 (1982)
- VAN STEEG, H., OUDSHOORN, P., VAN HELL, B., POLMAN, J.E.M., GRIVELL, L.A.: Targeting efficiency of a mitochondrial pre-sequence is dependent on the passenger protein. *EMBO J.* 5, 3643-3650 (1986)
- VIEBROCK, A., PERZ, A., SEBALD, W.: The imported preprotein of the proteolipid subunit of the mitochondrial ATP synthase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and sequencing of the mRNA. *EMBO J.* 1, 565-571 (1982)

- WALTER, P., GILMORE, R., BLOBEL, G.: Protein translocation across the endoplasmatic reticulum. *Cell* 38, 5-8 (1984)
- WÖLFER, U., DENCHER, N.A., BÜLDT, G., WREDE, P.: The bacteriorhodopsin precursor is processed in two steps. *Eur. J. Biochem.* 174, 51-57 (1988)
- XU, Z., MOFFET, D.B., PETERS, T.R., SMITH, L.D., PERRY, B.P., WHITMER, J., STOKKE, S.A., TEINTZE, M.: The role of the leader sequence coding region in expression and assembly of bacteriorhodopsin. *J. Biol. Chem.* 270, 24858-24863 (1995)
- ZHENG, H., ROSENBERG, L.E., KALOUSEK, F., FENTON, W.A.: GroEL, GroES, and ATP-dependent folding and spontaneous assembly of ornithine transcarbamylase. *J. Biol. Chem.* 268, 7489-7493 (1993)
- ZSCHERP, C.: Der Protonentransport durch das Membranprotein Bacteriorhodopsin, untersucht mittels zeitaufgelöster Infrarotspektroskopie. Inaugural-Dissertation der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (1997)

7 ANHANG

7.1 Das mtbos-Gen

1. Zeile: Lage der Mutageneseprimer
2. Zeile: DNA-Sequenz, im Vergleich zur bos-Sequenz geänderte Nukleotide sind in Großbuchstaben angegeben
3. Zeile: Aminosäuresequenz
4. Zeile: Lage einiger ausgewählter Restriktionsschnittstellen

MTBOS1

>----->
 AGT AGA CAA gcc cag att act ggt cgT cct gaa tgg att tgg tta gct tta
 ser arg gln ala gln ile thr gly arg pro glu trp ile trp leu ala leu
 ↑
 AccI

MTBOS2

<-----<
 ggt act gct tta atg ggt tta ggc act Ttg tac ttt Ttg gtc aag ggt atg
 gly thr ala leu met gly leu gly thr leu tyr phe leu val lys gly met

gga gtc tgc gat cca gat gct aag aaa ttc tat gct att act acc tta gtt
 gly val ser asp pro asp ala lys lys phe tyr ala ile thr thr leu val
 ↑
 BamHI

MTBOS3

<-----<
 cct gct att gcg ttc act atg tat TtA tct atg tta tta ggt tac ggt Ttg
 pro ala ile ala phe thr met tyr leu ser met leu leu gly tyr gly leu

<-----<
 acc atg gta ccg ttc gga ggt gag cag aat cct atc tac tgg gct cgt tat
 thr met val pro phe gly gly glu gln asn pro ile tyr trp ala arg tyr

MTBOS4

<-----<
 gct gat tgg tta ttc act act cct Ttg Tta Tta tta gat tta gct Tta Tta
 ala asp trp leu phe thr thr pro leu leu leu leu asp leu ala leu leu

MTBOS5

<-----<
 gtG gac gct gat cag ggt act atc tta gct Ttg gta ggt gcc gat ggt att
 val asp ala asp gln gly thr ile leu ala leu val gly ala asp gly ile
 ↑
 BclI

atg att ggt act ggc tta gta ggt gcc tta act aag gtt tat tgc tat Aga
met ile gly thr gly leu val gly ala leu thr lys val tyr ser tyr arg

MTBOS6

ttt gtc tga tga gct att tct act gct gca atg ttg tat atc ttg tat gtc
phe val trp trp ala ile ser thr ala ala met leu tyr ile leu tyr val

ttg ttc ttc gga ttc act tct aaa gct gaa agc atg cgt cct gag gtc gcg
leu phe phe gly phe thr ser lys ala glu ser met arg pro glu val ala

↑
SphI

agc act ttc aag gtc tta cgt aat gtt act gtt gtc tta tgg tct gct tat
ser thr phe lys val leu arg asn val thr val val leu trp ser ala tyr

cct gtt gtc tgg tta att ggt tcc gag gga gcc ggt att gtg cct tta aac
pro val val trp leu ile gly ser glu gly ala gly ile val pro leu asn

MTBOS7

att gaa act Ttg Ttg ttc atg gtc tta gat gtc tct gct aag gtt gga ttc
ile glu thr leu leu phe met val leu asp val ser ala lys val gly phe

MTBOS8

ggc Ttg att Ttg ttg cgt tct Aga gca att ttc ggc gag gcg gag gcg ccg
gly leu ile leu leu arg ser arg ala ile phe gly glu ala glu ala pro

MTBOS9

gag ccg tgc gcg ggc gac ggc gca gcg gcg acg tca gac tAa GGA TCC CG
glu pro ser ala gly asp gly ala ala ala thr ser asp och

↑
BamHI

7.2 Abkürzungen

Aminosäuren wurden mit dem Drei-Buchstaben-Code abgekürzt.

::	Insertion
Δ	Deletion
α	anti
A	Ampere
AAC	ADP/ATP-Translokator
Abb.	Abbildung
Ade	Adenin
ADP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
BO	Bacterioopsin
bp	Basenpaare
BR	Bacteriorhodopsin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
C-	Carboxy-
°C	Grad Celsius
coxIV	mit Präsequenz der Untereinheit IV der Cytochrom-c-Oxidase
D	Dextrose (englisch für Glukose), Dalton
DHFR	Dihydrofolat Reduktase
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	N,N-Ethylendiaminotetraessigsäure
F ₁ β	β -Untereinheit der mitochondrialen F ₁ -ATPase
g	Gramm, Erdbeschleunigung
G	Guanin
Gal	Galaktose
Glyc	Glycerin
GST	Glutathion-S-Transferase
h	Stunde
<i>H. salinarum</i>	<i>Halobacterium salinarum</i>
Hsp	Hitzeschockprotein
l	Liter
M	Molar
min	Minute

MOPS	γ Morpholino-propansulfonsäure
MRGS6His	Aminosäureabfolge: Methionin, Arginin, Glycin, Serin und sechs Histidine
mRNA	Boten-Ribonucleinsäure
N-	Amino-
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Raf	Raffinose
RNA	Ribonucleinsäure
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
<i>S. pombe</i>	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>
SU9	mit Präsequenz der Untereinheit 9 der mitochondrialen F ₁ -ATPase
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u	unit (Einheit der Enzymaktivität)
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumenanteil
w/v	Masse pro Volumen
x	mal
z. B.	zum Beispiel

DANKSAGUNG

Diese Arbeit wurde am Institut für Biologische Strukturforschung unter Leitung von Professor Dr. G. Büldt angefertigt.

Herrn Professor Dr. Georg Büldt danke ich für die Überlassung des Themas, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit und die Möglichkeit, einige Teile der Arbeit im Labor von Professor Dr. N. Pfanner und Professor Dr. T.D. Fox anfertigen zu können.

Frau Dr. Bettina Möckel danke ich für die Betreuung von Oktober 1994 bis Dezember 1995. Sie begleitete meine ersten Schritte in die Methoden der Molekularbiologie. Ihre ständige Diskussionsbereitschaft und ihre Anregungen haben viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau Dr. Ramona Schlesinger danke ich für die Übernahme meiner Betreuung bis zum Ende dieser Arbeit. Ihre wertvolle Hilfe und ständige Diskussionsbereitschaft trugen ebenfalls viel zum Gelingen dieser Arbeit bei. Von ihr stammt der Expressionsstamm zur Isolierung von GST-BOS.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe und allen anderen, die mir mit Diskussion und Anregung geholfen haben, möchte ich hiermit meinen herzlichen Dank aussprechen.

Besonderer Dank gilt Anne Cousin für die Kultivierung der Halobakterien und Isolierung der Purpurmembran.

Meine Kollegin und gute Laborgenossin Bianca Krafft gab mir wertvolle Tips für die Arbeit mit Mitochondrien und *S. cerevisiae*.

An dieser Stelle möchte ich auch Dr. „Karlo“ Schimz für die sehr freundliche Aufnahme in „sein“ Isotopenlabor danken. Er half mir in allen Fragen bezüglich der Arbeit mit [³⁵S]Methionin. Seine Diskussionsbereitschaft und seine aufmunternden Worte halfen mir über viele Hürden hinweg.

Herrn Prof. Nikolaus Pfanner danke ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Besonders sei Dr. Joachim Rassow für die Einführung in die Technik des *in vitro* Imports gedankt.

Auch gedankt sei Herrn Professor Dr. Thomas Fox für die sehr freundliche Aufnahme in sein Labor und sein Interesse an meiner Arbeit. In einem siebenwöchigen Aufenthalt führte ich die Biolistische Transformation in seinem Labor durch. Dabei unterstützte mich besonders Christine Butler, ihr sei hier auch ein herzliches Dankeschön gewidmet.

Nicht zuletzt möchte ich meinen Eltern und meiner Schwester Maria für all die Jahre der uneingeschränkten Unterstützung und des geduldigen Verständnisses danken.

Forschungszentrum Jülich



Jül-3500
Januar 1998
ISSN 0944-2952