

**Charakterisierung der mitochondrialen  
intramembranen Serinprotease  
Pcp1 aus *Saccharomyces cerevisiae*  
Meyen ex E.C. Hansen**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

Dem Department Biologie der Universität Hamburg  
vorgelegt von

Dipl.-Biol. Julia Patrizia Stohn  
aus Hamburg

Hamburg im Oktober 2008



Universität Hamburg  
Biozentrum Klein Flottbek



Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Frau Professor Dr. E. PRATJE  
Weiterer Gutachter der Dissertation:  
Herr Professor Dr. H.-P. MÜHLBACH  
Tag der Disputation: 14. November 2008

Hamburg, den 29. Oktober 2008

Handwritten signature of Jörg Ganzhorn in black ink.

Professor Dr. Jörg Ganzhorn  
Leiter des Departments Biologie

*Für mich*

---

Diese Arbeit wurde durch ein Stipendium der Universität Hamburg, Bereich Forschung und Wissenschaftsförderung gemäß dem Hamburgischen Gesetz zur Förderung des wissenschaftlichen und künstlerischen Nachwuchses, sowie einem Stipendium der Universität Hamburg finanziert.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

MICHAELIS G, ESSER K, TURSUN B, STOHN JP, HANSON S & PRATJE E:

Mitochondrial signal peptidases of yeast: the rhomboid peptidase Pcp1 and its substrate cytochrome C peroxidase.

*Gene*. **354** (2005) 58-63

STOHN JP, ESSER K, TURSUN B, HANSON S, SCHUMACHER B, MICHAELIS G & PRATJE E:

The mitochondrial rhomboid peptidase Pcp1.

Société Française de Biologie Végétale, France, Obernai

28. Mai – 2. Juni 2005 (Poster)

STOHN JP, KRUMPE K, KMIEC-WISNIEWSKA B, URANTOWKA A, SAKAMOTO W, MICHAELIS G, JANSKA H & PRATJE E:

Intramembrane proteolysis: mitochondrial rhomboids of yeast and *Arabidopsis thaliana*.

FASEB Summer Research Conferences, USA, Tucson, A

5. - 10. August 2007 (Poster)

STOHN JP, KRUMPE K, SCHUMACHER B, SAKAMOTO W, JANSKA H & PRATJE E:

Intramembrane proteolysis: mitochondrial rhomboids of yeast and *Arabidopsis thaliana*.

Deutsche Botanische Gesellschaft, Deutschland, Hamburg

3. - 7. September 2007 (Poster)

---

STOHN JP, DJACENKO L, KRUMPE K, SCHUMACHER B, KMIEC-WISNIEWSKA B,  
URANTOWKA A, SAKAMOTO W, MICHAELIS G, JANSKA H & PRATJE E:

Mitochondrial Rhomboid Proteases of Yeast and Plants.

Gordon Research Conference on Mitochondria & Chloroplasts, USA,  
Biddeford, ME

10. - 15. August 2008 (Poster)

---

## Inhaltsverzeichnis

---

	Abkürzungsverzeichnis	9
1	Einleitung	16
1.1	Die Hefe <i>Saccharomyces cerevisiae</i> als molekularbiologischer Modellorganismus	16
1.2	Aufbau und Funktion von Mitochondrien	17
1.3	Endosymbiontentheorie und Import von Proteinen in die Mitochondrien	19
1.4	Mitochondriale Signalsequenzen und -peptidasen	22
1.5	Klassifizierung der Rhomboidproteasen und Pcp1p	24
1.6	Zielsetzung	29
2	Material und Methoden	31
2.1	Material	31
2.1.1	Geräte und Materialien	31
2.1.2	Chemikalien und Enzyme	34
2.1.3	Stämme	35
2.1.3.1	<i>Escherichia coli</i>	35
2.1.3.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
2.1.4	Medien	39
2.1.4.1	Medien für <i>Escherichia coli</i>	39
2.1.4.2	Medien für <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2.1.5	Plasmide	42
2.1.5.1	<i>Escherichia coli</i> Plasmide	42
2.1.5.2	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Plasmide	42
2.1.6	Oligonukleotid-Primer	42
2.1.7	Antikörper	44
2.2	Methoden	44
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	45
2.2.1.1	Konzentrationsbestimmung von Nucleinsäuren	45
2.2.1.2	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45

---

2.2.1.2.1	Schnell-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
2.2.1.2.2	Alkalische Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	45
2.2.1.3	Isolierung von genomischer DNA aus <i>S. cerevisiae</i>	46
2.2.1.4	DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)	46
2.2.1.5	Phenolextraktion von DNA	47
2.2.1.6	DNA-Fällung	47
2.2.1.6.1	Ethanol-fällung	47
2.2.1.6.2	Isopropanol-fällung	47
2.2.1.7	DNA-Restriktion	48
2.2.1.8	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten	48
2.2.1.9	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	49
2.2.1.10	Ligation von DNA	49
2.2.1.11	Präparation transformationskompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	49
2.2.1.12	Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA	49
2.2.1.13	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> mit Plasmid-DNA	50
2.2.1.14	Klonierungsstrategien	50
2.2.1.15	Isolierung von RNA aus <i>S. cerevisiae</i>	51
2.2.1.16	Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von RNA	52
2.2.1.17	Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden	52
2.2.1.18	Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden	52
2.2.1.19	RNA-Transfer auf Nylonmembranen (Northern Blot)	53
2.2.1.20	Hybridisierung von RNA mit DIG-markierten Sonden	53
2.2.1.21	Nachweis hybridisierter RNA	54
2.2.2	Zellbiologische Methoden	54
2.2.2.1	Anzucht von <i>E. coli</i>	54
2.2.2.2	Anzucht von <i>S. cerevisiae</i>	55
2.2.2.3	Erstellung einer Wachstumskurve	55
2.2.2.4	Induktion der Proteinexpression in <i>E. coli</i>	55
2.2.2.5	Induktion von Hitzestress in <i>S. cerevisiae</i>	56
2.2.2.6	Induktion von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stress in <i>S. cerevisiae</i>	56
2.2.2.7	Isolierung von Zellmembranen aus <i>E. coli</i>	56

---

2.2.2.8	Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i>	57
2.2.2.9	Isolierung mitochondrialer Membranen aus <i>S. cerevisiae</i>	57
2.2.3	Proteinchemische Methoden	58
2.2.3.1	Quantifizierung mitochondrialer Proteine	58
2.2.3.2	Quervernetzung von Proteinen (Crosslinking)	58
2.2.3.3	Dephosphorylierung von Proteinen mit CIAP	58
2.2.3.4	Deglycosylierung von Proteinen	59
2.2.3.5	Solubilisierung mitochondrialer Membranproteine	59
2.2.3.6	Blue Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)	60
2.2.3.7	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	61
2.2.3.8	Coomassie-Färbung von SDS-Gelen	61
2.2.3.9	Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Western Blot)	62
2.2.3.10	Ponceau-S-Färbung von Proteinen	62
2.2.3.11	Nachweis von Proteinen durch Antikörper (Immundetektion)	62
3	Ergebnisse	64
3.1	Regulierung der Expression der mitochondrialen Rhomboidprotease <i>PCP1</i>	64
3.1.1	Transkriptanalyse in Abhängigkeit der Wachstumsphasen oder des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> - oder Hitzestresses	64
3.1.2	Proteinanalyse in Abhängigkeit der Wachstumsphasen oder des H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Stress	73
3.1.3	Untersuchungen zur Modifikation des Rhomboidproteins	75
3.1.3.1	Phosphorylierung	76
3.1.3.2	Glycosylierung	77
3.2	Proteolytische Reifung von Pcp1p während des Imports in die Mitochondrien	79
3.2.1	Untersuchungen zur Identifizierung der an der Prozessierung von Pcp1p beteiligten Signalpeptidase(n)	79
3.2.2	Untersuchungen der katalytischen Dyade von Pcp1p in Bezug auf eine autokatalytische Prozessierung	84
3.3	Untersuchungen über die Beteiligung von Pcp1p an einem Protein-Komplex	86

---

3.3.1	Nachweis von Pcp1p in einem Protein-Komplex der inneren Mitochondrienmembran	86
3.3.2	Einfluss der Transmembrandomänen von Pcp1p auf die Komplexbildung	88
3.3.3	Crosslinking-Versuche zur Identifizierung des Pcp1p-Komplexes	96
3.3.4	Untersuchung eines Pcp1p/m-AAA-Protease-Superkomplexes	100
3.4	Expression von Pcp1p in <i>E. coli</i>	101
4	Diskussion	106
4.1	Wachstum der Zellen beeinflusst die Expression von <i>PCP1</i>	106
4.2	Pcp1p weist keine posttranslationalen Modifikationen auf	108
4.3	Bekannte mitochondriale Signalpeptidasen sind nicht an der Prozessierung von Pcp1p beteiligt	110
4.4	Pcp1p bildet einen Proteinkomplex in der inneren Mitochondrienmembran	113
4.5	Homologien zwischen Pcp1p und GlpG reichen nicht für die Integration in die periplasmatische Membran in <i>E. coli</i> aus	117
4.6	Ausblick	120
5	Zusammenfassung	122
6	Literatur	124
	Anhang	149
I	Gen- und Aminosäuresequenz von <i>PCP1</i> / Pcp1p	149
II	Hefevektor YCplac111 und YCplac111-Konstrukte	150
III	Hefevektor YEp352 und YEp352-Konstrukte	160
IV	Expressionsvektor pET-30a(+) und pET-30a(+)-Konstrukte	180
	Danksagung	186

---

## Abkürzungen

A	Ampere
Abb.	Abbildung
ACA	$\epsilon$ -Aminocaprinsäure
AK	Antikörper
amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat, Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure(n)
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
b	Base(n)
$\beta$ -ME	Beta-Mercaptoethanol
bidest.	bidestilliert
BN-PAGE	Blue-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumine)
Bsp.	Beispiel
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CSPD	Disodium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxetane-3,2'-(5'-Chloro) Tricyclo[3.3.1. <sup>1,3,7</sup> ]Decan}-4-yl) Phenylphosphat (=Chemiluminescent-Substrat)
C-terminal / C-Terminus	Carboxyterminal / Carboxy-Terminus
Da	Dalton (Gewichtseinheit für Moleküle und Proteine; 1 Da = 1/12 der Masse des Kohlenstoff-Isotops <sup>12</sup> C)
DDM	n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
$\Delta$	Deletion
d.h.	das heißt
div.	diverse/-n/-r/-s

---

DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und wissenschaftliche Mitarbeiter
FAD / FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-dinukleotid (oxidierte / reduzierte Form)
Fe	Eisenatom
g	Gramm
g (xg)	Zentrifugalbeschleunigung
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonat
HRP	Meerrettichperoxidase (Horseradish Peroxidase)
hsDNA	Heringsperma-DNA
IM	innere Mitochondrienmembran (inner membrane)
IMS	Intermembranraum (inter membrane space)
IPTG	Isopropylthiogalactosid (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid)
k	Kilo- (10 <sup>3</sup> )
l	Liter
LB	Luria Broth
m	Milli- (10 <sup>-3</sup> )
M	molar (mol / l)
max.	maximal
MBA	Multi-copy Bypass of AFG3 (AFG3=YTA10)
MCS	Multiple Klonierungs-Stelle (multiple cloning site)

---

---

MDH	Malatdehydrogenase
min	Minute(n)
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
Mol	Einheit der Stoffmenge (1 Mol entspricht $6,022 \times 10^{23}$ Teilchen)
mt-DNA	mitochondriale DNA
$\mu$	Mikro- ( $10^{-6}$ )
n	Nano- ( $10^{-9}$ )
NAD / NADH + H <sup>+</sup>	Nicotinamid-adenin-dinukleotid (oxidierte / reduzierte Form)
NC	Nitrocellulose
NCBI	National Center for Biotechnology Information
N-terminal / N-Terminus	Aminoterminal / Amino-Terminus
OD <sub>280</sub>	optische Dichte bei Licht der Wellenlänge 280 nm
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei Licht der Wellenlänge 600 nm
OM	äußere Mitochondrienmembran (outer membrane)
ORF	offener Leseraster (open reading frame)
p	Pico- ( $10^{-12}$ )
p.a.	pro analysi
PAA	Polyacrylamid
pADH	Promotor der Alkoholdehydrogenase
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Polyethylenglykol
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H <sub>3</sub> O <sup>+</sup> -Konzentration einer Lösung
P <sub>i</sub>	anorganisches Phosphat (PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
Ponceau-S	3-Hydroxy-4-[2-sulfo-4-(sulfo-phenylazo)phenylazo]-2,7-naphthalindisulfonsäure
PP	Polypropylen
psi	Pound per Square Inch (Druckangabe)

---

RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
s-MBS	Sulfo-MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfosuccinimidester)
s.o.	siehe oben
Tab.	Tabelle
TB	Tris-Borat
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris gepufferte Salzlösung (Tris Buffered Saline)
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIM	Translokase der inneren Membran
™	eingetragene Marke
TM	Transmembranhelix
TOM	Translokase der äußeren Membran
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminoethan
Triton X-100	Octyl-Phenoxy-Polyethoxyethanol
ts	temperatursensitiv
Tween 20	Polyoxyethylen-Sorbitan-Monolaurat
U	Einheit der Enzymaktivität (Unit: 1U = 1µg umgesetzte DNA / Stunde)
u.a.	unter anderem

---

v; Vol.	Volumen
V	Volt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen (weight per volume)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel
$\emptyset$	Durchmesser

## Aminosäuren, Basen und Nukleotide

### Aminosäuren

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F

---

Aminosäure	Dreibuchstaben-Code	Einbuchstaben-Code
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

**Basen:**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

**Nukleotide:**

dATP	Desoxy-Adenosin-5'-triphosphat
dCTP	Desoxy-Cytidin-5'-triphosphat
dGTP	Desoxy-Guanosin-5'-triphosphat
dTTP	Desoxy-Thymidin-5'-triphosphat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
CTP	Cytidin-5'-triphosphat
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
UTP	Uridin-5'-triphosphat

## Gen- und Proteinbezeichnung:

Genbezeichnungen werden generell kursiv geschrieben. Hierbei werden Wildtypallele mit Großbuchstaben und Mutantallele mit Kleinbuchstaben geschrieben.

Proteinbezeichnungen beginnen mit einem Großbuchstaben und sind durch ein nachgestelltes „p“ gekennzeichnet. Präfixe vor Proteinbezeichnungen beziehen sich auf die Prozessierungsstufe und beschreiben folgende Proteinform: „p“: Vorläuferprotein („precursor“), „i“: Intermediat und „m“: reifes Protein („mature“).

# 1. Einleitung

## 1.1 Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* als molekularbiologischer Modellorganismus

Die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*) ist ein einzelliger Eukaryot und gehört zur Klasse der Ascomyceten. Die Vermehrung der Hefezellen erfolgt entweder vegetativ durch Knospung oder sexuell durch Verschmelzung zweier haploider Zellen des Paarungstyps a und  $\alpha$  zu einer diploiden Zygote. Die diploide Zygote kann durch Meiose vier haploide Ascosporen ausbilden, die zu haploiden Zellen beider Paarungstypen heranwachsen.

Hefezellen leben bevorzugt diploid und können ggf. durch einen autonomen Paarungstypwechsel diesen Zustand erreichen. Durch eine Mutation im HO-Gen wird dieser Wechsel des Paarungstyps unterbunden. Das Ergebnis ist eine stabile haploide Zell-Linie des Paarungstyps a oder  $\alpha$  (DICKINSON & SCHWEIZER 1999).

Für den Einsatz in der Molekulargenetik sind gerade diese haploiden Zelllinien interessant, da sie eine Untersuchung rezessiver Genmutationen sowohl phäno- als auch genotypisch ermöglichen. Zudem wurde das auf 16 Chromosomen aufgeteilte Genom von *S. cerevisiae* als erstes eukaryotisches Genom vollständig durchsequenziert (BASSETT JR. *et al.* 1996, DUJON 1996).

*S. cerevisiae* ist ein fakultativ anaerob lebender Organismus. Bei der anaeroben Lebensweise gewinnt die Hefe die notwendige Energie durch alkoholische Gärung. Dies ermöglicht u.a. die an der Atmungskette und dem Citratzyklus beteiligten Gene und Proteine zu untersuchen (DICKINSON & SCHWEIZER 1999).

Die Hefe lässt sich unter einfachen Bedingungen sowohl in Flüssigkultur als auch auf Agarplatten leicht kultivieren und vermehrt sich mit einem Generationswechsel von ca. 2h relativ schnell.

Für die Arbeit mit *S. cerevisiae* haben sich eine Vielzahl von Methoden etabliert. So lassen sich z.B. gezielt Gene aus dem Genom deletieren und Deletionsstämme erzeugen. Ebenso können durch die Transformation beliebig veränderte Gene in die Zelle eingebracht und exprimiert werden oder sogar ins Genom integriert werden.

## 1.2 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

Das Mitochondrium ist ein für eukaryotische Zellen typisches Organell. Es kommt in unbestimmbarer Zahl im Zytoplasma der Zelle vor (LODISH *et al.* 2000). Der Aufbau und die interne Organisation der Mitochondrien sind in allen Organismen gleich, wohingegen die Form nicht nur in unterschiedlichen Organismen, sondern auch innerhalb einer Zelle variabel ist (YAFFE 1999 b).

Die äußere und innere Membran der Mitochondrien begrenzen zwei Kompartimente: den Intermembranraum (IMS) zwischen der äußeren und inneren Membran und die Matrix. Die als Cristae bezeichneten Einstülpungen der inneren Membran (IM) vergrößern deren Oberfläche stark. Die äußere Membran ist für die meisten kleinen Moleküle (z.B. ATP) und Ionen vollständig permeabel, da es Porin enthält, ein Transmembranprotein, das eine Pore bildet. Die innere Membran hingegen ist für nahezu alle Ionen und polaren Moleküle undurchlässig. Deshalb leiten Transporterproteine Metaboliten, wie z.B. ATP, durch die innere Mitochondrienmembran.

Mitochondrien besitzen eine eigene DNA (mtDNA), die sich in der Matrix befindet. Es handelt sich dabei um zumeist ringförmige DNA-Moleküle, die die Gene für einen Teil der mitochondrialen Proteine enthalten. Die Größe der DNA-Moleküle und die Zahl der darauf kodierten Gene variieren von Organismus zu Organismus. Ein DNA-Molekül der Hefe ist ca. 78000 bp groß (BROCK *et al.* 2000, LODISH *et al.* 2000).

Mitochondrien werden klassischerweise bohnenförmig dargestellt. Sie können aber auch eine lange, schlangen-ähnliche, tubuläre Form annehmen oder verzweigte sowie ausgebreitete tubuläre Netzwerke bilden. Die Struktur der Mitochondrien ist dynamisch und unterliegt regulierten Teilungs- und Verschmelzungsprozessen. Die Mitochondrien in *S. cerevisiae* werden normalerweise in einem weit verzweigten, gleichmäßig verteiltem Netzwerk in der Zellperipherie vorgefunden (YAFFE 1999b). Die Proteine, die an diesen regulatorischen Mechanismen beteiligt sind, befinden sich an der äußeren Membran der Mitochondrien, in der inneren Membran oder im IMS. Das im IMS lokalisierte Mgm1 Protein von *S. cerevisiae* ist z.B. an der Fusion der Mitochondrienmembranen beteiligt. Der Verlust des Mgm1 Proteins führt zur Fragmentierung der mitochondrialen Tubuli und

zu Defekten bei der mitochondrialen Vererbung (SESAKI *et al.* 2003). Im Gegensatz zur gleichmäßigen Verteilung der Chromosomen werden die Mitochondrien während der Mitose zu ungefähr gleicher Anzahl auf die Tochterzelle verteilt (LODISH *et al.* 2000). Die Vererbung der Mitochondrien hängt von einem aktiven Transport entlang des Cytoskeletts und ständigen Teilungen und Verschmelzungen der Membranen ab (DIMMER *et al.* 2002).

Die Funktion der Mitochondrien ist vielseitig. Sie beherbergen u.a. die Komplexe des Citratzyklus in der Matrix und der Atmungskette in der IM. Ebenso sind sie am Abbau von Fettsäuren beteiligt ( $\beta$ -Oxidation). In den Mitochondrien werden Eisen-Schwefel-Cluster synthetisiert. Sie regulieren den cytosolischen Calciumspiegel und spielen eine Rolle in der Apoptose.

Aber eine der wohl wichtigsten Funktionen der Mitochondrien ist die Generierung von Energie in Form von ATP. Das ATP-Molekül besitzt zwei energiereiche Phosphoanhydridbindungen, durch deren Spaltung die notwendige Energie für endotherme Reaktionen in der Zelle zur Verfügung gestellt wird (BROCK *et al.* 2000).

Während der Glykolyse wird im Cytosol Glucose zu Pyruvat umgewandelt. Dabei entsteht nur eine geringe Menge ATP. Durch Transportproteine in der inneren Mitochondrien-Membran wird das Pyruvat in die mitochondriale Matrix geleitet und dort in Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) umgewandelt. Das Acetyl-CoA wird dann im Citratzyklus weiter zu CO<sub>2</sub> oxidiert. Bei diesen Reaktionen werden die Reduktionsäquivalente NADH und FADH<sub>2</sub> gebildet, die die Elektronen auf den ersten Komplex in der Atmungskette übertragen.

Die Atmungskette besteht normalerweise aus fünf Komplexen. *S. cerevisiae* bildet eine Ausnahme, denn in der Hefe fehlt der erste Komplex (GRAY *et al.* 2001). Die NADH-Dehydrogenase (Komplex I) besteht aus Eisen/Schwefel-Proteinen und einem Flavinmononucleotid als prosthetischer Gruppe. In dem Komplex werden die Elektronen von NADH auf Ubichinon transferiert, welches hierbei zu Ubihydrochinon reduziert wird. Die Succinat-Dehydrogenase (Komplex II) ist ein Komplex aus dem Citratzyklus und oxidiert das dort anfallende Succinat zu Fumarat. Das FAD (Flavin-Adenin-Dinukleotid) liegt in dem Enzym als prosthetische Gruppe vor und reduziert in dem Komplex ebenfalls das Ubichinon zu Ubihydrochinon. Die Cytochrom *c* Reduktase (Komplex III) oxidiert das Ubihydrochinon. Dabei kommt es zur Reduktion von Cytochrom *c*, ein lösliches Protein mit Häm als prosthetischer Gruppe. Cytochrom *c* dient als Elektronencarrier und

transportiert die übertragenen Elektronen zur Cytochrom *c* Oxidase (Komplex IV). In diesem Komplex wird das Cytochrom *c* oxidiert und die Elektronen werden auf den Endakzeptor Sauerstoff übertragen. Dabei wird dieser zu Wasser reduziert (STRYER 1999).

Während des Elektronentransfers innerhalb der Atmungskette werden von den einzelnen Komplexen (Ausnahme Komplex II) Protonen von der Matrix in den Intermembranraum der Mitochondrien delokalisiert. Dadurch wird ein Membranpotential ( $\Delta\Psi$ ) über der Membran aufgebaut. Bei der oxidativen Phosphorylierung wird die Energie, die in diesem Protonengradienten enthalten ist, zur Synthese von ATP aus ADP und anorganischem Phosphat verwendet. Die Bildung des ATP wird von der ATP-Synthase (Komplex V) katalysiert (LAW *et al.* 1995)

### 1.3 Endosymbiontentheorie und Import von Proteinen in die Mitochondrien

Nach der seriellen Endosymbiontentheorie, eine Erweiterung der von MARGULIS 1970 formulierten Endosymbiontentheorie, stammen Mitochondrien phylogenetisch von Bakterien ab (TAYLOR 1974). Diese Bakterien wurden von einer Wirtszelle umschlossen und aufgenommen. Trotz der Unterschiede in Größe, Organisation und Expression der mitochondrialen DNA (mtDNA) konnte in allen untersuchten Organismen festgestellt werden, dass die mtDNA einen ähnlichen Satz Gene aufweist. Verknüpft man dies mit der Tatsache, dass der genetische Informationsgehalt der mtDNA stark begrenzt ist, scheint der Ursprung der Mitochondrien monophyletisch zu sein (GRAY 1989). Durch Sequenzvergleiche eukaryotischer und bakterieller Genome ließ sich der Ursprung der Mitochondrien auf die Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien zurückführen. *Rickettsia prowazekii* ist der Vertreter dieser Gruppe, der die meisten Homologien mit der mtDNA aufweist. Die unterschiedlichen Größen und Gene der mtDNA sind in erster Linie auf einen Gentransfer von den Mitochondrien zum Kern zurückzuführen (GRAY *et al.* 2001). Dieser Gentransfer führt zu einer Reduzierung des mitochondrialen Genoms (TAYLOR 1974).

Die Reduzierung des mitochondrialen Genoms hatte zur Folge, dass über 95% der Gene für die mitochondrialen Proteine nicht von der mtDNA kodiert werden, sondern sich auf dem Kerngenom befinden. Nachdem sie im Cytosol an den Ribosomen synthetisiert

worden sind, werden diese Vorstufenproteine vorzugsweise posttranslational in die Mitochondrien importiert und dort an ihren Bestimmungsort geleitet (MARC *et al.* 2002, NEUPERT & HERMANN, 2007).

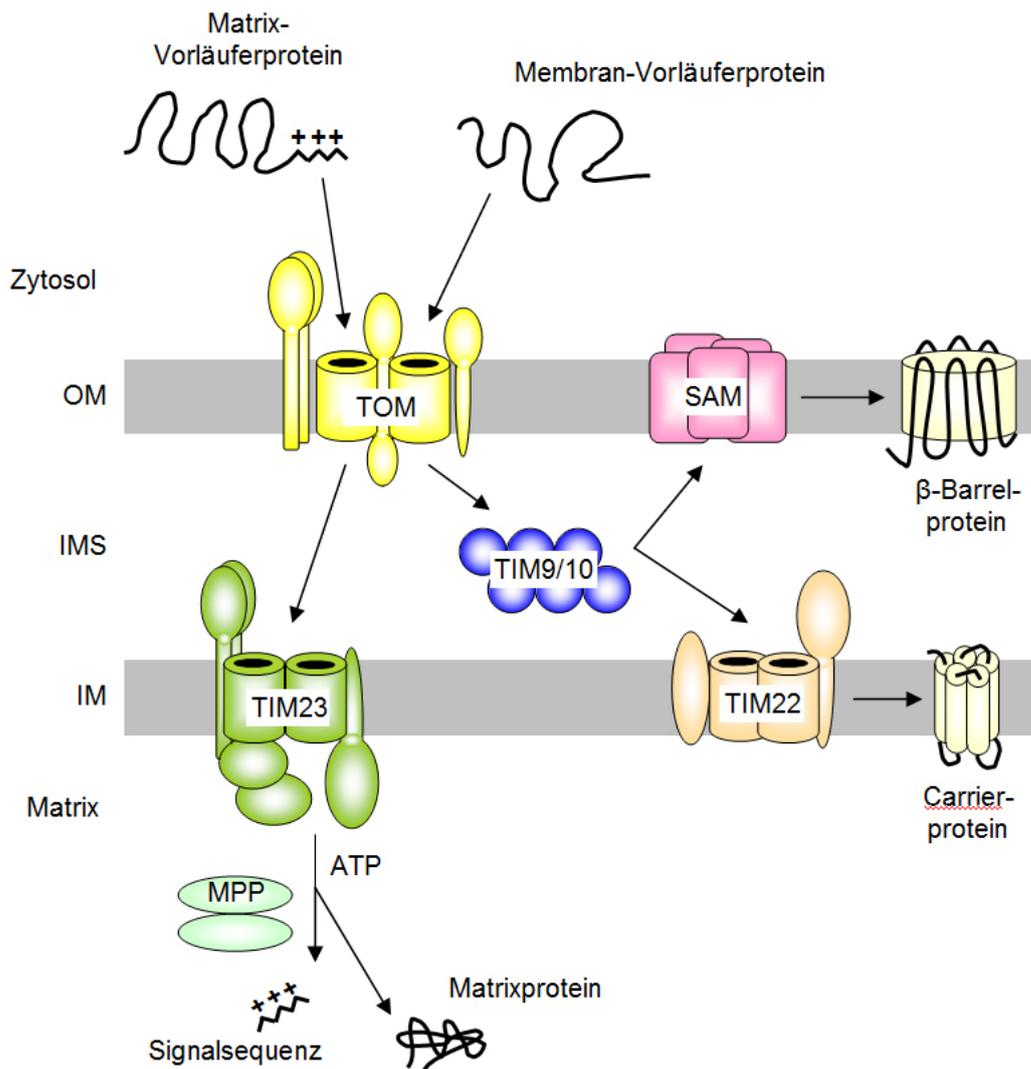
Für die Translokation der Proteine in und innerhalb der Mitochondrien sind verschiedene Proteinkomplexe verantwortlich: die Translokasen der äußeren und der inneren Membran (TOM-, TIM22- und TIM23-Komplex), sowie der SAM-Komplex (Sorting and Assembly Machinery) (NEUPERT & HERMANN, 2007). Sie sind in Abb. 1.3.1 schematisch dargestellt.

Der TOM-Komplex setzt sich aus mehreren Untereinheiten zusammen, die entweder eine Rezeptorfunktion haben oder die Importpore bilden, durch die die Proteine im ungefalteten Zustand durch die äußere Membran (OM) gelangen. Außerdem vermittelt der TOM-Komplex auch die Insertion einiger Proteine in die äußere mitochondriale Membran (OTERA *et al.* 2007, PERRY *et al.* 2008).

Eine weitere Klasse Proteine der äußeren mitochondrialen Membran sind die  $\beta$ -Barrel-Proteine wie z.B. Porin oder TOM40 (Hauptbestandteil der Importpore des TOM-Komplexes). Nach dem Transport durch den TOM-Komplex binden die kleinen TIM-Proteine (meist TIM9/TIM10) im IMS an diese Proteine und geleiten sie an den SAM-Komplex, wo sie schließlich in die OM integriert werden (KUTIK *et al.* 2008). Der SAM-Komplex agiert nicht exklusiv für  $\beta$ -Barrel-Proteine, sondern ist ebenso an der Integration von  $\alpha$ -helikalen TOM-Proteinen beteiligt (STOJANOVSKI *et al.* 2007)

Die Integralproteine der IM werden ebenfalls nach dem Durchqueren der OM von den kleinen TIM-Proteinen besetzt und an den TIM22-Komplex, eine Translokase der inneren mitochondrialen Membran, geleitet und unter Ausnutzung des Membranpotentials in die IM eingebaut (REHLING *et al.* 2003, PEIXTO *et al.* 2007).

Der TIM23-Komplex steht in direktem Kontakt mit dem TOM-Komplex und empfängt z.B. die Matrixvorläuferproteine. Diese werden dann in Anwesenheit des Membranpotentials durch eine Pore des TIM23-Komplexes geleitet. Auf der Matrixseite befindet sich mtHsp70 (Hitzeschockprotein), das ATP gebunden hat. Diese Bindung ist für die Assoziation mit dem Tim23-Komplex nötig. Durch die Hydrolyse von ATP zu ADP bindet nun das Matrixvorläuferprotein aus dem TIM23-Komplex an mtHsp70, welches gleichzeitig von dem Komplex dissoziiert und das Protein weiter in die Matrix zieht. Unklar ist allerdings, ob dies aktiv durch eine Konformationsänderung von mtHsp70 oder passiv durch Diffundieren passiert (CHACINSKA *et al.* 2003, MOKRANJAC *et al.* 2003, MARTINEZ-CABALLERO *et al.* 2007a, POPOV-CELEKETIC *et al.* 2008).



**Abb. 1.3.1 Modell der Translokasen der inneren und äußeren mitochondrialen Membran**

Die an der Translokation und Integration mitochondrialer Proteine beteiligten Komplexe sind dargestellt. Eine genauere Beschreibung ist dem Text zu entnehmen. Die Abbildung wurde nach KUTIK *et al.* (2007) erstellt und modifiziert.

OM: äußere Membran; IM: innere Membran; IMS: Intermembranraum; MPP: Mitochondriale Prozessierungspeptidase.

Ein Teil der IMS-Proteine werden ebenfalls durch den TIM23-Komplex translokalisiert. Sie enthalten eine Transmembrandomäne (TMD), mit der sie in der IM verankert werden. Durch proteolytische Spaltung wird dann der ins IMS ragende Teil des Proteins in dieses Kompartiment entlassen. Kleine Proteine des IMS werden meist direkt hierhin

translokalisiert, wo sie korrekt gefaltet werden und entsprechende Cofaktoren binden (VAN DER LAAN *et al.* 2006, MARTINEZ-CABALLERO *et al.* 2007b).

## 1.4 Mitochondriale Signalsequenzen und -peptidasen

Die mitochondrialen Proteine besitzen eine Signalsequenz, die der Zelle eine Lokalisation zu den Mitochondrien sowie in das entsprechende Kompartiment ermöglicht.

Die meisten kernkodierten Matrixproteine und eine Vielzahl der IMS- und IM-Proteine werden im Cytosol mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert. Im Gegensatz dazu haben die meisten Proteine der äußeren Membran und Carrier-Proteine der inneren Membran ein nicht abspaltbares terminales und / oder internes Lokalisierungssignal.

Die N-terminalen, spaltbaren Signalsequenzen bestehen normalerweise aus einem positiv geladenen, 20-60 Aminosäuren langen Bereich, der eine amphipatische  $\alpha$ -helikale Struktur ausbildet, die für den Transport zu den Mitochondrien notwendig ist. Dahinter befindet sich oft noch ein intramitochondriales Lokalisierungssignal, das die Zuordnung innerhalb der Mitochondrien erlaubt (ROISE & SCHATZ 1989, VON HEINJE *et al.* 1989). Chaperone im Cytosol erkennen die Signalsequenz der mitochondrialen Proteine und binden an diese, um sie in einem Import-fähigen Zustand zu halten (ROISE 1997). Anschließend werden die Proteine an den TOM-Komplex (siehe 1.3) geleitet, wo sie von Rezeptorproteinen, z.B.: TOM70, erkannt und durch die äußere mitochondriale Membran geschleust werden (DIETMEIER *et al.* 1997).

Die spaltbaren Signalsequenzen werden während des Import- und Lokalisationsprozesses proteolytisch abgespalten. Die Prozessierung wird in einem oder mehreren Schritten vollzogen. Das im Cytosol synthetisierte Vorläuferprotein liegt nach Abschluss dieser Vorgänge in seiner reifen Form vor. Die proteolytische Prozessierung der mitochondrialen Proteine wird von so genannten Signalpeptidasen durchgeführt, von denen die wichtigsten im Folgenden dargestellt werden.

Die mitochondriale Prozessierungs-Peptidase (MPP) ist eine in der Matrix lokalisierte Signalpeptidase und hauptsächlich an der proteolytischen Prozessierung von Matrix-Proteinen beteiligt (ISAYA *et al.* 1991). MPP setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, die von den nuklearen Genen MAS1 und MAS2 kodiert werden (YANG *et al.* 1988). Für die katalytische Aktivität ist die Untereinheit  $\beta$ -MPP (MAS1) verantwortlich, wohingegen  $\alpha$ -

MPP (MAS2) eine Rolle bei der Substraterkennung spielt (Striebel *et al.* 1996, Taylor *et al.* 2001).

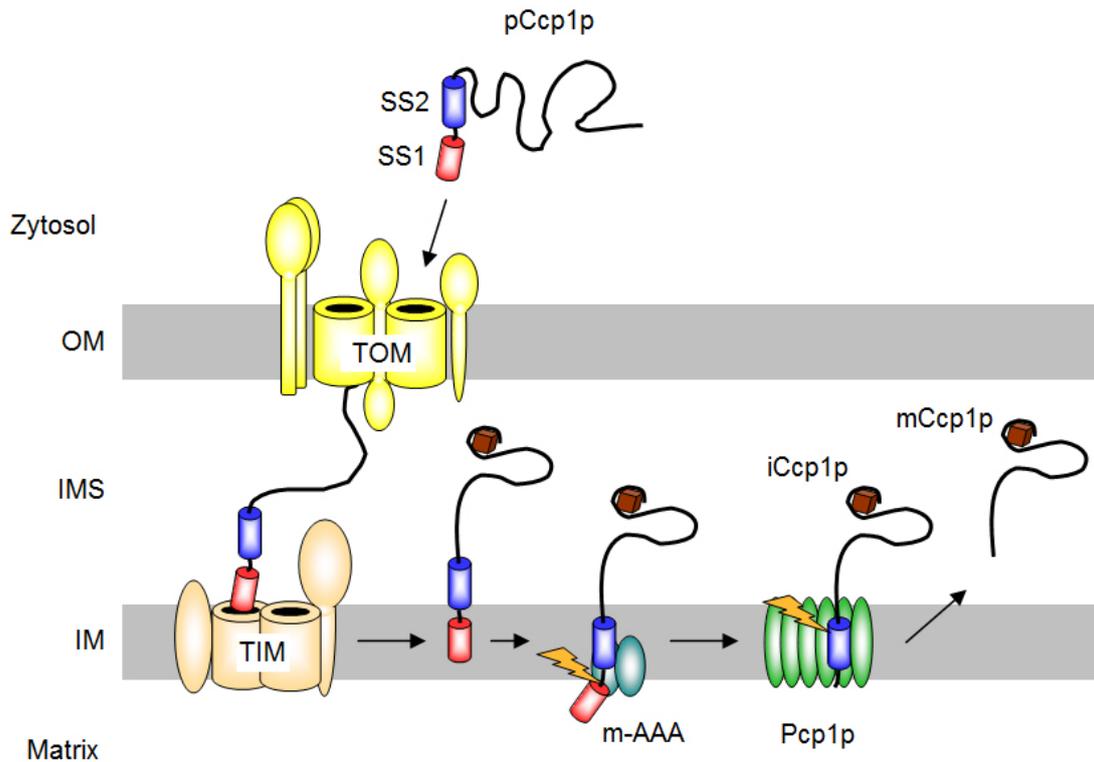
Die mitochondriale Intermediat-Peptidase (MIP) ist an der Prozessierung einiger Matrixproteine beteiligt. Zunächst spaltet MPP den ersten Teil der Signalsequenz ab, bevor MIP die Prozessierung des zweiten Teils übernimmt (ISAYA *et al.* 1991, BRANDA & ISAYA 1995). Diese ebenfalls in der Matrix lokalisierte Peptidase spaltet Oktapeptide von der N-terminalen Signalsequenz ab (ISAYA *et al.* 1992).

Die mitochondriale Innere-Membran-Peptidase (IMP) katalysiert die Reifung einiger Intermembranraum-Proteine und ist in die innere Membran integriert, das katalytische Zentrum in den IMS reichend. Sie besteht unter anderem aus den zwei verwandten Untereinheiten: Imp1p und Imp2p. Beide sind katalytisch aktiv, verwenden aber unterschiedliche Substrate (PRATJE & GUIARD 1986, NUNNARI *et al.* 1993, PRATJE *et al.* 1994, JAN *et al.* 2000). Cytochrom *b*<sub>2</sub> wird z.B. von Imp1p prozessiert, Cytochrom *c*<sub>1</sub> hingegen von Imp2p. Der erste Teil der zweigeteilten Signalsequenz beider Cytochrome wird in der Matrix von der MPP proteolytisch abgespalten (REID *et al.* 1982, PRATJE *et al.* 1994). Eine dritte Untereinheit von IMP stellt Som1p dar und trägt vermutlich zur Substraterkennung bei (JAN *et al.* 2000).

Die m-AAA-Protease (**m**atrix **A**T Pase **a**ssociated with a variety of cellular **a**ctivities) besteht aus den beiden Untereinheiten Yta10p und Yta12p, die einen Komplex in der inneren Membran bilden (ARNOLD & LANGER 2002). Das katalytische Zentrum der m-AAA-Protease reicht in die Matrix. Die m-AAA-Protease ist nicht nur am ATP-abhängigen Abbau unkorrekt gefalteter Proteine und überschüssiger Untereinheiten beteiligt, sondern auch an der Prozessierung der Cytochrom *c* Peroxidase (Ccp1p) in *S. cerevisiae* (ESSER *et al.* 2002) und Opa1p in Mammalia (DUVEZIN-CAUBET *et al.* 2007).

Pcp1 (**p**rocessing of **c**ytochrom **c** **p**eroxidase 1) zeigt ebenfalls Signalpeptidaseaktivität und ist in der inneren Membran lokalisiert (ESSER *et al.* 2002, HERLAN *et al.* 2003, MCQUIBBAN *et al.* 2003, SESAKI *et al.* 2003). Pcp1p ist Gegenstand dieser Dissertation und wird in 1.5 genauer beschrieben.

In Abb. 1.4.1 sind die Importmechanismen und Prozessierungsschritte am Beispiel der kernkodierten Cytochrome *c* Peroxidase kurz zusammengefasst.



**Abb. 1.4.1 Modell des Imports und der Prozessierung der kernkodierten Cytochrome c Peroxidase**

Die kernkodierte Cytochrome c Peroxidase wird als Vorläuferprotein (pCcp1p) mit einer zweiteiligen Signalsequenz (SS1, SS2) im Cytosol synthetisiert und durch Translokasen der äußeren Membran (TOM) und der inneren Membran (TIM) in die innere Membran (IM) importiert. Nach der Bindung von Häm (braunes Quadrat) im C-terminalen Bereich wird der erste Teil der Sequenz von der m-AAA-Protease (m-AAA) abgespalten. Die intermediäre Form von Ccp1p (iCcp1p) wird in einem zweiten Schritt von der Rhomboidprotease Pcp1p prozessiert und das reife Protein (mCcp1p) wird in den Intermembranraum (IMS) entlassen. Die gelb-orange Blitze stellen die jeweiligen Prozessierungsschritte dar. Das Modell wurde nach MICHAELIS *et al.* (2005) und KUTIK *et al.* (2007) erstellt. OM: äußere Membran.

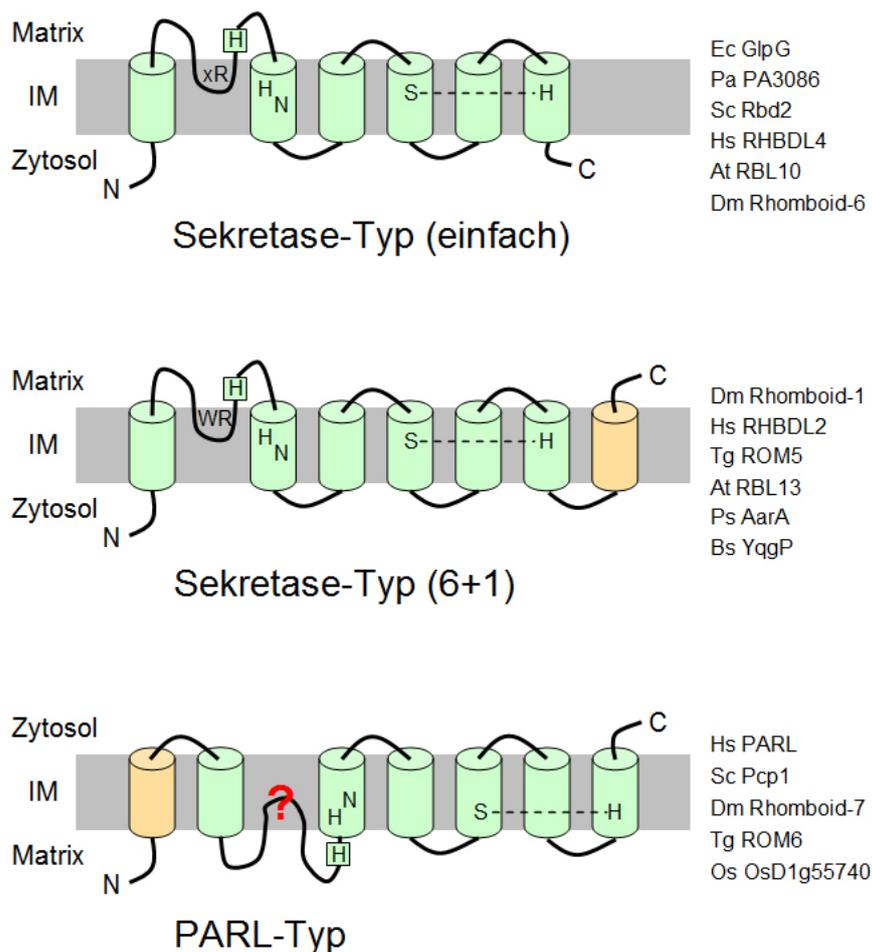
## 1.5 Klassifizierung der Rhomboidproteasen und Pcp1p

Die Intramembranproteasen stellen eine relativ neue Klasse der Proteasen dar und sind in allen Reichen vertreten (BROWN *et al.* 2000). Sie befinden sich in Membranen, ebenso wie ihr katalytisches Zentrum. Dort werden auch ihre Substrate proteolytisch gespalten, meist

innerhalb einer Transmembrandomäne (TMD). Bislang sind vier verschiedene Klassen beschrieben worden: Metalloproteasen (RAWSON *et al.* 1997), Aspartyl-Proteasen, welche in  $\gamma$ -Secretasen und Signal-Peptid-ähnliche-Peptidasen unterschieden werden (WOLFE *et al.* 1999, FLUHRER *et al.* 2006, NARAYANAN *et al.* 2007), und Serinproteasen (Rhomboid-ähnliche Peptidasen) (URBAN *et al.* 2001, LEMBERG & FREEMAN 2007).

Die Klasse der Rhomboid-ähnlichen Peptidasen ist in drei Gruppen unterteilt: Rhomboide, inaktive Rhomboide und andere inaktive Homologe. Die Familie der Rhomboide ist nochmals unterteilt in Sekretasen und die PARL-Familie (siehe Abb. 1.5.1). Alle Rhomboide haben eine 6-Transmembrandomänen (TMD) umfassende Core gemeinsam, deren Kristallstruktur für das Rhomboid GlpG aus *E. coli* beschrieben ist (WANG *et al.* 2006). Es kann noch eine zusätzliche TMD auftreten, die im Falle der Sekretasen C-terminal und bei den Proteasen der PARL-Familie N-terminal von der Core lokalisiert ist. Die Rhomboide besitzen eine katalytische Dyade, die aus einem Serin in der vierten / fünften TMD und einem Histidin in der sechsten / siebten TMD besteht (LEMBERG & FREEMAN 2007).

Funktionell sind die Rhomboid-ähnlichen Peptidasen nicht eingeschränkt, sondern spielen z.B. eine Rolle bei dem „Quorum-Sensing“ (STEVENSON *et al.* 2007), der Invasion des Wirtes (BAKER *et al.* 2006, SINGH *et al.* 2007), der Regulation des EGF-Signalwegs (URBAN *et al.* 2001, URBAN *et al.* 2002), der mitochondrialen Fusion (HERLAN *et al.* 2003, McQUIBBAN *et al.* 2003) und der Apoptose (CIPOLAT *et al.* 2006, FREZZA *et al.* 2006).



**Abb. 1.5.1 Klassifizierung der Rhomboide**

Die Rhomboide werden in drei Unterfamilien aufgeteilt (Erklärung siehe Text). Die Transmembrandomänen sind grün („Core“) bzw. orange (zusätzliche Transmembrandomäne) dargestellt. Die katalytische Dyade ist durch die mit der gestrichelten Linie verbundenen Aminosäuren S und H gekennzeichnet. Weitere in allen Organismen konservierte Aminosäuren (H, H, N) sind schematisch eingetragen. Im Loop nach der ersten Transmembrandomäne (Sekretase-Typen) ist ein Motiv gekennzeichnet. In den Rhomboiden des PARL-Typs ist ein solches Motiv bislang nicht bekannt (rotes Fragezeichen). Vertreter der drei Rhomboid-Unterfamilien sind rechts von der Grafik aufgelistet. Abb. modifiziert nach LEMBERG & FREEMAN (2007).  
IM: innere Membran; N: N-Terminus; C: C-Terminus.

Die Rhomboide der PARL-Familie sind alle mitochondrial. Die bislang bekanntesten Vertreter sind PARL (presenilin associated rhomboid-like protein) aus *H. sapiens* und *M. musculus* (PELLEGRINI *et al.* 2001, SIK A *et al.* 2004, CIPOLAT *et al.* 2006, FREZZA *et al.* 2006) und Pcp1p (processing of cytochrome *c* peroxidase) aus *S. cerevisiae* (ESSER *et al.*

2002, HERLAN *et al.* 2003, MCQUIBBAN *et al.* 2003). In Abb. 1.5.2 sind die wichtigsten Vertreter mit ihren bereits bekannten Substraten zusammengefasst.

### Hefe

		Pcp1	
Cytochrome c Peroxidase	iCcp1	→	mCcp1
Dynamin	IMgm1	→	sMgm1

### Mensch

		PARL	
Dynamin	IOpa1	→	sOpa1

#### Abb. 1.5.2 Substrate der mitochondrialen Rhomboide Pcp1p und PARL

In der Tabelle sind die mitochondrialen Rhomboide aus der Hefe *S. cerevisiae* und dem Menschen mit ihren Substraten aufgelistet. Die Proteine sind vor und nach der Prozessierung dargestellt (Erklärung siehe Text).

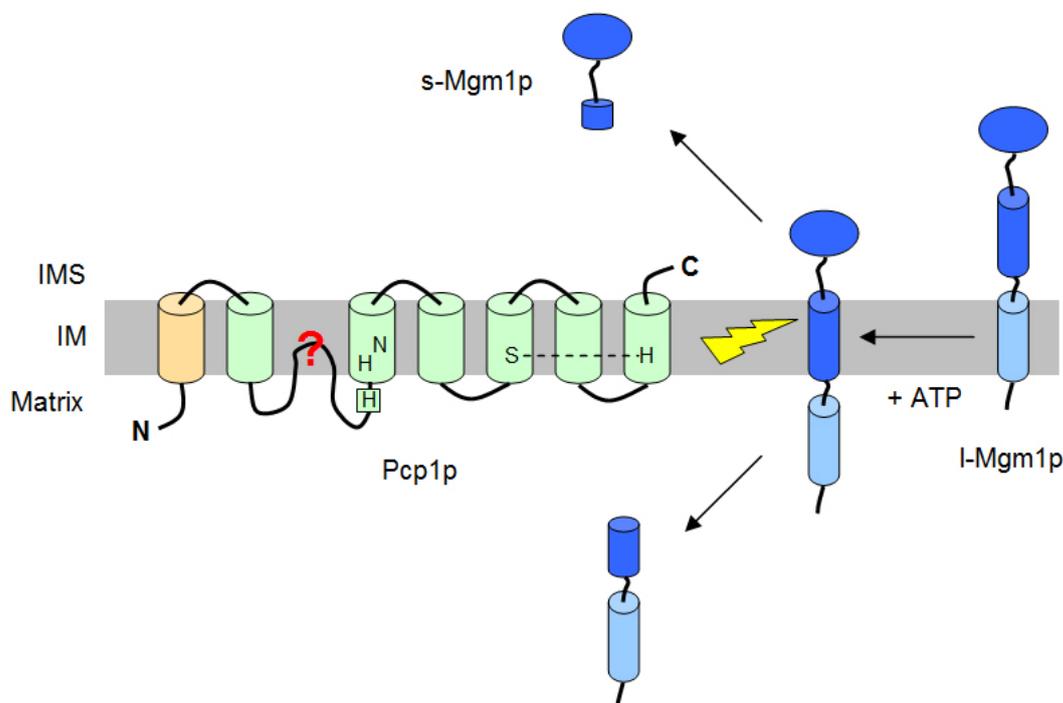
i: intermediäres Protein; m: reifes Protein; l: lange Form des Proteins; s: kurze Form des Proteins

PARL ist an der Prozessierung von Opa1p beteiligt und dadurch in die Regulierung der Apoptose involviert. Die Abwesenheit von PARL führt zu einer Umstrukturierung der Cristae, die eine verstärkte Cytochrom c-Freisetzung in den Intermembranraum zur Folge hat. PARL spaltet die membrangebundene lange Form von Opa1p (IOpa1) zur löslichen kurzen Form (sOpa1). Beide Formen sind für die Struktur der Cristae notwendig (CIPOLAT *et al.* 2004, CIPOLAT *et al.* 2006, FREZZA *et al.* 2006).

Pcp1p ist kernkodiert und in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert. Das Protein ist an der Reifung der Cytochrom c Peroxidase (Ccp1p) beteiligt (siehe Abb. 1.4.1). Ccp1p ist ein lösliches Hämprotein und im Intermembranraum lokalisiert. Es spielt eine wichtige Rolle als Fänger von Peroxyden und toxischen Radikalen (REID *et al.* 1984, ESSER *et al.* 2002, KWON *et al.* 2003). Pcp1p katalysiert die Bildung des reifen Proteins durch Abspaltung des zweiten Teils der Signalsequenz. Ein weiteres Substrat von Pcp1p ist Mgm1p (mitochondrial genome maintenance), das an der Fusion der Mitochondrien beteiligt ist. Mgm1p kommt in einer membrangebundenen langen Form (IMgm1p) und

einer löslichen kurzen Form (sMgm1p) vor, die beide für die Fusionierung der Mitochondrien notwendig sind. Pcp1p übernimmt den Prozessierungsschritt von der langen zur kurzen Form des Proteins (siehe Abb. 1.5.3) (HERLAN *et al.* 2003, MCQUIBBAN *et al.* 2003).

Der Phänotyp der *pcp1*-Deletions-Mutante zeichnet sich durch fragmentierte, kurze, tubuläre Mitochondrien aus. Als sekundärer Effekt tritt ein Verlust der mtDNA auf (HERLAN *et al.* 2003, WONG *et al.* 2003). Außerdem kommt es zu einer Anhäufung des Ccp1-Intermediats (ESSER *et al.* 2002).



**Abb. 1.5.3 Modell der Prozessierung von Mgm1p durch Pcp1p**

Die lange Form von Mgm1p (I-Mgm1p) ist mit einer Transmembrandomäne (hellblau) in die innere Membran (IM) integriert. Das Protein wird ATP-getrieben weiter in die Membran gezogen, so dass die zweite Transmembrandomäne (dunkelblau) in der IM lokalisiert ist. Das Rhomboid Pcp1p kann nun innerhalb dieser Membrandomäne sein Substrat proteolytisch spalten, so dass die lösliche kurze Form (s-Mgm1p) in den Intermembranraum (IMS) entlassen wird.

## 1.6 Zielsetzung

Die Genexpression umfasst die einzelnen Schritte vom Gen bis zum reifen Protein. Diese Prozesse werden in der Zelle je nach Bedarf reguliert. Die Regulierungen finden auf verschiedenen Ebenen statt und können die Transkription des Genes, Lebensdauer des Transkripts, Translation, Stabilität des Proteins und Modifikationen zur Steuerung der Aktivität betreffen. Über die Regulierung von Rhomboiden ist bislang sehr wenig bekannt. In dieser Arbeit sollten Teile der Genregulierung von *PCP1* betrachtet werden. MCQUIBBAN *et al.* (2003) beschreiben, dass die Expression von Pcp1p runter reguliert wird, nachdem die Hefezellen die logarithmische Wachstumsphase verlassen. Daher sollte das Transkript von *PCP1* in Abhängigkeit der Wachstumsphasen untersucht und mit den Ergebnissen auf Proteinebene verglichen werden. Da die Cytochrome c Peroxidase ein Substrat von Pcp1p ist (siehe 1.5), sollte geklärt werden, ob die Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress die Expression beeinflusst. Bei der Regulierung von Enzymen spielen Modifikationen des Proteins durch Phosphorylierung oder Glycosylierung eine wichtige Rolle und sollten für Pcp1p untersucht werden.

Die Rhomboid-Protease Pcp1p ist kernkodiert und wird in die Mitochondrien importiert. Hinweise auf die Prozessierung des Proteins kamen von STEINMETZ *et al.* (2002) und wurden von MICHAELIS *et al.* (2005) bestätigt. In dieser Arbeit sollten durch den immunologischen Nachweis von Pcp1p in Hefemutanten die daran beteiligten Peptidasen identifiziert werden. Da Pcp1p selbst eine Signalpeptidase ist, kann auch eine mögliche autokatalytische Prozessierung nicht ausgeschlossen werden. Zur Überprüfung sollte die Expression inaktiver Pcp1-Proteine in der *pcp1*-Deletionsmutante dienen.

Häufig bestehen Peptidasen wie z.B. die m-AAA-Protease aus mehreren Untereinheiten (siehe 1.4). Im Rahmen dieser Arbeit sollte geklärt werden, ob die Protease Pcp1 ebenfalls einen Komplex in der inneren mitochondrialen Membran bildet und wie sich dieser Komplex zusammensetzt. Hauptsächlich sollte dafür die Blue Native-PAGE eingesetzt werden, eine Methode, bei der Komplexe zunächst unter nativen Bedingungen der Größe nach aufgetrennt werden bevor sie in einer zweiten Dimension (SDS-PAGE) in ihre Untereinheiten zerlegt werden.

Wenn die Protease Pcp1p in der Mutante deletiert ist, kann durch die Expression von PARL der Wildtyp-Phänotyp wieder hergestellt werden (MCQUIBBAN *et al.*, 2003). Es sollte

untersucht werden, ob in *E. coli* exprimiertes Pcp1p aufgrund seiner Sequenz- und Strukturhomologien in die Bakterienmembran integriert wird.

## 2. Material und Methoden

In diesem Kapitel werden die für diese Arbeit verwendeten Geräte, Materialien und Methoden aufgeführt und beschrieben.

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Geräte und Materialien

Verwendete Geräte:

Gerät:	Typ:	Hersteller:
Autoklav	Fabriknr. 76884, 1982	Webecke & Co., Bad Schwartau
Blotapparatur	Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad, München
	TurboBlotter™	Schleicher & Schuell, Keene, NH 03431
Brutschrank	B 5060 (28°C)	Heraeus, Hanau
Elektrophoresekammer	Protean II	Bio-Rad, München
		CTI GmbH, Idstein / Taunus
		Renner GmbH, Dannstadt
Entwicklermaschine	Compact 2 X-Ray Film Processor, Mod. 1190-1-0000	WELABO, Düsseldorf
		Protec Medizintechnik GmbH & Co. KG, Oberstenfeld
Feinwaage	1219 MP	Sartorius, Göttingen

Gerät:	Typ:	Hersteller:
French Press		American Instrument Company, Silverspring, MD, USA
French Press-Zelle	Aminco (Cat. No. 4-3399)	American Instrument Company, Silverspring, MD, USA
Gradientenmischer	36 ml	Hölzel, H., Dorfen-München
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
	Thermostat 5320	Eppendorf, Hamburg
Heizschüttler		Infors, Bottmingen (Schweiz)
Horizontalschüttler	Swip KM-2	Edmund Bühler, Hechingen
Mikrowelle	R-3V 10 (B)	Sharp Corporation, Hamburg
pH-Meter	CG 801	Schott, Mainz
Photometer	Ultraspec 2000	Pharmacia Biotech, Cambridge (Großbritannien)
	UV-120-02	Shimadzu, Kyoto (Japan)
Powersupply	Power Pac 300	Bio-Rad, München
	2297 Macodrive 5	Pharmacia LKB, Uppsala (Schweden)
Thermoschüttelschrank	(36°C)	Gesellschaft für Labortechnik mbH GFL, Burgwedel
Zentrifuge	Biofuge 17 RS	Heraeus Sepatech, Osterode
	Rotor 1387 (20x2 ml)	Heraeus Sepatech, Osterode

Gerät:	Typ:	Hersteller:
	J2-21 Centrifuge	Beckman, München
	Rotor JA-20 (8x50 ml)	Beckman, München
	Rotor JS-7.5 (4x250 ml)	Beckman, München

### Verwendete Gebrauchsartikel:

Gebrauchsartikel:	Bezeichnung:	Hersteller:
Glasflaschen und -kolben	Serie Duran, div. Größen	Schott, Mainz
Glasküvette	Optisches Spezialglas, 10.0 mm Schichttiefe	Hellma, Müllheim
Glasperlen	0,45-0,50 mm	Braun, Melsungen
Messzylinder	div. Größen (10-2000 ml)	Brand, Wertheim; Hecht-Assistent, Sondheim; Hirschmann, Eberstadt

### Verwendete Verbrauchsartikel:

Verbrauchsartikel:	Bezeichnung:	Hersteller:
3 MM-Papier		Whatman, Maidstone (Großbritannien)
Nitrocellulose-Membran	Protan Nitrocellulose Transfer Membran 0,45 µm, BA 85	Schleicher & Schuell, Dassel
Nylon-Membran	Pall Biodyne™ Transfermembrane 0,2 µm, A	Pall Bio Support Division, Glen Cove, NY 11542
Röntgenfilm	Fujifilm Super RX 100NIF 18x24 cm	Fuji Photo Film Co., Ltd., Tokyo (Japan)
Sterilfilter	Minisart Sterilfilter 0,45 µm	Sartorius, Göttingen

## 2.1.2 Chemikalien und Enzyme

Feinchemikalien in p.a.-Qualität wurden bezogen von:

Fluka, Buchs (Schweiz)  
Gibco BRL, Eggenstein  
Merck, Darmstadt  
Pierce, Rockford, IL 61105  
Roth, Karlsruhe  
Sigma, München  
Sucofin, Zeven (Magermilchpulver)

Kulturmedien wurden bezogen von:

Difco, Detroit (USA)  
Gibco BRL, Eggenstein  
Serva, Heidelberg

Enzyme wurden bezogen von:

Gibco BRL, Eggenstein  
Life Technologies, Eggenstein  
MBI Fermentas, St. Leon-Roth  
Pharmacia Biotech, Freiburg  
Promega, Mannheim  
Qiagen, Hilden  
Roche, Mannheim

Das verwendete Wasser (H<sub>2</sub>O) wurde durch eine Milli-Q-Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) gereinigt.

## 2.1.3 Stämme

### 2.1.3.1 *Escherichia coli*

Stamm:	Genotyp:	Referenz:
Rosetta™(DE3)	$F^-ompT hsdS_B(r_B^-m_B^-) gal dcm$ (DE3) pRARE <sup>6</sup> (Cam <sup>R</sup> )	Novagen
XL1-Blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17</i> <i>supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB</i> <i>lacI<sup>q</sup>ZΔM15 Tn10(Tet')</i> ] <sup>c</sup>	BULLOCK <i>et al.</i> (1987)

### 2.1.3.2 *Saccharomyces cerevisiae*

Die Mutantenstämme sind nach dem systematischen Gennamen sortiert (siehe Genotyp).

Stamm:	Genotyp:	Referenz / Herkunft:
<b>Wildtypenstämme:</b>		
BY4741	MAT $\alpha$ ; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0	EUROSCARF
BY4742	MAT $\alpha$ ; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0	EUROSCARF
<b>Mutantenstämme:</b>		
BY4741/Δ <i>pim1</i>	MAT $\alpha$ ; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YBL022c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/Δ <i>cor1</i>	MAT $\alpha$ ; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; YBL045c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/Δ <i>ybr163w</i>	MAT $\alpha$ ; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; YBR163w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
FSEA012-07A (AL)/Δ <i>ybr074w</i>	MAT $\alpha$ ; ura3-52; HIS3; leu2Δ1; LYS2; trp1Δ63; YBR074w(4, 1187):: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF

Stamm:	Genotyp:	Referenz / Herkunft:
FSRE009-01B(A) $\Delta$ <i>mba1</i>	FY; MAT $\alpha$ ; <i>ura3-52</i> ; HIS3; <i>leu2</i> $\Delta$ 1; LYS2; <i>trp1</i> $\Delta$ 63; YBR185c(4, 754):: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>ybr238c</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>lys2</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YBR238c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ycl004c</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YCL004c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>prd1</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>lys2</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YCL057w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>qri7</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YDL104c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
FARK002-13C(A) $\Delta$ <i>rad61</i>	MAT $\alpha$ ; <i>ura3-52</i> ; HIS3; <i>leu2</i> $\Delta$ 1; LYS2; TRP1; YDR014w(4, 1941):: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ydr065w</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YDR065w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ydr332w</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YDR332w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>bcs1</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>lys2</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YDR375c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>pdr15</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YDR406w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>mop112</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>lys2</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YDR430c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>yta10-5A</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YER017c:: <i>kanMX4</i>	K.H. Esser & E. Pratje
BY4741/ $\Delta$ <i>yer077c</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YER077c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>yer078c</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YER078c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>yfr006w</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>lys2</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YFR006w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>qcr6</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YFR033c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>dug1</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>lys2</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YFR044c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ygl057c</i>	MAT $\alpha$ ; <i>his3</i> $\Delta$ 1; <i>leu2</i> $\Delta$ 0; <i>met15</i> $\Delta$ 0; <i>ura3</i> $\Delta$ 0; YGL057c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF

Stamm:	Genotyp:	Referenz / Herkunft:
BY4742/ $\Delta$ <i>rmd9</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGL107c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>msp1</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGR028w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>pcp1</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGR101w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>pcp1</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGR101w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ygr102c</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGR102c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ygr150c</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGR150c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>yta7</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YGR270w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
MY228/ <i>mas2</i> <sup>ts</sup>	his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0, YHR024c <sup>ts</sup>	YAFFE <i>et al.</i> , 1985
BY4742/ $\Delta$ <i>yhr113w</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YHR113w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>ykl100c</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YKL100c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
FYBL1-8B/Ai14323/ $\Delta$ <i>mip1</i>	MAT $\alpha$ ; ura3- $\Delta$ 851; leu2 $\Delta$ 1; his3 $\Delta$ 200; lys2 $\Delta$ 202; YKL134c:: <i>KANMX</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>mcr1</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YKL150w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>accp1</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YKR066c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>oma1</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YKR087c:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
FWMY005-04A(AL)/ $\Delta$ <i>yll029w</i>	MAT $\alpha$ ; ura3-52; his3 $\Delta$ 200; leu2 $\Delta$ 1; LYS2; trp1 $\Delta$ 63; YLL029w(21, 2238):: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ylr091w</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YLR091w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
MY111/ <i>mas1</i> <sup>ts</sup>	ade $\Delta$ 0, his3 $\Delta$ 1; ura3 $\Delta$ 0, YLR163c <sup>ts</sup>	YAFFE <i>et al.</i> , 1985
BY4741/ $\Delta$ <i>ylr204w</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YLR204w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ecm38</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YLR299w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF

Stamm:	Genotyp:	Referenz / Herkunft:
BY4741/ $\Delta$ <i>ylr368w</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YLR368w::kanMX4	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ste23</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YLR389c::kanMX4	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>yml030w</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YML030w::kanMX4	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>cyb2</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YML054c::kanMX4	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>imp2</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR035w::kanMX4	J. Hegemann
BY4742/ $\Delta$ <i>yta12</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR089c::kanMX4	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ymr098c</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR098c::kanMX4	EUROSCARF
GM103-4D/ $\Delta$ <i>imp1</i>	MATa; his4 $\Delta$ 0; trp1 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0, YMR150c::LEU2	Pratje
BY4741/ $\Delta$ <i>ymr152w</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR152w::kanMX4	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>rim13</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR154c::kanMX4	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>ymr310c</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YMR310c::kanMX4	EUROSCARF
FHBT011-10B(A)/ $\Delta$ <i>ynl045w</i>	MATa; ura3-52; his3 $\Delta$ 200; leu2 $\Delta$ 1; LYS2; TRP1; YNL045w(1, 2016)::kanMX4	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>lap3</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YNL239w::kanMX4	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ynr018w</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YNR018w::kanMX4	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>ynr020c</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YNR020c::kanMX4	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>yor022c</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YOR022c::kanMX4	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta$ <i>crc1</i>	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YOR100c::kanMX4	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta$ <i>yor305w</i>	MATa; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YOR305w::kanMX4	EUROSCARF

Stamm:	Genotyp:	Referenz / Herkunft:
BY4742/ $\Delta muk1$	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YPL070w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta mrp51$	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YPL118w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4742/ $\Delta yme1$	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; lys2 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YPR024w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF
BY4741/ $\Delta ypr116w$	MAT $\alpha$ ; his3 $\Delta$ 1; leu2 $\Delta$ 0; met15 $\Delta$ 0; ura3 $\Delta$ 0; YPR116w:: <i>kanMX4</i>	EUROSCARF

## 2.1.4 Medien

Soweit nicht anders angegeben, wurden alle Medien und Lösungen mit zweifach destilliertem Wasser angesetzt.

### 2.1.4.1 Medien für *Escherichia coli*

LB-Medium	Bacto Trypton	1%
	Hefe-Extrakt	0,5%
	NaCl	1%
LB-Platten	LB-Medium	
	Agar	1,5%
LB <sub>amp</sub> X-Gal-Platten	LB-Platten	
	Ampicillin *	50 mg/l
	X-Gal *	40 mg (in 2 ml DMF)/l
	IPTG *	48 mg/l

---

SOC-Medium	Hefe-Extrakt	0,5%
	Bacto Trypton	2%
	Glucose	0,39%
	NaCl	0,5 g/l
	KCl	0,19 g/l
	MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	2 g/l
	MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	4,9 g/l

Alle Medien wurden für 20 min bei 120°C sterilisiert. \* Die Zugabe von Ampicillin, X-Gal und IPTG erfolgte erst nach dem Autoklavieren, als das Medium auf ca. ~60°C abgekühlt war.

#### 2.1.4.2 Medien für *Saccharomyces cerevisiae*

YPGc-Medium	Bacto Pepton	1%
	Hefe-Extrakt	1%
	Glucose	2%
	Adenin	100 mg/l
	Threonin	20 mg/l
	Tryptophan	20 mg/l
	Uracil	20 mg/l
YPGc-Platten	YPGc-Medium	
	Agar	2,3%
N3-Puffer	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	17,8 g/l
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	54,4 g/l
	pH 6,2	

N3-Platten	Bacto Pepton	1%
	Hefe-Extrakt	1%
	Glycerin	2%
	N3-Puffer	10%
	Agar	2,3%
W0-Medium	Glucose	2%
	Yeast Nitrogen Base	0,67%
	N3-Puffer	5%
WA-Medium	W0-Medium	
	Adenin	0,001%
	Arginin	0,002%
	Histidin	0,001%
	Isoleucin	0,006%
	Leucin	0,006%
	Lysin	0,004%
	Methionin	0,001%
	Phenylalanin	0,006%
	Threonin	0,005%
	Tryptophan	0,004%
	Tyrosin	0,005%
	Uracil	0,001%
Valin	0,006%	
WA-Platten	WA-Medium	
	Agar	2,3%

Alle Medien wurden für 20 min bei 120°C sterilisiert. Um eine Braunfärbung der Medien durch Karamellisierung zu vermeiden, wurde die Glucose getrennt von den restlichen Medien-Bestandteilen sterilisiert und erst nach dem Autoklavieren den Lösungen zugegeben. Die steril filtrierte Aminosäuren wurden ebenfalls erst nach dem

Autoklavieren zugegeben. Zur Herstellung der WA-Selektionsmedien wurden die entsprechenden Aminosäuren dem WA-Medium bzw. den -Platten nicht beigefügt.

## 2.1.5 Plasmide

### 2.1.5.1 *Escherichia coli* Plasmide

Bezeichnung:	Resistenz gegen:	Referenz / Herkunft:	Abbildung:
pET-30a(+)	Kanamycin	Novagen	Anhang IV
pGEM-3Zf(+)- <i>PCP1-2,5myc</i>	Ampicillin	Pratje	
pUC4-E1 $\alpha$ 10	Ampicillin	STEENSMA <i>et al.</i> 1990	

### 2.1.5.2 *Saccharomyces cerevisiae* Plasmide

Bezeichnung:	Resistenz gegen:	Selektionsgen:	Referenz / Herkunft:	Abbildung:
YCplac111	Ampicillin	<i>LEU2</i>	GIETZ & SUGINO 1998	Anhang II
YEpl352	Ampicillin	<i>URA3</i>	HILL <i>et al.</i> 1986	Anhang III

## 2.1.6 Oligonukleotid-Primer

Bezeichnung:	Sequenz:
<b>Deletion der Transmembrandomänen (siehe Anhang III):</b>	
5YGR101wNP	GTCCTGCAGTATTGAATTTGAAGCATG
3YGR101wPS	TGTGTCGACTTTTAAGTGATTAACCC

Bezeichnung:	Sequenz:
3PCP1kuS	GTTTgTCGACAGCTTAACTTATATA
3K1R	CAGAGGATTGCC
5K1F	CCTTATTTGTTTCGAGCA
3K2R	CTTTGGATGCGTCTTA
5K2F	AGGTTTCTACAGAAGTACA
3K3R	G TTCATACCTAAGTGC
5K3F	ATGAATAGTGCCATTGCA
3K4R	GGCTAGGCGT
5K4F	TTCCCACACGCTAA
3K5R	AATTTTAGCGTGTGGGA
5K5F	AGATGGGGGTCAT
3K6R	TGACCCCCATCTTA
5K6F	AGTAAAGCTGTAGAGAAAC
K45F	CCAGATGGGGGTCATT
K45R	CTAGGCGTGCCAGTT
<b>Autokatalyse / Punktmutationen (siehe Anhang II):</b>	
3-H193A	gCTGAAAACGCACTTCCGAT
5-H193A	GCAAGAATTCTGGCACTTAGGT
3-S256i	TTGCACCCAAGCTAGGTC
5-S256i	TGGAGCGCTATTTGGGGT
5GR-H313Q	CTGCGcAATTGGGTGGCTCT
3GR-H313Q	AGCCACCCAATTGCGCAGCG
<b>Expression (siehe Anhang IV):</b>	
mHis	CTTGTCGTCGTCGT
oHis	TGTATATCTCCTTCTTAAAGT
PCP1	ATGTCAGGTGTAAGCT

Von den Originalsequenzen abweichende Nucleotide sowie Schnittstellen sind in den Primern durch Kapitälchen kenntlich gemacht.

### 2.1.7 Antikörper

Bezeichnung:	Ursprungsorganismus:	Verdünnung:	Herkunft / Hersteller:
<b>primäre Antikörper:</b>			
Anti-Ccp1	Kaninchen, polyklonal	1:1000	Schatz, Basel
Anti-Pcp1	Kaninchen, polyklonal	1:5000	Langer, Köln
<b>sekundäre Antikörper (mit HRP konjugiert):</b>			
Anti-Kaninchen	Ziege	1:5000	Sigma

## 2.2 Methoden

Sofern nicht anders angegeben, wurden alle im Methodenteil beschriebenen Zentrifugierungen bei 4°C durchgeführt. Die Bezeichnung H<sub>2</sub>O bezieht sich auf zweifach destilliertes Wasser, das durch die Millipore-Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) gewonnen wurde.

Um Lösungen oder Glasware zu sterilisieren, wurden sie entweder für 20 min bei 120°C autoklaviert oder steril filtriert.

Bei den Arbeiten mit RNA wurden die Lösungen soweit möglich mit 0,1% DEPC angesetzt, über Nacht inkubiert und anschließend autoklaviert. Zum Ansetzen von Lösungen, die nicht autoklaviert werden dürfen, oder für Verdünnungen wurde DEPC-behandeltes H<sub>2</sub>O verwendet. Die für die Versuche eingesetzte Glasware und weitere Materialien wurden bei 180°C für 3 h gebacken oder mindestens autoklaviert (sofern möglich), um RNasen zu deaktivieren oder eine Kontamination damit zu vermeiden.

## 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

### 2.2.1.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch durchgeführt. Der Wert  $OD_{260} = 1.0$  entspricht  $\sim 50 \mu\text{g/ml}$  doppelsträngiger DNA bzw.  $\sim 40 \mu\text{g/ml}$  einzelsträngiger DNA oder RNA (SAMBROOK & RUSSELL 2001). Für die Messungen wurde die RNA- oder DNA-Lösung in RNase- und Nuclease-freiem Wasser verdünnt.

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

#### 2.2.1.2.1 Schnell-Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Zellen von 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert und in 350  $\mu\text{l}$  Lysiermedium (8% Sucrose, 0,5% Triton X-100, 50 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0) resuspendiert. Nach der Zugabe von 25  $\mu\text{l}$  Lysozym (10 mg/ml in 10 mM Tris-HCl pH 8,0) wurde der Ansatz gut gemischt und 40 s bei 100°C inkubiert. Die Zellreste wurden sedimentiert (10 min / 10.700xg / RT) und mit einem Zahnstocher entfernt.

Durch Zugabe von 180  $\mu\text{l}$  7,5 M Ammoniumacetat und 1 ml 96% Ethanol wurde die Plasmid-DNA für 30 min bei -20°C ausgefällt und sedimentiert (10 min / 17.400xg). Der Niederschlag wurde erneut gefällt (siehe 2.2.1.6.1) (SAMBROOK & RUSSELL 2001).

#### 2.2.1.2.2 Alkalische Lyse zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Zellen von 1,5 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert und in 100  $\mu\text{l}$  Lösung 1 (50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0) resuspendiert. Nach der Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) wurde der Ansatz durch vorsichtiges Invertieren gemischt und 1 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 150  $\mu\text{l}$  Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, 12% Eisessig) zugegeben und der Ansatz ebenfalls durch mehrfaches Invertieren gemischt. Nachdem der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert worden war, wurden die Zelltrümmer sedimentiert (10 min / 17.400xg) und der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt (BIRNBOIM & DOLY 1979, modifiziert nach ISH-HOROWICZ *et al.*, persönliche Kommunikation). Es folgt eine Fällung der Plasmid-DNA (siehe 2.2.1.6.2).

### 2.2.1.3 Isolierung von genomischer DNA aus *S. cerevisiae*

Die Zellen von 7,5 ml einer Übernachtskultur wurden sedimentiert und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 0,5 ml 1 M Sorbitol resuspendiert. Nach der Zugabe von 5,2 µl Zymolyase (12,5 mg/ml) wurde der Ansatz 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und in 0,3 ml 3x TE, pH 7,4 (10x TE = 100 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH7,4) resuspendiert. Nach der Zugabe von 50 µl 10% SDS wurde der Ansatz zehnmal invertiert und 20 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 400 µl 5 M Kaliumacetat zugegeben und der Ansatz wie zuvor invertiert und 30 min auf Eis inkubiert. Die Zellreste wurden sedimentiert (5 min / 10.700xg / RT) und 750 µl des Überstandes mit 750 µl Isopropanol in einem frischen Reaktionsgefäß durch Invertieren gemischt. Die ausgefallene DNA wurde sedimentiert (10 s / 17.400xg) und ca. 20-30 min an der Luft getrocknet. Der Niederschlag wurde in 300 µl 1x TE-Puffer gelöst (LEE 1992).

Zum Abbau der RNA wurde RNase bis zu einer Endkonzentration von 50 µg/ml zugegeben und der Ansatz 20 min bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde durch eine Phenolextraktion (siehe 2.2.1.5) aufgereinigt und die DNA gefällt (siehe 2.2.1.6.1).

### 2.2.1.4 DNA-Amplifizierung durch Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Amplifizierung der DNA erfolgte nach Standardmethoden (SAMBROOK & RUSSELL 2001). Ein 100 µl PCR-Ansatz enthielt 10 µl PCR-Puffer (100 mM Tris-HCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 500 mM KCl; pH 8,3), 50 µM dNTP's, 20 pMol Forward-Primer, 20 pMol Reverse-Primer, 2 Einheiten Taq-Polymerase und 1 µg Hefe-Gesamt-DNA bzw. 100 ng Plasmid-DNA. Der Ansatz wurde mit 50 µl Parafinöl überschichtet.

Die Denaturierung erfolgte bei 96°C für 30 s. Die Hybridisierung der Primer erfolgte für 30 s, die Temperatur richtete sich dabei nach dem GC-Gehalt der Primer. Die Elongation erfolgte bei 72°C für 1 min / kb mit einer abschließenden Dauer von 2 min zur vollständigen Strangsynthese. Die Zahl der Zyklen betrug 30.

### 2.2.1.5 Phenolextraktion von DNA

Die DNA-Lösung wurde 1:1 mit Phenol (gesättigt mit TE-Puffer, pH 8,0 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Zur Phasentrennung wurden der Ansatz zentrifugiert (5 min / 10.700xg / RT). Die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zu gleichen Teilen mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1, mit TE, pH 8,0 gesättigt) gemischt und anschließend unter gleichen Bedingungen inkubiert und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wieder in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zu gleichen Teilen mit Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) überschichtet und unter den gleichen Bedingungen erneut inkubiert und zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde wieder in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die DNA mit einer Ethanol-fällung (siehe 2.2.1.6.1) weiter aufgereinigt (SAMBROOK & RUSSELL 2001).

### 2.2.1.6 DNA-Fällung

#### 2.2.1.6.1 Ethanol-fällung

Zu einem Teil DNA-Lösung wurden 1/10 Teil 3 M Natriumacetat und 2,5 Teile 96% Ethanol gegeben. Die DNA wurde für 30 min bei -20°C gefällt und sedimentiert (30 min / 17.400xg). Der Niederschlag wurde zweimal mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) gelöst (SAMBROOK & RUSSELL 2001).

#### 2.2.1.6.2 Isopropanol-fällung

Isopropanol (RT) und DNA-Lösung wurden 1:1 gemischt. Das Präzipitat wurde sedimentiert (30 min / 10.700xg / RT) und mit 70% Ethanol gewaschen. Die DNA wurde

nach dem Trocknen in H<sub>2</sub>O oder TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 8,0) gelöst (SAMBROOK & RUSSELL 2001).

### 2.2.1.7 DNA-Restriktion

Die Restriktion von Plasmid-DNA oder DNA-Fragmenten wurde mit Restriktionsenzymen der Firma Fermentas, St. Leon-Rot entsprechend der Herstellerangaben durchgeführt.

### 2.2.1.8 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten

Nach SAMBROOK & RUSSELL (2001) wurde Agarose in einer Endkonzentration von 0,8-1,5% in TBE-Puffer (90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA; ~ pH 8.0) geschmolzen und in eine entsprechenden Gelapparatur gegossen. Nach dem Erhärten wurde das Gel mit TBE-Puffer überschichtet und Ethidiumbromid (Endkonzentration: 50 µg / 100 ml) in den Puffer gegeben. Die aufzutrennende DNA wurde in 10 µl aufgenommen bzw. aufgefüllt und mit 1 µl Farbmaler (30% Ficoll, 5 mM EDTA, 0,1% SDS, 0,05% Bromphenolblau, 0,05% Xylencyanol; pH 8,0) gemischt. Die DNA-Proben sowie ein DNA-Standard wurden in die Taschen des Agarosegels gefüllt und die Gelelektrophorese bei 80 V und RT durchgeführt. Nach Beendigung des Gellaufs wurde die DNA durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit der Geldokumentationsanlage Gene Genius Bio Imaging System und der Software Gensnap Vers. 6.00.21 von Syngene, Cambridge GB dokumentiert.

### 2.2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die DNA-Fragmente wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem Kit JETsorb (Genomed, Löhne) aufgereinigt. Die Elutierung der DNA erfolgte in 15-20  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$ .

### 2.2.1.10 Ligation von DNA

Für die Ligation mehrerer DNA-Fragmente wurde die T4 DNA Ligase von Fermentas, St. Leon-Rot verwendet und entsprechend der Angaben des Herstellers eingesetzt. Die Ligation wurde entweder über Nacht bei 16°C oder für 1 h bei 22°C durchgeführt.

### 2.2.1.11 Präparation transformationskompetenter Zellen von *E. coli*

Von einer auf LB-Medium angezogenen *E. coli*-Kultur wurden 10-12 Kolonien in 250 ml SOC-Medium bis zu einer Dichte von  $\text{OD}_{600} = 0,6-0,75$  wachsen gelassen. Die Kultur wurde 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden sedimentiert (10 min / 2.500xg) und in 80 ml eiskaltem TB-Puffer (10 mM HEPES, pH 6.7, 55 mM  $\text{MnCl}_2$ , 15 mM  $\text{CaCl}_2$ , 250 mM KCl) resuspendiert. Die Zellsuspension wurde erneut wie oben beschrieben inkubiert und zentrifugiert. Die Zellen wurden vorsichtig in 20 ml TB-Puffer resuspendiert. Unter leichtem Rühren wurde DMSO bis zu einer Endkonzentration von 7% hinzugefügt und der Ansatz 10 min auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden zu je 200  $\mu\text{l}$  in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -70°C eingefroren (INOUE *et al.* 1990).

### 2.2.1.12 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA

Ein Reaktionsgefäß mit kompetenten *E. coli*-Zellen (siehe 2.2.1.11) wurde bei RT aufgetaut. Nach der Zugabe von 10 pg – 10 ng DNA wurde der Ansatz für 30 min auf Eis

inkubiert. Es erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C. Danach wurde der Ansatz auf Eis transferiert. Dem Ansatz wurde 800 µl LB-Medium zugegeben und 1 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Selektiv-Platten (Antibiotika-haltig) ausplattiert (INOUE *et al.* 1990).

#### 2.2.1.13 Transformation von *S. cerevisiae* mit Plasmid-DNA

Die Transformation von *S. cerevisiae* wurde modifiziert nach GIETZ *et al.* (1992) durchgeführt. Mit einer Übernachtskultur wurde frisches YPGc-Medium (~20 ml) angeimpft und auf eine Zelldichte von  $1 \times 10^7$  Zellen / ml ( $\sim OD_{600} = 0,6$ ) angezogen. Die Hefezellen wurden abzentrifugiert (5 min / 4.400xg) und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Zellsediment wurde anschließend mit LiAc-TE-Puffer (100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 7,5 mit Essigsäure einstellen) gewaschen. Nachdem die Zellen in 100 µl LiAc-TE-Puffer resuspendiert worden sind, wurde dem Ansatz 5 µl Heringsspermien-DNA (20 mg/ml) beigemischt. Der Ansatz wurde zu je 50 µl auf Reaktionsgefäße (1,5 ml) verteilt und nach der Zugabe von 5 µl Plasmid-DNA (Kontrolle ohne Plasmid-DNA) und 300 µl PEG 4000 (40% Polyethylenglykol 4000 in LiAc-TE-Puffer) 30 min bei 30°C inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 15 min bei 42°C. Die Zellen wurden sedimentiert und mit TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA; pH 7,5) gewaschen. Die Zellen wurden in TE-Puffer aufgenommen und auf selektivem Medium ausplattiert.

#### 2.2.1.14 Klonierungsstrategien

Für das Konstrukt YEp352-PCP1 wurde das PCP1-Gen inklusive des Promotors mit den Primern 5YGR101wNP und 3YGR101wPS amplifiziert. Dabei wurde im 5'-Bereich eine PstI- und im 3'-Bereich eine Sall-Schnittstelle eingefügt. Das amplifizierte Gen wurde dann über diese Restriktionsstellen in das Hefe-Plasmid YEp-352 eingefügt. Eine verkürzte Variante des PCP1-Gens wurde mit den Primern 5YGR101wNP und 3PCP1kuS erstellt. Das amplifizierte Fragment wurde ebenfalls über die Schnittstellen PstI und Sall kloniert. Die Konstrukte sind im Anhang III dargestellt.

Die weiteren in dieser Arbeit verwendeten Konstrukte wurden entweder von Prof. Dr. rer. nat. Elke Pratje zu Verfügung gestellt oder bei DNA Cloning Service (Inhaber Dr. Hermann Schmidt) mit bekannten Methoden kloniert. Die Konstrukte sind ebenfalls im Anhang dargestellt (siehe Anhang II-IV).

### 2.2.1.15 Isolierung von RNA aus *S. cerevisiae*

Die Hefezellen einer Übernachtskultur wurden sedimentiert (5 min / 4.600xg) und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Die Zellen (2-4 g) wurden in 2,5 ml Na-Acetat-Puffer (50 mM Natriumacetat, 10 mM EDTA; pH 5,0) aufgenommen und mit 250 µl 10% SDS gemischt. Es wurden 3 ml Phenol (65°C; 1:1 mit Na-Acetat-Puffer gesättigt) zugegeben und der Ansatz bei maximaler Geschwindigkeit für 4 min bei 65°C im Wasserbad geschüttelt. Der Ansatz wurde auf RT abgekühlt und die Phasen durch Zentrifugieren getrennt (10 min / 3.000xg / RT). Die organische Phase wurde entfernt und die wässrige Phase erneut mit Phenol extrahiert. Die wässrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und nach der Zugabe von 3 ml Chloropan (50% Phenol, 0,5% 8-Hydroxy-Chinolin, 50% Chloroform, 1:1 gesättigt mit ANE-Puffer (10 mM Na-Acetat, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, pH 6,0)) 2 min auf höchster Stufe gevortext. Nach der Zentrifugierung (10 min / 3.000xg / RT) wurde die wässrige Phase in einem neuen Zentrifugenröhrchen mit 3 ml Chloroform-Isoamylalkohol (24:1) durch Invertieren gemischt und die Phasen erneut getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen überführt und die RNA mit 1/10 Vol 3 M Natrium-Acetat und 3 Vol Ethanol p.A. bei -20°C min. 1 h gefällt. Die präzipitierte RNA wurde sedimentiert (20 min / 27.200xg) und in 600 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gelöst. Die RNA-Lösung wurde in 300µl-Aliquots in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt und mit 1/10 Vol 3 M Natriumacetat (pH 5,3) und 3 Vol Ethanol absolut 30 min bei -70°C gefällt. Die RNA wurde sedimentiert (20 min / 17.400xg) und zweimal mit 70% Ethanol<sub>DEPC</sub> gewaschen. Nach dem Trocknen des RNA-Sediments wurden bis zu 100 µl H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> zugegeben und der Ansatz 5 min bei 50°C inkubiert und erneut zentrifugiert (20 min / 17.400xg). Die Überstände wurden in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß vereinigt und die Konzentration photometrisch bestimmt (siehe 2.2.1.1.). Die RNA-Lösung wurde bei -20°C gelagert (modifiziert nach KÖHRER K & DOMDEY H, 1994).

### 2.2.1.16 Agarosegelelektrophorese zur Auftrennung von RNA

Agarose wurde in einer Endkonzentration von 1,5% in 1xMEN-Puffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA; pH 7,0) geschmolzen. Vor dem Gießen des Gels wurden 2% v/v Formaldehyd, 37% zugegeben. Nach dem Erhärten wurde das Gel in Laufpuffer (20 mM MOPS, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA; pH 7,0, 2% v/v Formaldehyd, 37% ) äquilibriert.

In 10 µl Probenansatz wurden 100 ng Gesamt-RNA bzw. RNA-Marker (siehe Herstellerangaben) mit 2 µl Probenpuffer (1,6 µl Bromphenolblau, 8 µl 0,5 M EDTA, pH 7,4, 20 µl Ethidiumbromid (5 mg / ml), 72 µl 37% Formaldehyd, 200 µl Glycerin, 308 µl Formamid (entionisiert), 400 µl 10xMEN-Puffer) gemischt und 10 min bei 65°C inkubiert. Die Proben wurden bis zum Auftrag auf Eis gelagert. Die Gelelektrophorese wurde bei 80 V und RT durchgeführt. Nach Beendigung des Gellaufs wurde die RNA durch UV-Licht sichtbar gemacht und mit der Geldokumentationsanlage Gene Genius Bio Imaging System und der Software Genesnap Vers. 6.00.21 von Syngene, Cambridge GB dokumentiert (ROCHE, 2000).

### 2.2.1.17 Herstellung von DIG-markierten RNA-Sonden

Die DIG-markierten RNA-Sonden wurden mit dem Kit „RNA Labeling Kit (SP6/T7)“ (Cat.No. 1175025) von Roche Diagnostics, Mannheim nach den Angaben des Handbuches hergestellt. Dabei wurden sowohl eine markierte RNA-Sonde als auch eine nicht-markierte Kontroll-RNA generiert. Die Lösungen, die für die Herstellung der RNA-Sonden verwendet wurden, waren RNase-frei.

### 2.2.1.18 Herstellung von DIG-markierten DNA-Sonden

Die DIG-markierten DNA-Sonden wurden mit dem Kit „DNA Labeling and Detection Kit Nonradioactive“ (Best.Nr. 1093657) von Boehringer Mannheim, Mannheim nach den

Angaben des Handbuches hergestellt. Die DNA, die für die Reaktion eingesetzt wurde, war in H<sub>2</sub>O gelöst.

#### 2.2.1.19 RNA-Transfer auf Nylonmembranen (Northern Blot)

Das Agarosegel mit der elektrophoretisch aufgetrennten RNA (siehe 2.2.1.16) wurde nach der Dokumentation kurz mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub> gespült. Anschließend wurde es erst 10 min mit H<sub>2</sub>O<sub>DEPC</sub>, dann 50 mM NaOH und abschließend 10xSSC (1,5 M NaCl, 150 mM Natriumcitrat, pH7,0) gewaschen. Der RNA-Transfer wurde über Nacht bei RT mit dem Turbo-Blotter von Schleicher & Schuell, Dassel durchgeführt. Der Aufbau fand nach den Angaben des Herstellers statt. Für den Transfer wurde eine Nylonmembran (siehe 2.1.1) verwendet. Als Transferpuffer wurde 10xSSC eingesetzt.

Nach dem Transfer wurde die Membran 10 min bei RT mit 2xSSC gewaschen. Durch die Bestrahlung mit UV-Licht wurde die RNA mit der Membran quervernetzt (Autocross, UV-Stratalinker 1800 von Stratagene) (ROCHE, 2000).

#### 2.2.1.20 Hybridisierung von RNA mit DIG-markierten Sonden

Für die Hybridisierung der RNA mit entsprechenden DIG-markierten DNA- oder RNA-Sonden (siehe 2.2.1.17-18) wurde die noch feuchte Membran (siehe 2.2.1.19) in einem Hybridisierungsröhrchen unter ständiger Rotation mit 10 ml Hybridisierungspuffer (5xSSC (siehe 2.2.1.19), 50% Formamid, deionisiert, 0,1% Natrium-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS, 2% Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim) ) 1 h prähybridisiert. Die Temperatur richtete sich hierbei nach der später eingesetzten Sonde: 68°C bei RNA-Sonden oder 50°C bei DNA-Sonden.

Die Sonde wurde 10 min bei 100°C denaturiert und anschließend zum Hybridisierungspuffer und der Membran gegeben zu einer Konzentration von 20-100 ng/ml bei RNA-Sonden und 25 ng/ml bei DNA-Sonden. Die Hybridisierung wurde über Nacht bei 68°C bzw. 50°C durchgeführt (ROCHE, 2000).

### 2.2.1.21 Nachweis hybridisierter RNA

Nach der Hybridisierung der RNA mit einer DIG-markierten DNA- oder RNA-Sonde (siehe 2.2.1.20) wurde die Membran erst zweimal 15 min bei RT mit Waschpuffer 1 (2xSSC (siehe 2.2.1.21), 0,1% SDS) und dann zweimal 15 min bei 68°C in Waschpuffer 2 (0,1xSSC, 0,1% SDS) gewaschen. Anschließend wurde die Membran 1 min in Maleinsäurepuffer (100 mM Maleinsäure, 150 mM NaCl, pH 7,0, 0,3% Tween 20) äquilibriert und 1 h bei RT in Blockingpuffer (1% Blocking Reagenz (Boehringer Mannheim) in Maleinsäurepuffer) inkubiert. Nachdem die Membran 30 min bei RT mit dem Anti-Digoxigenin-Antikörper (1:10.000 in Blockingpuffer) inkubiert wurde, wurde sie bei RT zweimal 15 min mit Maleinsäurepuffer gewaschen und 2 min in Detektionspuffer (100 mM Tris, 100 mM NaCl, pH 9,5) äquilibriert. Die Membran wurde mit CSPD Ready-to-Use von Tropix, Inc. Bedford, MA, USA beträufelt und 5 min im Dunkeln inkubiert. Überschüssiges CSPD wurde entfernt und die Membran eingeschweißt, bevor ein Röntgenfilm aufgelegt wurde. Der Film wurde nach 30 min bis 2 h 30 Exposition entwickelt (ROCHE, 2000).

## 2.2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.2.1 Anzucht von *E. coli*

Alle *Escherichia coli*-Stämme wurden in den angegebenen Medien bei 36°C angezogen. Das Volumen der anzuziehenden Flüssigkultur betrug 1/10 des Volumens des Kulturkolben (z.B. 100 ml Kultur in einem 1 l-Kolben). Die Kulturen wurden auf dem Schüttler bei 160-200 rpm angezogen. Festkulturen wurden auf entsprechenden Platten (Medium + Agar, siehe 2.1.4.1) ausgestrichen und im Inkubationsschrank angezogen.

### 2.2.2.2 Anzucht von *S. cerevisiae*

Alle *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme wurden in den angegebenen Medien bei 28°C bzw. die temperatursensitiven Mutantenstämme bei RT angezogen. Das Volumen der Flüssigkulturen betrug dabei max. 1/2 Volumen des Kulturkolben. Die Kulturen wurden auf dem Schüttler bei 120-170 rpm angezogen. Festkulturen wurden auf entsprechenden Platten (Medium + Agar, siehe 2.1.4.2) ausgestrichen und im Inkubationsschrank angezogen.

Zur Induktion des temperatursensitiven Phänotypen wurde die Kultur zunächst unter den oben beschriebenen Bedingungen angezogen und vor fortführenden Versuchen für 6 h bei der nicht-permissiven Temperatur von 36°C inkubiert (SEIBEL 2002).

### 2.2.2.3 Erstellung einer Wachstumskurve

Zum Erstellen einer Wachstumskurve wurde eine 10 ml Vorkultur mit einem *S. cerevisiae*-Stamm angeimpft und 2 Tage bei 28°C und 120 rpm angezogen. Mit 1 ml dieser Vorkultur wurde eine 100 ml-Kultur angeimpft und weiter unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Vom Startpunkt 0 h an wurde alle 3 h der OD<sub>600</sub>-Wert der Kultur bestimmt. Anschließend wurde von diesen Werten ausgehend die Wachstumskurve erstellt, indem die Zeit [h] gegen die Dichte der Kultur [OD<sub>600</sub>] aufgetragen wurde. Die Zeitpunkte für die früh-logarithmische, logarithmische, spät-logarithmische und stationäre Wachstumsphase der Kultur wurde bestimmt.

### 2.2.2.4 Induktion der Proteinexpression in *E. coli*

Für die Proteinexpression wurde das pET-System von Novagen eingesetzt. Die Expression wurde wie im Handbuch beschrieben durchgeführt und mit einer Endkonzentration von 1 mM IPTG gestartet (NOVAGEN, 2006).

### 2.2.2.5 Induktion von Hitzestress bei *S. cerevisiae*

Eine *S. cerevisiae*-Kultur wurde unter normalen Bedingungen bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 1,0$  angezogen. Die Kultur wurde in 100 ml Aliquots auf frische, sterile Kolben verteilt und bei 28°C bzw. 37°C weiter inkubiert. Zu bestimmten Zeitpunkten (0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h und 8 h) wurden je ein Kolben von der induzierten und der Kontroll-Kultur in fortführenden Versuchen weiter verwendet (modifiziert nach SAKAKI *et al.*, 2003).

### 2.2.2.6 Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress bei *S. cerevisiae*

Eine *S. cerevisiae*-Kultur wurde unter normalen Bedingungen bis zu einer Dichte von  $OD_{600} = 0,8$  angezogen. Die Kultur wurde zu vier gleichen Teilen auf frische, sterile Kolben verteilt. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde zugegeben zu einer Endkonzentration von 0 mM, 0,4 mM, 0,8 mM und 1,6 mM. Die Kulturen wurden 3 h weiter unter normalen Bedingungen inkubiert und anschließend in fortführenden Versuchen verwendet (modifiziert nach COLLINSON & DAWES, 1992).

### 2.2.2.7 Isolierung von Zellmembranen aus *E. coli*

Die Zellen einer *E. coli*-Kultur wurden sedimentiert (10 min / 6.000 rpm) und je 0,9 g Zellen Nassgewicht in 3 ml Lösung 1 (50 mM HEPES, pH 8,0, 4 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM PMSF, 0,2 mg/ml DNase I, 1 mg/ml Katalase) resuspendiert. Die Zellen wurden mit der Frenchpress (~1000 psi) aufgeschlossen, bis das Lysat klar war. Dann wurden die Zelltrümmer abgetrennt (20 min / 43.000xg). Der Überstand wurde in ein frisches Zentrifugenröhrchen gegeben und mit 0,36 ml Lösung 2 (50 mM HEPES, pH 7,5, 40% vol/vol Glycerin) unterschichtet. Die Membranfraktion wurde auf dem Glycerinkissen angereichert (60 min / 285.000xg). Das Glycerinkissen wurde mit der Membranfraktion in ein frisches Zentrifugenröhrchen überführt und mit 2,7 ml Lösung 3 (50 mM HEPES, pH 7,5) verdünnt. Nachdem das Lysat mit 0,3 ml 5 M Harnstoff gemischt wurde, wurden die Membranen angereichert (60 min / 240.000xg). Die Membranen wurden in 0,72 ml

Lösung 5 (25 mM HEPES, pH 7,5, 10% vol/vol Ethylenglykol) aufgenommen und für weitere Versuche bei -20°C gelagert (SHANKLIN *et al.*, 1997).

Von den einzelnen Fraktionen wurden jeweils Aliquots abgenommen und mittels einer SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung und Immunodetektion (siehe 2.2.3.7-11) analysiert.

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

Die *S. cerevisiae*-Stämme wurden in einer Flüssigkultur angezogen und geerntet (5 min / 6.600xg). Das Sediment wurde einmal mit kaltem H<sub>2</sub>O gewaschen, bevor es in zwei Teilen Lysiermedium (0,6 M Sorbitol, 10 mM Tris, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, pH7,4) aufgenommen wurde (Nassgewicht der Zellen = 1 Teil). Je 1 ml Suspension wurden 3 g Glasperlen (Ø 0,5-0,75 mm) hinzu gegeben. Der Ansatz wurde zehnmal erst 30 s auf höchster Stufe gevortext und danach 30 s auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Zunächst wurden die Zelltrümmer sedimentiert (10 min / 1.250xg). Dann wurden die Mitochondrien aus dem Überstand angereichert (10 min / 17.400xg). Der Niederschlag wurde in 1 ml Lysiermedium aufgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Das Lysat wurde erneut zentrifugiert (5 min / 1.250xg) und die Mitochondrien aus dem Überstand in einer zweiten Zentrifugierung angereichert (10 min / 17.400xg). Der Niederschlag wurde in etwas Lysiermedium aufgenommen und die Proteinkonzentration quantifiziert (siehe 2.2.3.1). Die Mitochondrien wurden bei -20°C gelagert (PRATJE & MICHAELIS, 1977a).

### 2.2.2.9 Isolierung mitochondrialer Membranen aus *S. cerevisiae*

Die *S. cerevisiae*-Stämme wurden in einer Flüssigkultur angezogen und geerntet (5 min / 1.800xg). Das Sediment wurde dreimal mit Sucrosepuffer (250 mM Sucrose, 5 mM 6-Aminohexansäure, 10 mM Tris, pH7,0) gewaschen. Pro 1 g Zellen wurden 1 ml Sucrosepuffer und 1 ml Glasperlen (Ø 0,5-0,75 mm) zugegeben und der Ansatz 10 min auf höchster Stufe gevortext. Die Suspension wurde mit kaltem Sucrosepuffer aufgefüllt und der Überstand in ein Zentrifugenröhrchen überführt. In einer ersten Zentrifugierung

wurden die Zelltrümmer abgetrennt (20 min / 1.250xg), bevor aus dem Überstand die Membranen angereichert wurden (30 min / 18.000xg). Der Niederschlag wurde in Sucrosepuffer aufgenommen und die Proteinkonzentration quantifiziert (siehe 2.2.3.1) (ARNOLD *et al.*, 1999). Die Membranen wurden bei -20°C gelagert.

## 2.2.3 Proteinchemische Methoden

### 2.2.3.1 Quantifizierung mitochondrialer Proteine

Zur Quantifizierung der mitochondrialen Proteine wurde von der Mitochondrien- oder Membran-Fraktion eine 1:100-Verdünnung in 0,6% SDS angesetzt und 4 min bei 95°C inkubiert. Eine OD<sub>280</sub> von 0,21 entspricht 10 µg/µl mitochondrialem Protein (YAFFE, 1991).

### 2.2.3.2 Quervernetzung von Proteinen (Crosslinking)

Isolierte Mitochondrien (600 µg, siehe 2.2.2.8) wurden in 200 µl SM-Puffer (250 mM Sucrose, 10 mM MOPS/KOH, pH 7,4) mit 3 mM ATP und entweder 1 mM EDTA (SME-Puffer) oder 25 mM MgCl<sub>2</sub> (SMM-Puffer) aufgenommen und 20 min bei 4°C inkubiert. Nach der Zugabe von Disuccinimidylsuberat (DSS) (in DMSO gelöst, Endkonzentration 250 µM) bzw. nur DMSO (Kontrolle) wurden die Ansätze 30 min bei 4°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von Tris/HCl, pH 7,4 bis zu einer Konzentration von 25 mM und eine Inkubation von 15 min auf Eis abgestoppt (LEIDHOLD *et al.*, 2006).

### 2.2.3.3 Dephosphorylierung von Proteinen mit CIAP

Isolierte Mitochondrien (300 µg, siehe 2.2.2.8) wurden zweimal mit Lysiermedium (0,6 M Sorbitol, 10 mM EDTA, pH 7,4) gewaschen und in 50 µl 1xCIAP-Puffer (Fermentas, St. Leon-Rot) aufgenommen. Nach der Zugabe von 5 bzw. 10 U CIAP (Calf Intestine Alkaline

Phosphatase) wurden die Ansätze 0,5-1 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von EDTA, pH 7,4 bis zu einer Konzentration von 50 mM abgestoppt. Die Mitochondrien wurden sedimentiert (10 min / 14.000 rpm) und für die Analyse mittels einer SDS-PAGE in Probenpuffer (siehe 2.2.3.7) aufgenommen (modifiziert nach Produktangaben zu CIAP von Fermentas).

#### 2.2.3.4 Deglycosylierung von Proteinen

Es wurde eine 10 ml *S. cerevisiae*-Kultur über Nacht angezogen. Nachdem 100 µl Tunicamycin (2 mg/ml Ethanol p.a.) zu der Kultur zugegeben worden waren, wurde die Kultur unter gleichen Bedingungen 4 h weiter inkubiert (modifiziert nach KUO & LAMPEN, 1974). Anschließend wurden die mitochondrialen Membranen isoliert (siehe 2.2.2.9)

#### 2.2.3.5 Solubilisierung mitochondrialer Membranproteine

Isolierte Mitochondrien (2 mg, siehe 2.2.2.8) wurden in 75 µl Lysierpuffer (0,75 M ε-Aminocapronsäure (ACA), 50 mM Bistris, 0,5 mM EDTA, pH 7,0) aufgenommen und mit 15 µl 10% Dodecylmaltosid (DDM) gut gemischt. Der Ansatz wurde erst 15 min bei 4°C inkubiert und anschließend zentrifugiert (15 min / 17.400xg).

Der Überstand wird in ein frisches 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und stand für fortführende Versuche zur Verfügung (SCHÄGGER & VON JAGOW, 1991).

Für weitere Analysen der solubilisierten Proteine durch die Blue Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (siehe 2.2.3.6) wurde zu dem Überstand 10 µl 10xBN-Probenpuffer (0,75 M ACA, 100 mM Bistris, pH 7,0) zugegeben.

### 2.2.3.6 Blue Native-Polyacrylamidgelelektrophorese (BN-PAGE)

Als Matrix zum Auftrennen der solubilisierten Proteine wurde ein 1,5 mm dickes Polyacrylamidgel gegossen, mit einem Gradienten von 5-15%. Hierfür wurden gleiche Mengen einer 5%igen und einer 15%igen Trenngellösung angesetzt, bestehend aus einem 6x BN-Gelpuffer (1,5 M ACA, 150 mM Bistris, pH 7,0), Acrylamidlösung und 5% Glycerin in der höherprozentigen Lösung. Nach Zugabe von 0,05 Vol TEMED und 0,5 Vol APS (10%) wurde mit Hilfe eines Gradientenmischers das Gel gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde ein 4% Sammelgel (Zusammensetzung siehe 5%ige Trenngellösung) gegossen und ein Kamm eingesetzt. Das Gel wurde über Nacht bei 8°C gelagert zum vollständigen Auspolymerisieren.

Die Gelapparatur wurde mit dem BN-Gradientengel aufgebaut. Die Kammer mit der Anode wurde mit 1x Anodenpuffer (6x Anodenpuffer: 300 mM Bistris, pH 7,0) gefüllt, die der Kathode mit 1x Kathodenpuffer (5x Kathodenpuffer: 250mM Tricine, 75 mM Bistris, 5% (w/v) Coomassie G250, pH 7,0). Ein BN-Proteinmarker (12 µl Albumin, 30 µl β-Amylase, 30 µl Katalase, 6 µl Ferritin, 30 µl Thyroglobulin, alle 2 mg/ml + 10 µl 10xBN-Probenpuffer, siehe 2.2.3.5) und die solubilisierten Proteine wurden in die Probenaschen des Gels gegeben. Die Elektrophorese wurde bei 8°C durchgeführt, wobei zuerst 45 min bei konstant 100 V eingestellt wurden, danach erfolgte die Auftrennung bei 15 mA konstant bis maximal 500 V. Nachdem das Gel zu 1/3 durchgelaufen war (siehe Lauffront), wurde der Kathodenpuffer gegen einen ohne Coomassie ausgetauscht. Die Elektrophorese wurde beendet, als die Lauffront ca. 1 cm vom Ende des Gels entfernt war.

Das Sammelgel wurde abgetrennt und das Trenngel unter leichtem Schütteln über Nacht in H<sub>2</sub>O entfärbt. Dabei wurde das Wasser mehrfach gewechselt. Das Gel wurde photographisch oder mit der Geldokumentationsanlage Gene Genius Bio Imaging System und der Software Genesnap (Vers. 6.00.21) von Syngene, Cambridge, GB dokumentiert und anschließend erst 30 min in Denaturierungspuffer A (1% SDS, 1% β-Mercaptoethanol) und dann 30 min in Denaturierungspuffer B (1% SDS) inkubiert. Das Gel wurde so zerschnitten, dass die Gelspuren als Gelstreifen vorlagen. Die Gelstreifen wurden eingeschweißt und für fortführende Versuche bei -70°C gelagert (SCHÄGGER & VON JAGOW, 1991 und WITTIG *et al.*, 2006).

### 2.2.3.7 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Als Matrix zum Auftrennen der Proteingemische wurde ein 0,75 mm dickes Polyacrylamidgel gegossen (1,5 mm dick zum Auftrennen der Proteinkomplexe der BN-PAGE-Gelstreifen (siehe 2.2.3.6) ), bestehend aus einem 10 oder 12%igen Trenngel und einem 4%igen Sammelgel. Für 30 ml Trenngel wurden 7,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris, 8 mM EDTA, 0,4% SDS, pH 8,8), Acrylamidlösung und H<sub>2</sub>O und für 10 ml Sammelgel 1 ml Sammelgelpuffer (0,625 M Tris, 20 mM EDTA, 1% SDS, pH 6,8), Acrylamidlösung und H<sub>2</sub>O verwendet. Nach Zugabe von 20 µl TEMED und 200 µl APS (100 mg/ml) zum Trenngel wurde dieses gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach dem Auspolymerisieren des Gels wurde das Isopropanol abgenommen und das Sammelgel nach Zugabe von 10 µl TEMED und 100 µl APS (100 mg/ml) gegossen und ein Kamm eingesetzt. Das Gel wurde über Nacht bei 8°C gelagert zum vollständigen Auspolymerisieren.

Jeweils 300 µg mitochondriales Protein wurde in 2x SDS-Probenpuffer (2 ml Sammelgelpuffer, pH 6,8, 2 ml β-Mercaptoethanol, 2,5 ml Sucrose-Bromphenolblau (60% / 0,5%), 2 ml 10% SDS, 1,5 ml H<sub>2</sub>O) aufgenommen und entweder 5 min bei 96°C oder 10 min bei RT inkubiert (für den Nachweis mit dem anti-Pcp1-Antikörper) und anschließend zentrifugiert (5 min / 10.700xg / RT). Der Proteinstandard wurde nach Angaben des Herstellers vorbereitet. Das Gel wurde in die Gelapparatur eingespannt und die Elektrophoresekammern wurden mit SDS-Elektrophoresepuffer (25 mM Tris, 186 mM Glycin, 0,1% SDS) gefüllt. Die Geltaschen wurden mit den Proben beladen und die Elektrophorese bei RT und 10-20 mA pro Gel durchgeführt. Kurz bevor die Lauffront das Ende des Gels erreicht hatte, wurde die Elektrophorese beendet (LAEMMLI, 1970).

### 2.2.3.8 Coomassie-Färbung von SDS-Gelen

Nach der SDS-PAGE wurde das SDS-Gel mit Page-Blue Protein Staining Solution von Fermentas, St. Leon-Rot nach den Angaben des Herstellers gefärbt. Das Gel wurde für 1-2 h in der Färbelösung inkubiert. Zum Entfärben wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Das gefärbte Gel wurde mit der Geldokumentationsanlage Gene Genius Bio Imaging System und Genesnap (Vers. 6.00.21) von Syngene, Cambridge, GB dokumentiert.

### 2.2.3.9 Proteintransfer auf Nitrozellulosemembran (Western-Blot)

Die Proteingemische, die in einer SDS-PAGE (siehe 2.2.3.7) aufgetrennt worden waren, wurden in einem Nassblotverfahren auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing 0,45 \mu\text{m}$ ) transferiert und immobilisiert. Dazu wurde die Blotapparatur Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell von Bio-Rad, München nach den Angaben des Herstellers verwendet. Die Membran wurde zunächst in  $\text{H}_2\text{O}$  angefeuchtet und mit vier Filterpapieren und zwei Schwämmen im Transferpuffer (25 mM Tris, 186 mM Glycin, 20% Methanol) äquilibriert. Das SDS-Gel und die Membran wurden jeweils zwischen vier Filterpapieren und zwei Schwämmen in einer Blotkassette eingespannt und in die Apparatur eingesetzt. Die Apparatur wurde mit dem Transferpuffer aufgefüllt, bevor der Transfer über Nacht bei RT und 55 mA durchgeführt wurde.

### 2.2.3.10 Ponceau S-Färbung von Proteinen

Um die auf eine Nitrocellulosemembran transferierten Proteine anzufärben, wurde die Membran 30 min in Ponceau-S-Lösung (0,1% (w/v) Ponceau S, 5% Essigsäure) inkubiert. Anschließend wurde die Membran mit 5% Essigsäure entfärbt und einmal kurz mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült, bevor sie dokumentiert wurde (BANNUR *et al.*, 1999).

### 2.2.3.11 Nachweis von Proteinen durch Antikörper (Immundetektion)

Die Immundetektion wurde leicht modifiziert nach den Angaben von Amersham Biosciences (ECL Western Blotting Detection Reagents) durchgeführt. Die Nitrocellulosemembran mit den transferierten und immobilisierten Proteinen wurde 1 h in 5% Blocking-Lösung (5% fettfreies Milchpulver in 1x TBS-T (10xTBS-T: 0,2 M Tris, 1,37 M

NaCl, pH 7,6; 0,1% Tween 20 in 1x TBS) inkubiert und anschließend zweimal 5 min in 1x TBS-T gewaschen. Die Membran wurde dann 1 h mit dem in 1x TBS-T verdünnten primären Antikörper inkubiert und erneut zweimal 5 min mit 1x TBS-T gewaschen. Die Membran wurde danach 1 h mit dem in 1x TBS-T verdünnten sekundären, mit HRP konjugierten Antikörper inkubiert und anschließend erst zweimal 5 min mit 1x TBS-T und zweimal 5 min mit 1x TBS gewaschen. Das ECL-Substrate wurde 1:1 angesetzt (1,3 ml / 200 cm<sup>2</sup>) und gleichmäßig auf der Membran verteilt, die in einem Entwicklungsumschlag von Tropix, Inc. Bedford, MA, USA platziert war. Die Membran wurde in dem Entwicklungsumschlag in eine Filmkassette gelegt, fixiert und für 2 min einem Röntgenfilm exponiert. Bei Bedarf wurden die Expositionszeiten verkürzt oder verlängert.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1 Regulierung der Expression der mitochondrialen Rhomboidprotease *PCP1*

Als Genexpression wird der gesamte Prozess des Umsetzens der im Gen enthaltenen Informationen in das entsprechende Genprodukt bezeichnet. Dieser Prozess erfolgt in mehreren Schritten. An jedem dieser Schritte können regulatorische Faktoren einwirken und den Prozess steuern. Diese Vorgänge werden als Genregulierung zusammengefasst. Die Gruppe der Peptidasen z.B. spaltet Peptidbindungen. Damit dies kontrolliert geschieht, wird die Genexpression reguliert. Die Peptidaseaktivität kann auch durch Modifikationen des Proteins reguliert werden.

Im Folgenden wurde die Regulierung der Rhomboidprotease Pcp1 aus der Hefe untersucht.

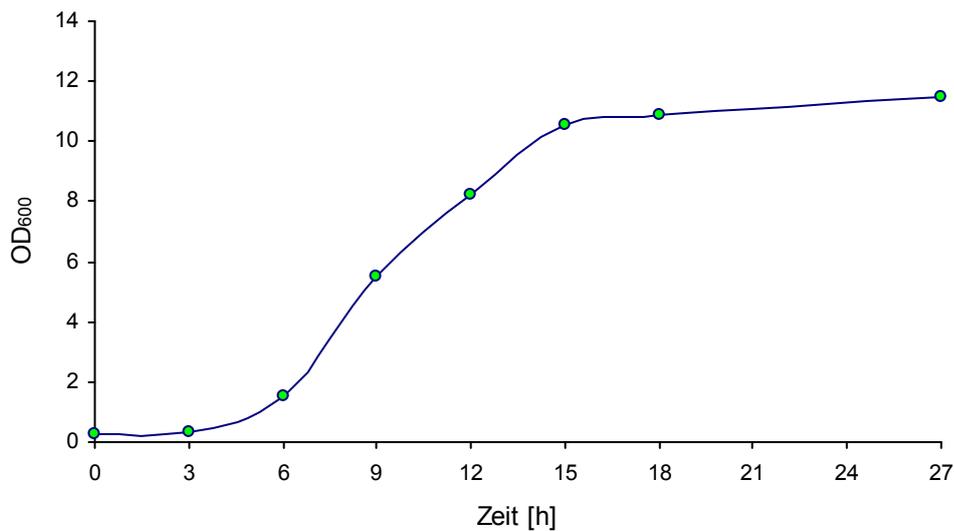
##### 3.1.1 Transkriptanalyse in Abhängigkeit der Wachstumsphasen oder des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- oder Hitzestresses

Pcp1p gehört zu den Rhomboid-Proteasen und ist in der inneren mitochondrialen Membran (IM) lokalisiert. Bislang sind zwei Substrate identifiziert worden: Cytochrome *c* Peroxidase (Ccp1p) und Mgm1p (Mitochondrial Genome Maintenance). MCQUIBBAN *et al.* (2003) zeigen, dass Pcp1p reduziert wird, sobald die Zellen von der logarithmischen Wachstumsphase in die stationäre übergehen. Gleichzeitig sinkt die Prozessierung von Mgm1 von 95% auf 50%.

Es sollte untersucht werden, ob die Expression von *PCP1* bereits auf der Transkriptionsebene reguliert wird.

Die Phasen der Wachstumskurve wurden für den Hefe-Wildtypstamm BY4742 bestimmt. Dazu wurde von einer stationären Kultur ausgehend eine frische Kultur angeimpft und angezogen. Zu definierten Zeitpunkten wurde die Zelldichte über die Messung der optischen Dichte bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) bestimmt (siehe 2.2.2.3). Trägt man die OD<sub>600</sub>-Werte

im Verhältnis zur Zeit auf, ergibt sich die Wachstumskurve für den Wildtypstamm (Abb. 3.1.1). Die Kurve wurde zur Bestimmung der folgenden Wachstumsphasen verwendet: frühlogarithmisch (4 ½ h), logarithmisch (11 ½ h), spätlogarithmisch (15 ½ h) und stationär (24 h). Die frühlogarithmische Phase kennzeichnet den Übergang von der Anlaufphase in die logarithmische Wachstumsphase, die spätlogarithmische Phase den Übergang von der logarithmischen in die stationäre Wachstumsphase.



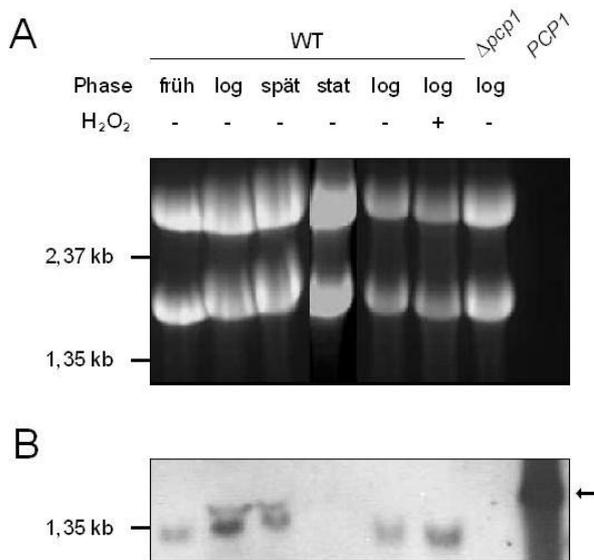
**Abb. 3.1.1:** Wachstumskurve des Wildtyps von *S. cerevisiae*

Für den Wildtyp BY4742 (*S. cerevisiae*) wurde eine Wachstumskurve (s. 2.2.2.3) erstellt. Die Zellen wurden in YPGc-Medium angezogen und die OD<sub>600</sub>-Werte zu den markierten Zeitpunkten bestimmt.

Es wurden dann Kulturen bis in die entsprechende Wachstumsphase angezogen und die RNA isoliert (siehe 2.2.1.15), ebenso wie die RNA aus dem *pcp1*-Deletionsstamm während der logarithmischen Wachstumsphase, die als Kontrolle diente. Die RNA wurde elektrophoretisch aufgetrennt. Zum Vergleich der aufgetragenen Menge der Proben untereinander diente die ribosomale RNA (18 S und 28 S), die konstitutiv exprimiert wird und deshalb als Standard benutzt werden kann (WENZEL *et al.*, 2005). Sie wurde durch eine Ethidiumbromidfärbung des Gels sichtbar gemacht. Die Spuren der Ansätze für die drei logarithmischen Wachstumsphasen (früh, log, spät) und  $\Delta pc1$  wiesen gleiche Mengen an ribosomaler RNA auf, die der stationären im Verhältnis etwas mehr (Abb.

3.1.2, A). Für die *in vitro* hergestellte Kontroll-mRNA *PCP1* (siehe 2.2.1.17) wurde keine sichtbare Bande nach der Gelelektrophorese erwartet.

Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit einer spezifischen RNA-Sonde hybridisiert. Zur Herstellung der dig-markierten Sonde wurde das in der Arbeitsgruppe vorliegende Plasmid pGEM-3Zf(+)-*PCP1-2,5myc* verwendet. Das *PCP1*-Gen war in diesem Plasmid hinter den SP6-Promotor kloniert. Die Sequenz des *myc*-Tags wurde mit der Hefedatenbank verglichen, wobei keine signifikanten Homologien gefunden werden konnten. Daher war nicht zu erwarten, dass der C-terminale *myc*-Tag mit anderen mRNAs hybridisieren würde. Die Kontroll-mRNA wurde ebenfalls unter Verwendung dieses Plasmids erstellt, so dass diese 90 bp größer ist (*myc*-Tag: 84 bp + Zwischenregion: 6 bp) als die *in vivo* transkribierte *PCP1*-mRNA (*PCP1*-Gen: 1041 bp).



**Abb. 3.1.2:** Transkriptanalyse von *PCP1* unter dem Einfluss der Wachstumsphasen und des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stresses

Der Hefe-Wildtypstamm BY4742 (WT) und die Hefemutante  $\Delta pc p 1$  wurden bis zur angegebenen Wachstumsphase angezogen. Die Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress (0,2 mM, siehe 2.2.2.6) wurde markiert (+). (A) Die RNA wurde isoliert (siehe 2.2.1.15), in einem 1,3% Agarosegel aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde der Marker RNA-Ladder (Gibco-BRL) benutzt. (B) Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran (A, Ø 0,2  $\mu$ m) transferiert und mit einer spezifischen *PCP1*-RNA-Sonde detektiert (siehe 2.2.1.16-17 u. 19-21). Als Kontrolle diente die *in vitro* hergestellte *PCP1*-RNA (siehe 2.2.1.17).

früh: frühlogarithmische Wachstumsphase, log: logarithmische Wachstumsphase, spät: spätlogarithmische Wachstumsphase, stat: stationäre Wachstumsphase

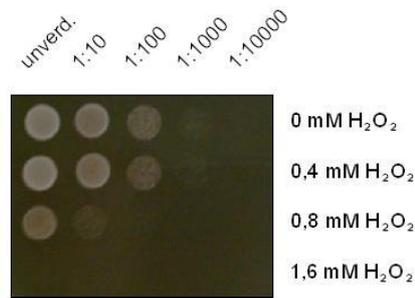
Die *in vitro*-hergestellte *PCP1*-Kontroll-mRNA wurde bei ca. 1,8 kb detektiert, während in der  $\Delta pc p 1$ -Mutante kein Transkript nachgewiesen wurde (Abb. 3.1.2, B). In den Proben der logarithmischen Wachstumsphasen (früh, log, spät) konnte ein ca. 1,3 kb Transkript nachgewiesen werden (Abb. 3.1.2, B). In der stationären Phase wurde kein *PCP1*-Transkript detektiert, obwohl eher mehr Gesamt-RNA in dieser Gelspur aufgetragen worden war (Abb.3.1.2, A+B). Die Bandenintensität des *PCP1*-Transkripts war in der logarithmischen Wachstumsphase signifikant stärker als in der früh- oder spät-logarithmischen. Die Menge des Transkripts nahm in der logarithmischen Wachstumsphase also zu und danach wieder ab, bis es in der stationären Phase nicht mehr detektiert wurde.

Die Cytochrom *c* Peroxidase (Ccp1) kann für die Zelle schädliches H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im Intermembranraum (IMS) zu H<sub>2</sub>O reduzieren. Da sie ebenfalls ein Substrat von Pcp1p ist (ESSER *et al.* 2002), sollte überprüft werden, ob H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierter Stress die PCP1-Expression der Zelle erhöht.

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induziert die Bildung von reaktivem Sauerstoff, der u.a. Mutationen und Apoptose auslöst. Deshalb wurde zunächst bestimmt, bei welcher Konzentration von induziertem Stress ausgegangen werden konnte und ab welcher sich eine lethale Wirkung zeigte. Dafür wurde der Hefewildtypstamm bis in die logarithmische Wachstumsphase angezogen und in vier Ansätze aufgeteilt. Nach der Zugabe von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis zu einer Endkonzentration von 0 mM, 0,4 mM, 0,8 mM und 1,6 mM wurden die Kulturen noch weitere 3 h inkubiert (siehe 2.2.2.6). Anschließend wurden jeweils Verdünnungsreihen erstellt und auf Glucose-Vollmediumplatten angezogen (Abb. 3.1.3). Bis 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurde das Zellwachstum nicht beeinflusst, wohingegen es nach der Behandlung mit 0,8 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gehemmt war. Die Behandlung mit 1,6 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hatte eine lethale Wirkung, es wuchsen keine Zellen mehr. In den folgenden Versuchen wurde zur Induzierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress mit Konzentrationen von maximal 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gearbeitet, da hier die Beeinträchtigung der Ergebnisse aufgrund veränderten Zellwachstums ausgeschlossen werden konnte.

Um den Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress auf die *PCP1*-Expression zu überprüfen, wurde der Wildtypstamm BY4742 bis in die logarithmische Wachstumsphase angezogen und die Kultur halbiert. Zu einer Hälfte wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mM hinzu gegeben. Beide Kulturen wurden für 3 h weiter inkubiert, bevor die Gesamt-RNA isoliert wurde (siehe 2.2.1.15 und 2.2.2.6). Die RNA wurde in einem 1,3% Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 3.1.2, A). Als Standard zum Abschätzen der aufgetragenen RNA-Menge wurden wie auch schon für die Proben der Wachstumsphasen die ribosomalen RNAs (s.o.) verwendet. Für die induzierte Probe und die Kontrolle wurden gleiche Mengen RNA aufgetragen.

Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und ebenfalls mit der oben beschriebenen *PCP1*-RNA-Sonde hybridisiert und das *PCP1*-Transkript anschließend detektiert (siehe 2.2.1.19-21) (Abb. 3.1.2, B). Sowohl in dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Ansatz als auch in der Kontrolle wurde ein 1,3 kb großes Transkript nachgewiesen, dessen Intensität sich nicht signifikant voneinander unterscheiden ließ.



**Abb. 3.1.3: Auswirkung der  $H_2O_2$ -Konzentrationen auf die Überlebensrate des Hefe-Wildtypstammes**

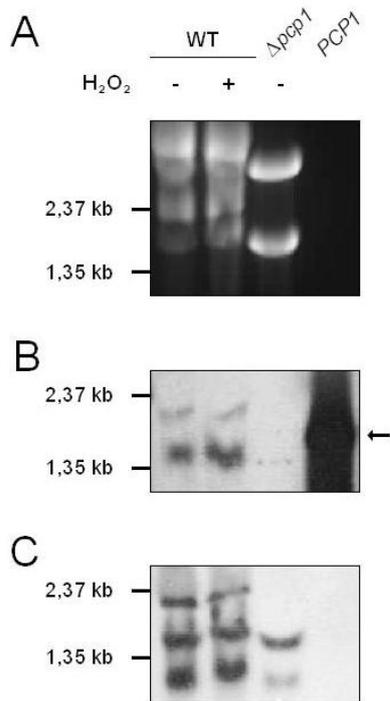
Der Hefe-Wildtyp BY4742 wurde in YPGc-Medium angezogen und  $H_2O_2$ -Stress wie in 2.2.2.6 beschrieben induziert. Der Wildtyp wurde in einer Verdünnungsreihe auf einer YPGc-Platte aufgetropft und mehrere Tage bei  $28^\circ C$  inkubiert.

unverd.: unverdünnt

Um sicher zu gehen, dass der  $H_2O_2$ -induzierte Stress keinen Einfluss auf die Expression oder Synthese der ribosomalen RNA hatte und somit die Verwendung als Standard für die Mengenabschätzung gewährleistet war, wurde eine Sonde für ein konstitutiv exprimiertes Gen („House-Keeping Gene“) hergestellt. Hierfür kamen die Untereinheiten der Pyruvatcarboxylase oder -dehydrogenase in Frage. Das Transkript von *PDA1*, eine Untereinheit der Pyruvatdehydrogenase sollte etwa 1,26 kb groß sein, etwas kleiner als das *PCP1*-Transkript. STEIN (1999) zeigt, dass das *PDA1*-Gen stabil exprimiert wird.

Das *PDA1*-Gen war in den pUC4-Vektor kloniert und wurde freundlicherweise von Georg Michaelis, Düsseldorf zur Verfügung gestellt. Aus dem Gen wurde mit KpnI und NotI ein 0,65 kb großes Fragment geschnitten und für die Herstellung der dig-markierten DNA-Sonde verwendet (siehe 2.2.1.18).

Die bereits in Abb. 3.1.2 verwendeten RNA-Isolate für den  $H_2O_2$ -Stress sowie die Kontrollen wurden erneut in einem 1,3% Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.1.4, A). Da die anschließende Hybridisierung mit zwei unterschiedlichen Sonden durchgeführt werden sollte, wurden die RNA-Proben zweifach angesetzt und aufgetragen. Aufgrund der ribosomalen RNA ließ sich feststellen, dass die RNA-Menge der induzierten Probe mit der Kontrolle vergleichbar war. Beide aufgetragenen Ansätze waren identisch, so dass hier nur eine Ethidiumbromidfärbung gezeigt wird.



**Abb. 3.1.4: Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress auf das *PCP1*-Transkript in *S. cerevisiae***

Der Hefe-Wildtypstamm BY4742 (WT) und die Hefemutante  $\Delta pcp1$  wurden bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Sofern markiert, wurde H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress induziert (+) (0,2 mM, siehe 2.2.2.6). (A) Die RNA wurde isoliert (siehe 2.2.1.15), in einem 1,3% Agarosegel aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde der Marker RNA-Ladder (Gibco-BRL) benutzt. (B) Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran (A, Ø 0,2 µm) transferiert und mit einer spezifischen *PCP1*-RNA-Sonde oder (C) einer spezifischen *PDA1*-DNA-Sonde detektiert (siehe 2.2.1.16-21). Als Kontrolle diente die *in vitro* hergestellte *PCP1*-RNA (Pfeil, siehe 2.2.1.17).

Das Gel wurde geteilt und die RNA jeweils auf eine Nylonmembran transferiert. Anschließend wurde die Membran entweder mit der *PCP1*-RNA-Sonde (Abb. 3.1.4, B) bzw. der *PDA1*-DNA-Sonde (Abb. 3.1.4, C) hybridisiert und detektiert. Mit der *PCP1*-Sonde wurden für den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestressten Ansatz sowie die Kontrolle zwei Banden detektiert, eine stärkere bei ~1,5 kb und eine schwächere bei ~2,1 kb. Die *PCP1*-Kontroll-RNA wird mit einer Größe von ~1,8 kb nachgewiesen. Mit der *PDA1*-Sonde wurden in dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-gestressten Ansatz sowie der Kontrolle drei Banden bei ~1,1 kb, ~1,5 kb und ~2,1 kb detektiert. Die Intensität der Banden war vergleichbar, so dass man davon ausgehen konnte, dass gleiche Mengen RNA aufgetragen worden waren. In der  $\Delta pcp1$ -Kontrolle wurden lediglich die beiden kleineren Banden nachgewiesen und in der *PCP1*-

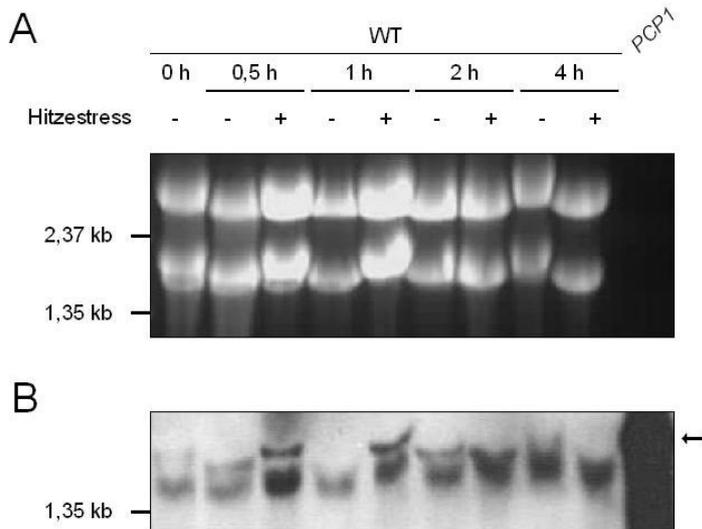
RNA-Kontrolle wie erwartet nichts. Sowohl die ribosomalen RNA als auch das *PDA1*-Transkripts zeigten, dass gleiche Mengen RNA auf das Agarosegel aufgetragen worden waren und somit beide Varianten als interner Standard für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induzierten Stress einsetzbar sind.

Bei den Banden, die mit beiden Sonden bei ~2,1 kb nachgewiesen worden waren, handelte es sich wahrscheinlich um Artefakte, die aufgrund der schlechten Auftrennung im Agarosegel entstanden waren (Abb. 3.1.4, A). Sie befanden sich in etwa auf Höhe der ribosomalen RNA. Außerdem wurden in der  $\Delta pcp1$ -Kontrolle lediglich die beiden kleineren Banden nachgewiesen.

Hitze ist eine andere Art Stress, mit der die Hefe zurechtkommen muss. Es sollte überprüft werden, ob *PCP1* in Hitze-Gestressten Zellen stärker exprimiert wird als in den Kontrollen.

Dazu wurde ein Wildtypstamm bis in die logarithmische Wachstumsphase angezogen und dann in neun Kulturen aufgeteilt. Je vier davon wurden weiter bei 28°C inkubiert, die anderen vier bei 36°C. Die neunte Kultur diente als Nullwert. Nach 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h und 4 h wurde die RNA isoliert (siehe 2.2.1.15) und auf einem 1,3% Agarosegel aufgetrennt (Abb. 3.1.5, A). Es waren leichte Unterschiede für die aufgetragene RNA-Menge zu erkennen. Die Intensität der ribosomalen RNA in den Proben nach 0,5 h und 1 h Hitzestress war stärker im Verhältnis zu ihren Kontrollen.

Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran transferiert und mit der *PCP1*-RNA-Sonde hybridisiert. Das *PCP1*-Transkript wurde bei ~1,5 kb detektiert (Abb. 3.1.5, B). Nach 0,5 h Hitzestress wurde mehr *PCP1*-Transkript nachgewiesen als in der Kontrolle. Allerdings war auch mehr RNA aufgetragen worden als in der Kontrolle. Nach 1 h Hitzestress waren keine signifikanten Unterschiede zwischen dem gestressten und dem nicht gestressten Ansatz zu erkennen. Das gleiche galt auch für die Ansätze nach 2 h und 4 h.



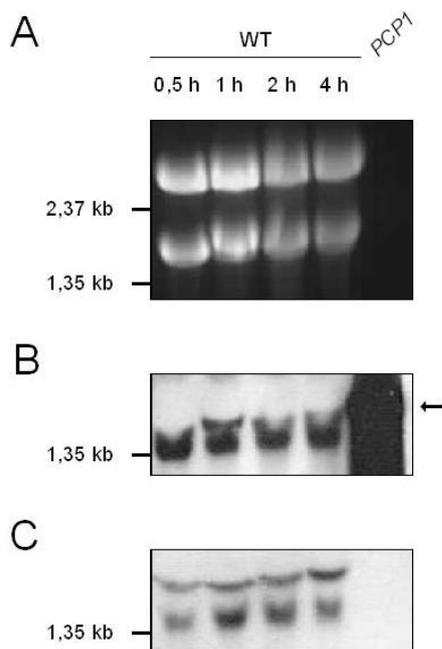
**Abb. 3.1.5: Einfluss von Hitze-Stress auf das *PCP1*-Transkript in *S. cerevisiae***

Der Hefe-Wildtypstamm BY4742 (WT) wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen. Für den Hitzestress (+) wurden die Zellen die angegebene Zeit bei 36°C inkubiert (siehe 2.2.2.5). (A) Die RNA wurde isoliert (siehe 2.2.1.15), in einem 1,3% Agarosegel aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde der Marker RNA-Ladder (Gibco-BRL) benutzt. (B) Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran (A, Ø 0,2 µm) transferiert und mit einer spezifischen *PCP1*-RNA-Sonde detektiert (siehe 2.2.1.16-17 u. 19-21). Als Kontrolle diente die *in vitro* hergestellte *PCP1*-RNA (siehe 2.2.1.17), die von dem Pfeil markiert wird.

Zur Absicherung dieses Ergebnisses wurde die RNA der Hitzestress-Proben mit der *PCP1*-RNA-Sonde und der *PDA1*-DNA-Sonde hybridisiert (Abb. 3.1.6).

Die ribosomale RNA war in allen Ansätzen gleich intensiv vertreten (Abb.3.1.6, A). Die bei ~1,4 kb detektierten *PCP1*-Transkripte wiesen auch keine signifikanten Unterschiede zueinander auf (Abb. 3.1.6, B). Ebenso werden die *PDA1*-Transkripte bei ~1,4 kb und 1,8 kb nachgewiesen (Abb. 3.1.6, C). Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich miteinander festgestellt werden.

Die Expression von *PCP1* wurde nicht durch den Hitzestress beeinflusst.



**Abb. 3.1.6:** Einfluss von Hitze-Stress auf das *PCP1*-Transkript in *S. cerevisiae*

Der Hefe-Wildtypstamm BY4742 (WT) wurde bis zur logarithmischen Wachstumsphase angezogen und Hitze-Stress induziert (36°C, siehe 2.2.2.5). (A) Die RNA wurde isoliert (siehe 2.2.1.15), in einem 1,3% Agarosegel aufgetrennt und durch eine Ethidiumbromidfärbung sichtbar gemacht. Als Größenstandard wurde der Marker RNA-Ladder (Gibco-BRL) benutzt. (B) Die aufgetrennte RNA wurde auf eine Nylonmembran (A, Ø 0,2 µm) transferiert und mit einer spezifischen *PCP1*-RNA-Sonde oder (C) einer spezifischen *PDA1*-DNA-Sonde detektiert (siehe 2.2.1.16-21). Als Kontrolle diente die *in vitro* hergestellte *PCP1*-RNA (siehe 2.2.1.17), die von dem Pfeil markiert wird.

### 3.1.2 Proteinanalyse in Abhängigkeit der Wachstumsphasen oder des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stresses

Die Expression auf RNA- und Proteinebene können, müssen aber nicht miteinander korrelieren. Deshalb sollte geprüft werden, ob die Menge des Rhomboid-Proteins Pcp1 in den unterschiedlichen Wachstumsphasen und nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induziertem Stress variiert.

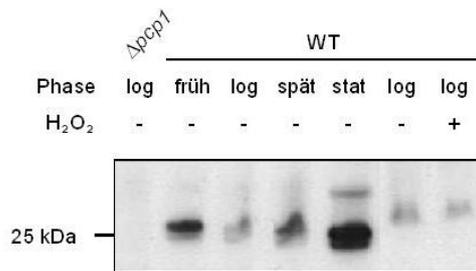
Kulturen des Wildtypstammes wurden bis in die entsprechenden Wachstumsphasen (siehe Abb. 3.1.1) angezogen. Eine weitere Kultur, die bis in die logarithmische Wachstumsphase angezogen worden war, wurde geteilt. In einer Hälfte wurde mit 0,4 mM

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Stress induziert, die andere diente als Kontrolle (siehe 2.2.2.6). Die beiden Kulturen wurden noch 3 h lang weiter inkubiert. Als Kontrolle für den Pcp1p-Nachweis wurde ein *Δpcp1*-Stamm mit angezogen. Aus allen Kulturen wurden die Mitochondrien isoliert und die mitochondrialen Proteine quantifiziert (siehe 2.2.2.8 und 2.2.3.1). Es wurden gleiche Mengen Proteine in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen (siehe 2.2.3.7 und 9). Mit einer Ponceau-S-Färbung (siehe 2.2.3.10) der Membran wurde überprüft, dass die aufgetragenen Proteinmengen wirklich miteinander vergleichbar waren (Daten nicht gezeigt). Anschließend wurde die Membran mit dem spezifischen anti-Pcp1-Antikörper immunodetektiert (siehe 2.2.3.11) (Abb. 3.1.7).

Das Pcp1-Protein wurde mit einer Größe von ~25 kDa in allen Wildtyphefezellen nachgewiesen. In der *pcp1*-Deletionsmutante wurde kein Pcp1p nachgewiesen. In der frühlogarithmischen Wachstumsphase war das für Pcp1p detektierte Signal deutlich und nimmt im Verhältnis dazu in der logarithmischen Wachstumsphase ab. In der spätlogarithmischen Wachstumsphase nahm das detektierte Pcp1-Signal wieder leicht zu und trat dann in der stationären Wachstumsphase am Dominantesten auf.

Die Expression von Pcp1p nimmt zunächst nach verlassen der frühlogarithmischen Wachstumsphase ab. In der spätlogarithmischen Wachstumsphase nimmt die Expression leicht zu. Pcp1p ist in der stationären Phase am stärksten exprimiert.

In dem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress-induzierten Ansatz wurde Pcp1p detektiert. Die Intensität der Bande war von der der Kontrolle nicht zu unterscheiden. Die Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress hatte keinen erkennbaren Einfluss auf die Expression von Pcp1p. Die Menge an Pcp1p dieser bis in die logarithmischen Phasen angezogenen Kulturen waren mit dem Ansatz zur logarithmischen Wachstumsphase identisch.



**Abb. 3.1.7: Einfluss der Wachstumsphasen oder des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stresses auf die Proteinmenge von Pcp1p in *S. cerevisiae***

Der Hefe-Wildtypstamm BY4742 (WT) und die Hefemutante  $\Delta pc p 1$  wurden bis zur angegebenen Wachstumsphase angezogen. Die Induktion des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stresses wurde mit 0,4 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durchgeführt (+, siehe 2.2.2.6). Die Mitochondrien wurden isoliert (siehe 2.2.2.8) und die mitochondrialen Proteine in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Als Proteinstandard wurde der Proteinmarker Protein Molecular Weight Marker (Fermentas) verwendet. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) wurde die Detektion mit dem anti-Pcp1-Antikörper durchgeführt.

früh: frühlogarithmische Wachstumsphase, log: logarithmische Wachstumsphase, spät: spätlogarithmische Wachstumsphase, stat: stationäre Wachstumsphase

### 3.1.3 Untersuchungen zu Modifikationen von Pcp1p

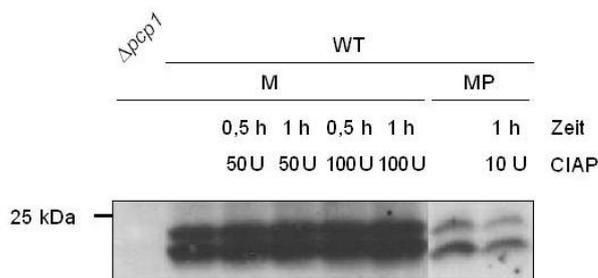
In vielen Versuchen wurde Pcp1p als Doppelbande detektiert (siehe Abb. 3.2.1). Hierbei kann es sich zum einen um ein Abbauprodukt von Pcp1p handeln. Dafür spricht die Beobachtung, dass nach wiederholtem Einfrieren und Auftauen der Mitochondrien die Intensität der oberen Bande abnahm, wohingegen die untere zunahm. Eine weitere Möglichkeit könnte eine posttranslationale Modifikation von Pcp1p sein, wie z.B. Phosphorylierung oder Glycosylierung, die die Masse von Pcp1p verändern. Dafür spricht, dass nach der Expression von Pcp1p in *E. coli* keine Doppelbande detektiert wurde (siehe Abb. 3.4.2).

### 3.1.3.1 Phosphorylierung

Es sollte untersucht werden, ob eine Phosphorylierung für die detektierte Doppelbande von Pcp1p verantwortlich ist. Dafür wurden isolierte Mitochondrien des Wildtyps in CIAP-Puffer (Fementas) aufgenommen und mit der alkalischen Phosphatase CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas) inkubiert (siehe 2.2.3.3). Alternativ wurden aus den Mitochondrien zuerst Mitoplasten generiert. Als Mitoplasten bezeichnet man Mitochondrien ohne äußere Membran und Intermembranraum. Zu ihrer Generierung wurden die Mitochondrien in einem 0,06 M Mannitpuffer aufgenommen. Aufgrund der osmotischen Wirkung nimmt das Matrix-Volumen zu, was dann dazu führt, dass die äußere Membran platzt (MEYER *et al.*, 1997). Anschließend wurden die Mitoplasten ebenfalls in CIAP-Puffer aufgenommen und mit der Phosphatase CIAP inkubiert. Die Ansätze wurden anschließend in einem 12% SDS-Gel analysiert. Die aufgetrennten Proteine wurden nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert (Abb. 3.1.8)

Ohne Zugabe von Phosphatase wurde in den Mitochondrien aus einem Hefe-Wildtypstamm bei ~24 kDa Pcp1p in Form einer Doppelbande detektiert. Beide Banden waren ungefähr gleich intensiv. Nach der Inkubation der Mitochondrien mit alkalischer Phosphatase für 0,5 oder 1 h blieb das Verhältnis beider Banden unverändert. Auch höhere Konzentrationen der alkalischen Phosphatase zeigten keinen Einfluss. Wurden Mitoplasten mit alkalischer Phosphatase behandelt, ließen sich ebenfalls keine Abweichungen feststellen.

Mit dieser Methode ließ sich nicht auf eine Phosphorylierung von Pcp1 schließen.

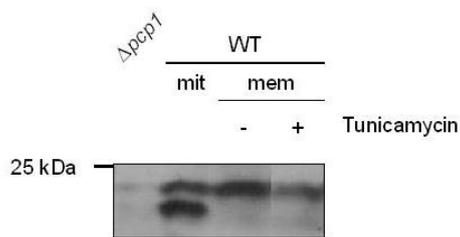


**Abb. 3.1.8: Untersuchungen zur Phosphorylierung von Pcp1p**

Aus dem Hefe-Wildtypstamm BY4742 (WT) wurden Mitochondrien isoliert. Diese wurden entweder direkt in CIAP-Puffer (Fermentas) aufgenommen oder erst in 0,06 M Mannit, 20 mM Tris, pH 7,4 zum Generieren von Mitoplasten. Die Mitoplasten wurden dann ebenfalls in CIAP-Puffer aufgenommen. CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase, Fermentas) wurde wie indiziert zugegeben und die Ansätze für 0,5 bzw. 1 h bei 37°C inkubiert. Die mitochondrialen Proteine wurden anschließend in einer 12% SDS-PAGE analysiert und auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) transferiert. Die Detektion erfolgte mit dem anti-Pcp1-Antikörper. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. M: Mitochondrien, MP: Mitoplasten, U: Unit

### 3.1.3.2 Glycosylierung

Die elektrophoretische Wanderung von Proteinen kann auch durch Glycosylierungen verändert werden. Um zu untersuchen, ob die Pcp1p-Doppelbanden durch diese Art der posttranslationalen Modifikation bedingt sein könnten, wurde Tunicamycin, ein Hemmstoff der Glycosylierung, verwendet. Der Hefe-Wildtypstamm wurde in Glucose-Vollmedium angezogen und nach Zugabe von Tunicamycin 4 h weiter inkubiert. Anschließend wurden die mitochondrialen Membranen isoliert (siehe 2.2.2.9). Die Ansätze wurden mit einem 12% SDS-Gel analysiert und die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Detektion der Membran mit dem anti-Pcp1-Antikörper ist in Abb. 3.1.9 dargestellt.



**Abb. 3.1.9: Untersuchungen zur Glycosylierung von Pcp1p**

Der Hefe-Wildtypstamm BY4742 (WT) wurde in YPGc-Medium über Nacht angezogen. Nach der Zugabe von Tunicamycin (Endkonzentration: 20 µg/ml) wurde die Kultur noch 4 h unter gleichen Bedingungen weiter inkubiert, bevor die mitochondrialen Membranen isoliert (siehe 2.2.2.9) und mit einem 12% SDS-Gel analysiert wurden. Nach dem Transfer der Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Ø 0,4 µm) erfolgte die Detektion mit dem anti-Pcp1-Antikörper. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet.

mit: Mitochondrien, mem: mitochondriale Membranen

In den Wildtypstamm-Mitochondrien wurde für Pcp1p eine 24 kDa große Doppelbande detektiert. In den Membran-Ansätzen wurde ebenfalls bei 24 kDa eine Bande detektiert. Diese Bande war in der behandelten und unbehandelten Probe ungefähr gleich intensiv. Demnach hatte die Inkubation mit Tunicamycin keinen Einfluss auf das Bandenmuster. Unterschiede beim Auftreten der Doppelbande in Abhängigkeit der Präparation von Mitochondrien oder mitochondrialen Membranen konnten durch frühere Versuche nicht bestätigt werden, wodurch das Auftreten der Einfachbande in den Membranfraktionen auf die frisch isolierten Proben zurück zuführen sein könnte.

## 3.2 Proteolytische Reifung von Pcp1p während des Imports in die Mitochondrien

### 3.2.1 Untersuchungen zur Identifizierung der an der Prozessierung von Pcp1p beteiligten Signalpeptidase(n)

Das kernkodierte Pcp1p wird nach der Synthese im Cytosol in die Mitochondrien importiert. Dabei wird es prozessiert und somit in die reife Form überführt (MICHAELIS *et al.* 2005). Die dafür verantwortliche(n) Signalpeptidase(n) sollte(n) identifiziert werden.

Zusätzlich zu den bereits bekannten Signalpeptidasen (bzw. deren Untereinheiten) wurde in den Datenbanken Saccharomyces Genome Database, MEROPS (Peptidase-Datenbank), MIPS und Mitop2, sowie in der Literatur (REINDERS *et al.*, 2006) nach Kandidaten gesucht, die für die Prozessierung der Rhomboidprotease Pcp1 in Frage kamen. Dabei wurde berücksichtigt, dass die Produkte der Kandidatengene mitochondrial lokalisiert sind. Des Weiteren sollte der Phänotyp wie bei der *pcp1*-Deletionsmutante lebensfähig sein und ein eingeschränktes Wachstum auf nicht-fermentierbarem Medium aufweisen. Idealerweise wurde für das Kandidatengen bereits eine Peptidaseaktivität beschrieben, ansonsten war die Funktion zumeist unbekannt. Darüber hinaus sollten auch Proteine, die mit Peptidasen interagieren untersucht werden. Das Ergebnis der Suche ist in Tab. 3.2.1 zusammengefasst.

**Tab. 3.2.1: Übersicht der untersuchten Gene, die an der Prozessierung von Pcp1p beteiligt sein könnten**

Die möglichen Prozessierungspeptidasen von Pcp1p wurden aufgrund der Ergebnisse einer Recherche der Datenbanken Saccharomyces Genome Database, MEROPS, MIPS und Mitop2 identifiziert. Nr. 1-5 sind die Untereinheiten der bekannten Signalpeptidasen MPP, MIP und IMP. Nr. 6-27 sind bekannte mitochondriale Peptidasen. Nr. 28-49 sind Proteine unbekannter Funktion mit einem ähnlichen Phänotyp wie  $\Delta pc1$ . Nr. 50-60 sind Proteine, die mit mitochondrialen Peptidasen interagieren..

Sys-Name: Systematischer Name, Standard: Standard-Name

Nr.	Sys-Name	Standard	Genprodukt
1	YLR163C	MAS1	Untereinheit der Mitochondrialen Prozessierungs Protease (MPP)
2	YHR024C	MAS2	Untereinheit der Mitochondrialen Prozessierungs Protease (MPP)

Nr.	Sys-Name	Standard	Genprodukt
3	YKL134C	<i>MIP1</i>	Mitochondriale Intermediat Protease (MIP)
4	YMR150C	<i>IMP1</i>	Untereinheit der Inneren Membran Protease (IMP)
5	YMR035W	<i>IMP2</i>	Untereinheit der Inneren Membran Protease (IMP)
6	YBL022C	<i>PIM1</i>	ATP-abhängige Protease
7	YBR074W		putative Metallopeptidase
8	YCL044c	<i>MGR1</i>	Untereinheit der i-AAA-Protease
9	YCL057W	<i>PRD1</i>	Zink-Metalloendopeptidase
10	YDL104C	<i>QR17</i>	putative Metallopeptidase
11	YDR375C	<i>BCS1</i>	ATPase (AAA-Familie)
12	YDR430C	<i>MOP112</i>	Lysin-spezifische Metallopeptidase
13	YER017C	<i>YTA10</i>	Untereinheit der m-AAA-Protease
14	YER078C		Metallopeptidase
15	YFR006W		putative X-Pro-Aminopeptidase
16	YFR044C	<i>DUG1</i>	Metallopeptidase
17	YHR113W		Aspartylaminopeptidase
18	YKR087C	<i>OMA1</i>	Metalloendopeptidase
19	YLR299W	<i>ECM38</i>	$\gamma$ -Glutamyltranspeptidase
20	YLR389C	<i>STE23</i>	Metallopeptidase
21	YMR089C	<i>YTA12</i>	Untereinheit der m-AAA-Protease
22	YMR152w	<i>YIM1</i>	Mitochondriale IM Protease
23	YMR154C	<i>RIM13</i>	Calpain-ähnliche Peptidase
24	YNL045W		Leucylaminopeptidase
25	YNL239W	<i>LAP3</i>	Aminopeptidase
26	YNR020C	<i>ATP23</i>	putative Metallopeptidase
27	YPR024W	<i>YME1</i>	Untereinheit der i-AAA-Protease
28	YBR163w	<i>DEM1</i>	unbekannte Funktion
29	YBR238C		unbekannte Funktion
30	YDR014W	<i>RAD61</i>	unbekannte Funktion
31	YDR065w		unbekannte Funktion
32	YDR332w	<i>IRC3</i>	unbekannte Funktion
33	YER077c		unbekannte Funktion
34	YGL057c		unbekannte Funktion
35	YGR102c		unbekannte Funktion
36	YGR150c		unbekannte Funktion
37	YGR270W	<i>YTA7</i>	unbekannte Funktion
38	YKL100C		unbekannte Funktion
39	YLL029W		unbekannte Funktion
40	YLR091w		unbekannte Funktion

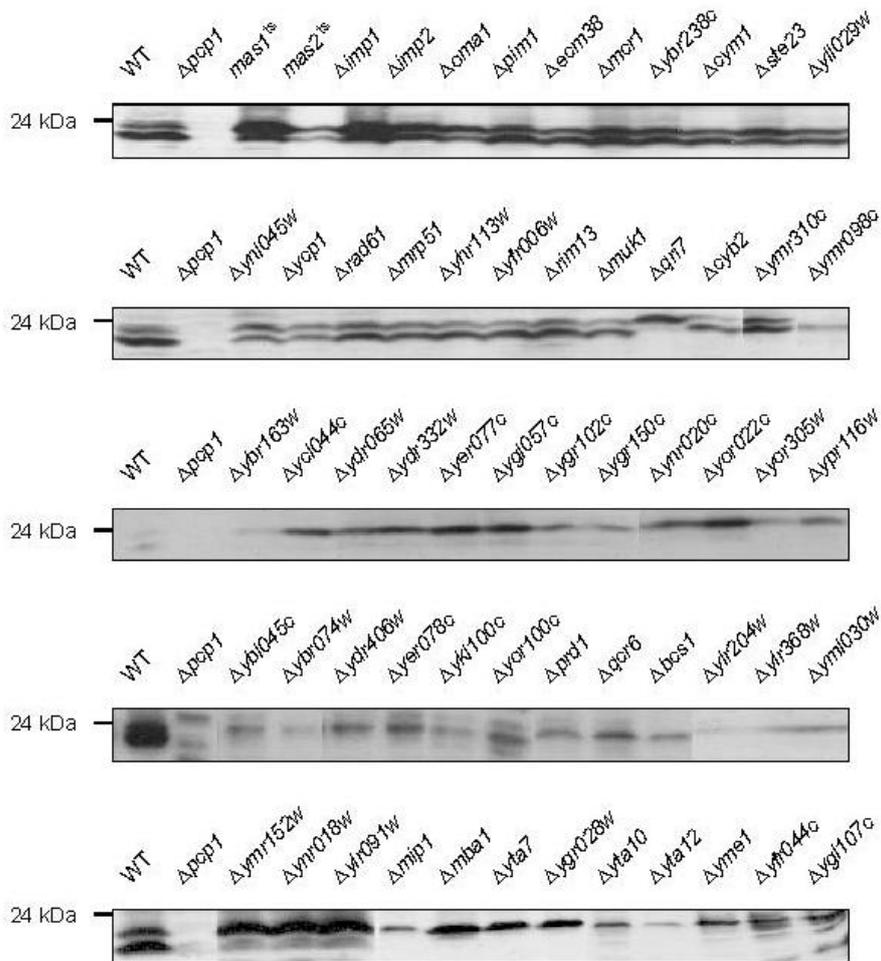
Nr.	Sys-Name	Standard	Genprodukt
41	YLR368w	<i>MDM30</i>	unbekannte Funktion
42	YML030w		unbekannte Funktion
43	YMR098c		unbekannte Funktion
44	YMR310C		unbekannte Funktion
45	YNR018w		unbekannte Funktion
46	YOR022c		unbekannte Funktion
47	YOR305w		unbekannte Funktion
48	YPL070W	<i>MUK1</i>	unbekannte Funktion
49	YPR116w		unbekannte Funktion
50	YBL045C	<i>QCR1</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
51	YBR185C	<i>MBA1</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
52	YDR406W	<i>PDR15</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
53	YFR033C	<i>QCR6</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
54	YGL107C	<i>RMD9</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
55	YGR028W	<i>MSP1</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
56	YKL150W	<i>MCR1</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
57	YLR204w	<i>QRI5</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
58	YML054C	<i>CYB2</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
59	YOR100C	<i>CRC1</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase
60	YPL118W	<i>MRP51</i>	Interaktion mit mitochondrialer Peptidase

Die Peptidasekandidaten standen bis auf die beiden Untereinheiten der MPP (matrix processing peptidase), Mas1p und Mas2p, als Deletionsstämme zur Verfügung und wurden in Glucosemedium (YPGc) angezogen. *MAS1* und *MAS2* sind zwei essentielle Gene und lagen als temperatursensitive Mutanten vor, deren Phänotyp erst durch die Inkubierung bei der permissiven Temperatur von 36°C exprimiert wurde (siehe 2.2.2.2). Die Mitochondrien oder mitochondrialen Membranen der Mutantenstämme sowie des Wildtypstammes und des Deletionsstammes  $\Delta pcp1$  wurden isoliert (siehe 2.2.2.8-9). Die mitochondrialen Proteine wurden in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Das Pcp1-Protein wurde mit einem spezifischen anti-Pcp1-Antikörper detektiert (siehe 2.2.3.7 und 9-10) (Abb. 3.2.1).

Die reife Form von Pcp1p (mPcp1p) wurde im Wildtypstamm mit einer Größe von ~23 kDa nachgewiesen, wohingegen die theoretische Größe des Pcp1-Vorläuferproteins 38,8 kDa beträgt. In der *pcp1*-Deletionsmutante wurde auf Höhe des reifen mPcp1p kein Protein detektiert. In den bekannten Signalpeptidasemutanten *mas1<sup>ts</sup>*, *mas2<sup>ts</sup>*,  $\Delta mip1$ ,

*Δimp1*, *Δimp2*, *Δyta10*, *Δyta12* und *Δyme1* wurde mPcp1p nachgewiesen. Eine größere Variante von Pcp1p wird in diesen Ansätzen mit dem anti-Pcp1-Antikörper nicht nachgewiesen. Auch in den anderen 53 Deletionsmutanten wurde das 23 kDa große mPcp1p detektiert. In keiner dieser Mutanten wurde eine größere Form des Pcp1p vorgefunden.

Die an der Prozessierung von Pcp1p beteiligte(n) Signalpeptidase(n) konnte nicht identifiziert werden. In allen getesteten Mutanten wurde die proteolytisch gereifte Form von Pcp1p detektiert.



**Abb. 3.2.1:** Prozessierung von Pcp1p in diversen Hefemutanten mit bekannter oder möglicher Peptidaseaktivität

Aus 60 Hefemutanten (Tab. 3.2.1), sowie dem Wildtypstamm BY4742 (WT) und  $\Delta pc p 1$  wurden Mitochondrien oder mitochondriale Membranen (untere Reihe, ohne WT und  $\Delta pc p 1$ ) isoliert. Die mitochondrialen Proteine wurden in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing 0,4 \mu\text{m}$ ) transferiert. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Für die Detektion wurde der anti-Pcp1-Antikörper benutzt.

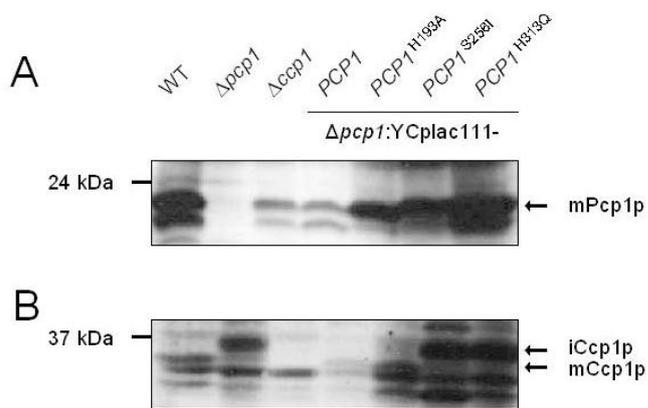
### 3.2.2 Untersuchungen der katalytischen Dyade von Pcp1p in Bezug auf eine autokatalytische Prozessierung

Keine der bekannten Signalpeptidasen oder anderen putativen Peptidasen (siehe 3.2.1) ist für die proteolytische Reifung von Pcp1p verantwortlich. Da das Rhomboid selbst als Signalpeptidase aktiv ist, sollte geprüft werden, ob Pcp1 autokatalytisch prozessiert wird.

Es wurden Punktmutationen in das *PCP1*-Gen eingefügt, durch die entweder das Serin<sup>256</sup> zu Isoleucin oder das Histidin<sup>313</sup> zu Glutamin verändert wurden. Diese beiden Aminosäuren bilden die katalytische Dyade von Pcp1p. Das Histidin<sup>193</sup>, das möglicherweise eine Rolle für die Stabilität und damit auch die Aktivität der katalytischen Dyade spielt, wurde zu Alanin mutiert.  $\Delta pcp1$  wurde mit den mutierten *PCP1*-Genen, ebenso wie dem Wildtypallel transformiert (siehe 2.2.1.13). Die Mitochondrien der transformierten Stämme sowie der Kontrollstämme wurden isoliert. Die mitochondrialen Proteine wurden in doppelter Menge angesetzt und in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen. Eine Hälfte wurde bei 96°C, die andere bei RT inkubiert (siehe 2.2.3.7), bevor sie in einer 12% SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran transferiert wurden. Die Proben, die bei RT inkubiert worden waren, wurden mit dem anti-Pcp1-Antikörper immunodetektiert (Abb. 3.2.2, A) und die anderen mit dem anti-Ccp1-Antikörper (Abb. 3.2.2, B).

In der *pcp1*-Deletionsmutante wurde wie erwartet mit dem anti-Pcp1-Antikörper kein Pcp1p detektiert. Bei ~23 kDa wurde im Wildtyp und auch in  $\Delta ccp1$  reifes mPcp1p nachgewiesen. In den transformierten Stämmen wurde ebenfalls, sowohl für das Wildtyp-*PCP1*-Allel als auch die drei Mutantenallele, das ~23 kDa mPcp1p detektiert (Abb. 3.2.2, A).

Mit dem anti-Ccp1-Antikörper wurde im Wildtyp die ~33 kDa große prozessierte Form von Ccp1p nachgewiesen, wohingegen in  $\Delta pcp1$  das ~36 kDa große Intermediat aufgefunden wurde. In  $\Delta ccp1$  wird keine der beiden Formen detektiert. Bei den transformierten Stämmen wurde sowohl für das Wildtypallel als auch für die Punktmutante *PCP1*<sup>H193A</sup> das reife Ccp1p vorgefunden. In den beiden Mutanten mit mutierter katalytischer Dyade, *PCP1*<sup>S256I</sup> und *PCP1*<sup>H313Q</sup>, wurde das Intermediat iCcp1p detektiert (Abb. 3.2.2, B).



**Abb. 3.2.2: Bedeutung der katalytischen Dyade für die Prozessierung von Pcp1p und der Cytochrom c Peroxidase**

Die Deletionsmutante  $\Delta pc p 1$  wurde mit dem nativen *PCP1*-Gen sowie inserierten Punktmutationen in dessen katalytischer Dyade transformiert. Aus diesen Stämmen, sowie den Mutanten  $\Delta pc p 1$  und  $\Delta cc p 1$  und dem Wildtypstamm BY4742 (WT) wurden die Mitochondrien isoliert und die mitochondrialen Proteine in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing 0,4 \mu m$ ) wurden die Detektionen mit dem anti-Pcp1p-Antikörper (A) oder dem anti-Ccp1p-Antikörper (B) durchgeführt.

mPcp1p: reifes Pcp1p; iCcp1p: intermediäres Ccp1p, mCcp1p: reifes Ccp1p

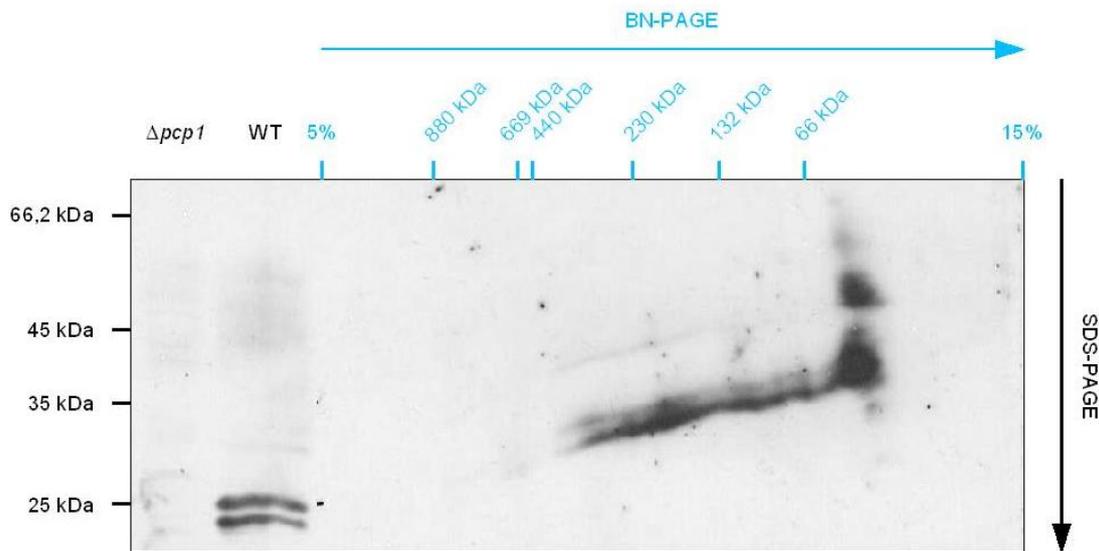
In den mutierten Formen von Pcp1p wurde ebenso wie im Wildtyp die reife Form des Proteins nachgewiesen. Da die Peptidasefunktion bezüglich des Substrates Ccp1p in den Mutanten mit inaktiver katalytischer Dyade deaktiviert war, konnte davon ausgegangen werden, dass Pcp1p sich nicht autokatalytisch prozessiert. Es konnte ausgeschlossen werden, dass die Transformation der Hefe diesen Vorgang beeinflusste, da durch das Einbringen des Wildtypallels in die *pcp1*-Deletionsmutante die Prozessierung des Intermediats von Ccp1p wieder hergestellt war.

### 3.3 Untersuchungen über die Beteiligung von Pcp1p an einem Protein-Komplex

#### 3.3.1 Nachweis von Pcp1p in einem Protein-Komplex der inneren Mitochondrienmembran

Membranproteine sind meistens in homo- oder heteropolymeren Komplexen organisiert und bilden eine funktionelle Einheit, wie z.B. die i-AAA- oder m-AAA-Protease (siehe 1.4) und die Atmungskettenkomplexe in der inneren mitochondrialen Membran (siehe 1.2). SCHÄGGER & PFEIFFER (2000) zeigten darüber hinaus, dass die Atmungskettenkomplexe nicht zufällig verteilt in der inneren Membran vorkommen, sondern so genannte Superkomplexe bilden, bei denen mindestens zwei Atmungskettenkomplexe in einem übergeordneten Komplex organisiert sind.

Zunächst sollte überprüft werden, ob Pcp1p auch in einem Komplex organisiert ist. Dafür wurden Mitochondrien aus dem Hefewildtypstamm isoliert (siehe 2.2.2.8) und die mitochondrialen Membranproteine solubilisiert (siehe 2.2.3.5). Als Detergenz für die Solubilisierung wurde n-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) verwendet, das sich in Versuchen als am Geeignetsten für Pcp1p zeigte. Die solubilierten Proteine und Proteinkomplexe wurden unter nativen Bedingungen in einer BN-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.6). Anschließend wurde die Gelspur ausgeschnitten und in denaturierenden Puffern inkubiert (siehe 2.2.3.6), bevor sie um 90° gedreht auf einem SDS-Gel aufgelegt und die Komplexe in einer SDS-PAGE in ihre Untereinheiten aufgetrennt wurden (siehe 2.2.3.7). Als Kontrollen wurden die Mitochondrien des Wildtypstammes und der *pcp1*-Deletionsmutante mit aufgetragen. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert (siehe 2.2.3.9 und 10) (Abb.3.3.1). In den Kontrollen wurde Pcp1p in den Wildtyp-Mitochondrien bei ~24 kDa detektiert, nicht jedoch in der *pcp1*-Deletionsmutante. Die Lauffront der zweiten Dimension (SDS-PAGE) und somit auch die Pcp1-Bande verlief mit dem Gradienten leicht steigend. Die detektierte Bande reichte von der monomeren Lauffront der BN-PAGE (< 66kDa) bis zu einer Komplexgröße von ca. 350 kDa. Der intensivste Bereich schien bei ca. 200 kDa zu sein. Somit war Pcp1p in der ersten Dimension (BN-PAGE) in einem Größenbereich nachweisbar, der nicht der monomeren Form entspricht. Folglich ist Pcp1p Untereinheit eines Komplexes in der inneren Membran.

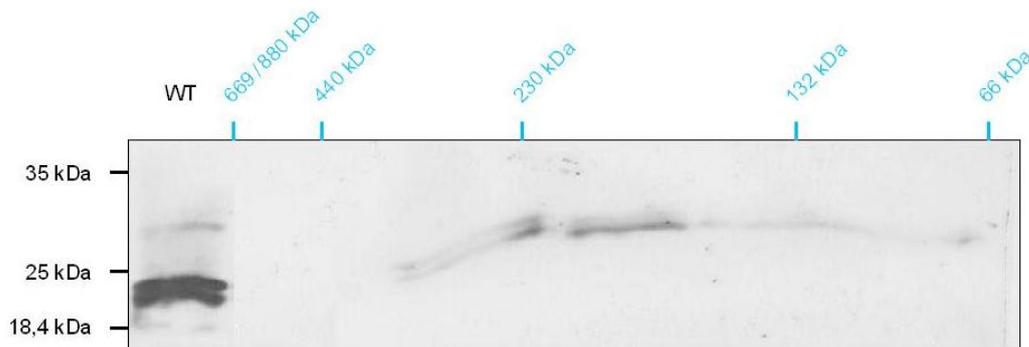


**Abb. 3.3.1: Komplex in der inneren mitochondrialen Membran unter Beteiligung von Pcp1p**

Aus isolierten Mitochondrien des Wildtypstammes BY4741 (WT) wurden die Membranproteine in 1,43% DDM solubilisiert (siehe 2.2.3.5.) und in einer 5-15% BN-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.6). Die Gelspur wurde um 90° gedreht und auf ein 12% SDS-Gel aufgelegt. Als Kontrolle wurden die mitochondrialen Proteine des Wildtypstammes und der Mutante  $\Delta pc p 1$  aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert. Als Größenstandard der BN-PAGE wurde ein selbst angefertigter Marker (siehe 2.2.3.6) eingesetzt, dessen Molekulargewichte blau markiert sind, ebenso wie die Orientierung der BN-Gelspur und die Laufrichtung der BN-PAGE (Pfeil). Für die SDS-PAGE wurde der Proteinmarker Molecular Weight Marker (Fermentas) verwendet, dessen Molekulargewichte links angegeben sind. Die Laufrichtung der SDS-PAGE ist ebenso durch einen Pfeil markiert.

Pcp1p ist zwar in einem Komplex nachweisbar, die Größe war jedoch nicht eindeutig bestimmbar. Ein Grund für die lang gezogene Pcp1p-Bande waren möglicherweise hydrophob bedingte Wechselwirkungen mit anderen Proteinen. Deshalb sollte der Bereich um die 200 kDa in der BN-PAGE besser aufgetrennt werden. Der Gradient des BN-Gels (Abb. 3.3.1) hat in diesem Bereich eine ungefähre Konzentration von 9%, weshalb diesmal statt eines 5-15% BN-Gels ein 9%iges verwendet wurde. Ansonsten wurde der Versuch wie eben für Abb. 3.3.1 beschrieben durchgeführt. Das Ergebnis ist in Abb. 3.3.2 dargestellt

In der Kontrolle (WT) wurde Pcp1p mit einer Größe von ~24 kDa detektiert. In der zweiten Dimension wurde Pcp1p mit einer Größe von ~35 kDa nachgewiesen. Dabei schien der Komplex eine Größe von 180-200 kDa aufzuweisen. Allerdings konnte Pcp1p auch mit einer Komplexgröße zwischen 220-350 kDa und 66-170 kDa nachgewiesen werden. Die Größe des Pcp1p-Komplexes konnte daher nicht genau bestimmt werden.



**Abb. 3.3.2: Bestimmung der Größe des Pcp1-Komplexes**

Aus isolierten Mitochondrien des Wildtypstammes BY4741 (WT) wurden die Membranproteine in 1,43% DDM solubilisiert (siehe 2.2.3.5.) und in einer 9% BN-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.6). Die Gelspur wurde um 90° gedreht und auf ein 12% SDS-Gel aufgelegt. Als Kontrolle wurden die mitochondrialen Proteine des Wildtypstammes aufgetragen. Nach der SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert. Als Größenstandard der BN-PAGE wurde ein selbst angefertigter Marker (siehe 2.2.3.6) eingesetzt, dessen Molekulargewichte blau markiert sind. Für die SDS-PAGE wurde der Proteinmarker Molecular Weight Marker (Fermentas) verwendet, dessen Molekulargewichte links angegeben sind.

### 3.3.2 Einfluss der Transmembrandomänen von Pcp1p auf die Komplexbildung

Pcp1p kommt in einem Komplex unbekannter Größe in der inneren mitochondrialen Membran vor. Dabei kann es sich um einen homopolymeren oder auch heteropolymeren Komplex handeln. Geht man von einem homopolymeren Komplex aus, könnte er sich aus ungefähr 8-12 Untereinheiten zusammensetzen, sofern Pcp1p ca. 25 kDa groß ist und der Komplex eine Größe von 200-300 kDa aufweist. Wenn man Bereiche des Pcp1-Proteins

deletieren würde und das Protein nach wie vor in die IM und den Komplex integriert wird, ist zu erwarten, dass der Komplex kleiner wird und dieser Unterschied auch nachweisbar ist.

Als zu deletierende Bereiche bieten sich u.a. die Transmembrandomänen an, da sie gleichzeitig auch Aufschluss darüber geben können, welche Bereiche von Pcp1p bei der Komplexbildung eine Rolle spielen. Die Aminosäuresequenz von Pcp1p wurde mit verschiedenen Programmen analysiert, die zur Voraussage von Transmembrandomänen eingesetzt werden. Das Ergebnis ist in Tab. 3.3.1 zusammengefasst.

**Tab. 3.3.1: Auswertung der Transmembrandomänen in Pcp1p**

Die Sequenz von Pcp1p (346 AS) wurde mit unterschiedlichen Programmen zur Bestimmung von Transmembrandomänen ausgewertet.  
TM: Transmembrandomäne

Programm	TM1	TM2	TM3	TM3a	TM4	TM5	TM6
TMpred	106-129	145-163	199-219	212-241	246-270	275-303	308-326
TMpred	107-124	144-166	204-227		246-270	275-303	308-326
TMHMM	107-129	144-163	204-226		246-268	275-297	310-327
HMMTOP	102-124	145-162	199-219		246-269	276-295	314-331
SOSUI	106-128	142-164	200-222		245-267	276-298	311-333

Mit den vier verwendeten Programmen wurden für Pcp1p sechs Transmembrandomänen vorausgesagt. Auch die Lokalisierung innerhalb des Proteins war sehr ähnlich. Lediglich mit TMpred wurden zwei Modelle vorausgesagt. In dem zweiten Transmembrandomänenmodell von Pcp1p wurde von sieben Transmembrandomänen ausgegangen, wobei sich die zusätzliche, als TM3a bezeichnete Transmembrandomäne mit der davor gelegenen TM3 überschneidet.

Aufgrund dieser Auswertung wurde im Folgenden von sechs Transmembrandomänen in Pcp1p ausgegangen. Sie sind in Abb. 3.3.3 innerhalb der Pcp1p-Sequenz gekennzeichnet. Als Grundlage wurde das von TMpred vorausgesagte 6-Transmembranmodell verwendet. Die zu deletierenden Bereiche sind zwischen 18 und 30

Aminosäuren groß, was in etwa 2-3,3 kDa entspricht. Im Falle eines homopolymeren Komplexes bestehend aus 8-12 Untereinheiten würde das einen Größenunterschied von 16-26 kDa (8 Untereinheiten) bzw. 24-39,6 kDa (12 Untereinheiten) ausmachen.

1	MSGVSSVMLG LRPATRIFFR SNISVSPSRT FVSYIGRSQS TSILKNAPNL	50
51	EDNVTNLQKI IPKRFFSQTS ILKSRWKPIF NEETTNRVVR LNRFQOYQQQ	100
	<b>TM1</b>	
101	RSGGN <u>PLGSM TILGLSLMAG IYFG</u> SPYLFE HVPPFTYFKT HPK <u>NLVYALL</u>	150
	<b>TM2</b>	
151	<u>GINVAVFGLW QLPKCW</u> RFLQ KYMLLQKDYV TSKISIIGSA FSHQEFWHLG	200
	<b>TM3</b>	
201	MN <u>MLALWSFG TSLATMLGAS NFFSLY</u> MNSA IAGSLFSLWY PKLAR <u>LAIVG</u>	250
	<b>TM4</b> <span style="float: right;"><b>TM5</b></span>	
251	<u>PSLGASGALF GVLGCF</u> SYLF PHAK <u>ILLFVF PVPGGAWVAF LASVAWNAAG</u>	300
	<b>TM6</b>	
301	<u>CALRWGS</u> <u>FDY AAHLGG</u> <u>SMMG VLYGWYI</u> SKA VEKQRQRRLQ AAGRWF*	346

**Abb. 3.3.3: Transmembrandomänen in Pcp1p**

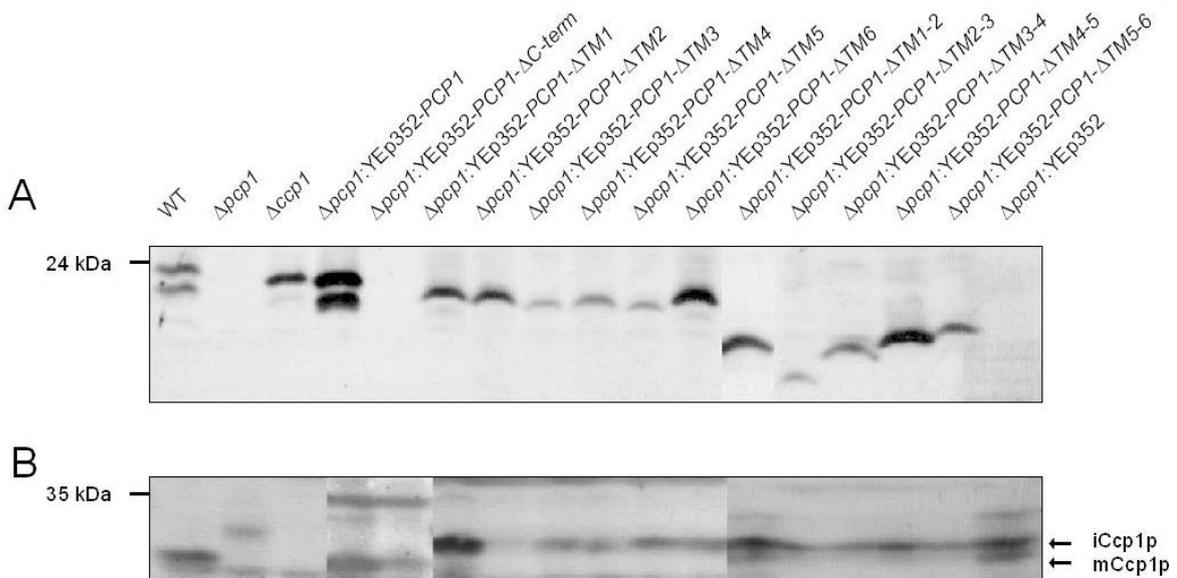
Die mit TMpred für Pcp1p vorausgesagten Transmembrandomänen sind unterstrichen. Rot markiert sind die Bereiche, die in den Transmembran-deletionsmutanten entfernt wurden.

TM: Transmembrandomäne

Es wurden verschiedene Varianten von Pcp1p erstellt, bei denen entweder eine oder zwei benachbarte Transmembrandomänen deletiert wurden. Des Weiteren wurde eine verkürzte Form von Pcp1p konstruiert, bei der der C-Terminus direkt nach der TM6 entfernt worden war. Das *PCP1*-Gen wurde als Kontrolle kloniert. Für die Klonierungen wurde das High-Copy-Hefepiasmid YEp352 verwendet. Die *PCP1*-Varianten wurden mit dem Hefe-eigenen *PCP1*-Promotor kloniert. Die einzelnen Konstrukte sind im Anhang mit ihrer Sequenz dargestellt (siehe Anhang III).

Die *PCP1*-Deletionsmutante wurde mit den jeweiligen *PCP1-ΔTM*-Konstrukten, sowie der *PCP1*-Kontrolle transformiert. Anschließend wurden die Mitochondrien dieser Transformationsstämme isoliert (siehe 2.2.2.8) und die mitochondrialen Proteine in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.7). Als Kontrollen wurden ebenso der Wildtyp,  $\Delta pcp1$  und  $\Delta ccp1$  eingesetzt. Da gleichzeitig die *in vivo*-Aktivität der Konstrukte überprüft werden sollte, wurden die Proben zweifach angesetzt. Eine Hälfte wurde nach Aufnahme der

Proteingemische im 2xSDS-Probenpuffer bei RT, die andere bei 96°C inkubiert (siehe 2.2.3.7). Die durch die SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert (siehe 2.2.3.9) entweder mit dem anti-Pcp1-Antikörper (RT) oder anti-Ccp1-Antikörper (96°C) detektiert (siehe 2.2.3.11) (Abb. 3.3.4).



**Abb. 3.3.4:** Auswirkung der Deletion der Transmembrandomänen in Pcp1p auf die Insertion des Proteins in die innere Membran und auf die Prozessierung der Cytochrom c Peroxidase

Die Deletionsmutante  $\Delta pcp1$  wurde mit dem nativen *PCP1*-Gen, sowie Allelen mit deletierten Transmembrandomänen und C-Terminus transformiert. Aus diesen Stämmen, sowie den Mutanten  $\Delta pcp1$  und  $\Delta ccp1$  und dem Wildtyp BY4742 (WT) wurden die Mitochondrien isoliert und die mitochondrialen Proteine in einem 12% SDS-Gel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) wurden die Detektionen mit dem anti-Pcp1-Antikörper (A) oder dem anti-Ccp1-Antikörper (B) durchgeführt.

C-term: C-Terminus, TM: Transmembrandomäne, iCcp1p: intermediäres Ccp1p, mCcp1p: reifes Ccp1p

Im Wildtypstamm und  $\Delta ccp1$  wurde Pcp1p bei ~23 kDa detektiert (Abb. 3.3.4, A). Das reife Pcp1p wurde auch in der Positivkontrolle der Transformanten nachgewiesen (*PCP1*). In  $\Delta pcp1$  war das Protein nicht nachweisbar, ebenso fehlte es auch in der Negativkontrolle der Transformanten, in der das leere Plasmid YEp352 exprimiert wurde. War der C-Terminus ( $\Delta C-term$ ) deletiert, wurde Pcp1p nicht detektiert. In den

Transmembrandeletionsmutanten hingegen wurde Pcp1p nachgewiesen, unabhängig davon, ob nur eine oder zwei benachbarte TM'S entfernt worden waren ( $\Delta TM1 - \Delta TM6$ ,  $\Delta TM1-2 - \Delta TM5-6$ ).

In den Mutanten mit einer deletierten Transmembrandomäne werden die Proteine theoretisch 2 kDa ( $\Delta TM1$ ) bis 3,3 kDa ( $\Delta TM5$ ) kleiner. Vergleicht man die Pcp1p-Banden dieser Mutanten mit denen des Wildtyps bzw. der Kontrolle *PCP1*, stellte man fest, dass die Mutantenbanden untereinander auf etwa gleicher Höhe detektiert wurden, die insgesamt zum Wildtyp wie erwartet nicht bei 23 kDa, sondern ca. 22 kDa nachgewiesen wurden.

Bei den Doppel-TM-Deletionsmutanten fiel der Größenunterschied deutlicher aus. Im Vergleich zum Wildtyp-Pcp1p fehlten 60 ( $\Delta TM1-2$ ), 84 ( $\Delta TM2-3$ ), 67 ( $\Delta TM3-4$ ), 59 ( $\Delta TM4-5$ ) bzw. 53 ( $\Delta TM5-6$ ) Aminosäuren. Theoretisch sind diese Mutantenproteine 6,6 kDa, 9,2 kDa, 7,4 kDa, 6,5 kDa bzw. 5,8 kDa kleiner als der Wildtyp. Dieser Größenunterschied dieser Mutantenformen war sowohl im Vergleich zum Wildtyp als auch untereinander sichtbar (Abb. 3.3.4, A). In der Mutante  $\Delta TM2-3$  wurde das größte Stück deletiert. Dieses Protein war mit ~19 kDa die kleinste detektierte Pcp1-Variante. Die Proteine  $\Delta TM1-2$  und  $\Delta TM3-4$  waren ca. 20 kDa und  $\Delta TM5-6$  war ca. 21 kDa groß,  $\Delta TM4-5$  lag von der Größe her dazwischen (~20,5 kDa).

Wenn man ein oder zwei benachbarte Transmembrandomänen in Pcp1p deletiert, hat das einen Einfluss auf die Größe des Proteins im Verhältnis zum Wildtyp und auch untereinander. Auf den Import von Pcp1p in die Mitochondrien haben die Deletionen jedoch keinen Einfluss. Wenn der C-Terminus deletiert ist, wird Pcp1p nicht mehr nachgewiesen.

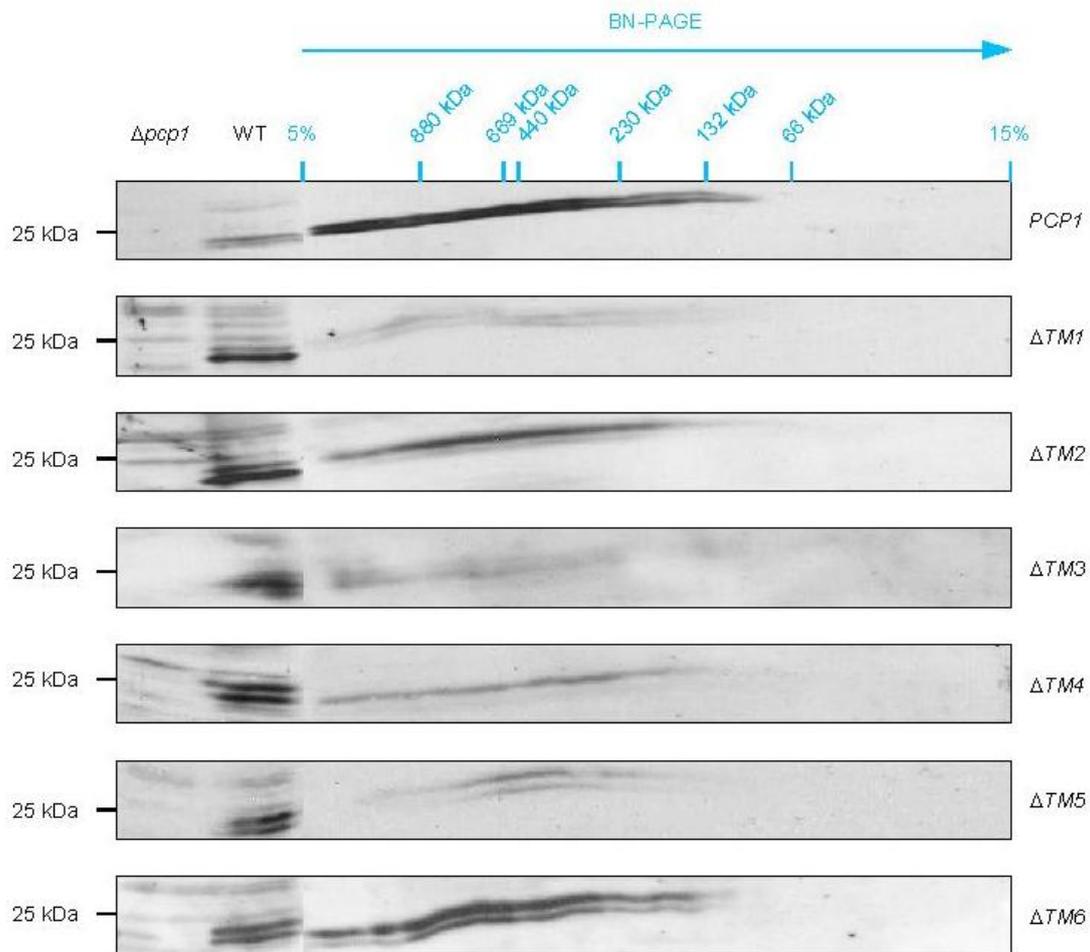
Welchen Einfluss haben die Deletionen der Transmembrandomänen oder des C-Terminus auf die Aktivität von Pcp1p? Da Pcp1p das Ccp1-Intermediat zur reifen Form prozessiert, wurde zur Beantwortung dieser Frage das Substrat Ccp1p untersucht (Abb. 3.3.4, B).

Im Wildtyp wurde das 32 kDa große reife mCcp1p nachgewiesen, in  $\Delta pcp1$  hingegen das 33 kDa große Intermediat iCcp1p. In  $\Delta ccp1$  wurde wie erwartet keine der beiden Formen detektiert. Nach der Expression des *PCP1*-Gens in  $\Delta pcp1$  wurde das Ccp1-Intermediat wieder proteolytisch in die reife Form überführt. Auch in der Mutante *pcp1*- $\Delta$ C-Term wurde mCcp1p gebildet. Die Mutante war also auch proteolytisch aktiv, obwohl die Rhomboidprotease nicht mit dem anti-Pcp1-Antikörper nachgewiesen werden konnte.

Eine Erklärung hierfür war, dass der Antikörper den C-Terminus von Pcp1p erkennt und daher nicht an Pcp1p- $\Delta$ C-term binden kann.

In allen Transmembrandeletionsmutanten wurde nicht das reife, sondern das intermediäre Ccp1p nachgewiesen. Das bedeutete, dass Pcp1p durch die Deletion einer oder zwei benachbarter Transmembrandomänen seine Aktivität verlor. In der Mutante Pcp1p- $\Delta$ TM1-2 wurde mit dem anti-Ccp1p-Antikörper außer iCcp1p auch noch eine kleinere, schwächere Bande detektiert. Es könnte sich dabei um mCcp1p handeln, allerdings wurde eine identische Bande auch in der Negativkontrolle YEp352 vom Antikörper erkannt.

Es konnte gezeigt werden, dass Pcp1p auch nach der Deletion einer oder mehrerer Transmembrandomänen immer noch in den Mitochondrien detektierbar war. Es sollte nun überprüft werden, welchen Einfluss diese Deletionen auf den Pcp1p-Komplex haben. Dazu wurden zunächst aus den mit *PCP1* bzw. *PCP1- $\Delta$ TM1* bis  $\Delta$ TM6 transformierten  *$\Delta$ pcp1*-Stämmen die Mitochondrien isoliert (siehe 2.2.2.9) und die Membranproteine mit DDM solubilisiert (2.2.3.5). Anschließend wurden die Proteinkomplexe in einer 5-15% BN-PAGE aufgetrennt. Die Gelspuren wurden ausgeschnitten und in einer Lösung unter denaturierenden Bedingungen inkubiert (siehe 2.2.3.6), bevor je ein Gelstreifen, um 90°C gedreht, auf einem 12%igen SDS-Gel aufgelegt wurde und die Proteinkomplexe in einer SDS-PAGE in ihre Untereinheiten aufgetrennt wurden (siehe 2.2.3.7). Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert (Abb. 3.3.5).



**Abb. 3.3.5: Einfluss von Transmembrandeletionen in Pcp1p auf die Komplexbildung**

Die Deletionsmutante  $\Delta pcp1$  wurde mit dem nativen *PCP1*-Gen oder den Mutantenallelen mit deletierten Transmembrandomänen transformiert. Aus diesen Stämmen wurden die Mitochondrien isoliert. Die mitochondrialen Membranproteine wurden in 1,43% DDM solubilisiert (siehe 2.2.3.5.) und in einer 5-15% BN-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.6). Als Größenstandard der BN-PAGE wurde ein selbst angefertigter Marker (siehe 2.2.3.6) eingesetzt, dessen Molekulargewichte blau markiert sind. Die Gelspuren wurden um 90° gedreht und jeweils auf ein 12% SDS-Gel aufgelegt. Als Kontrolle wurden die mitochondrialen Proteine des Wildtypstammes (WT) und der *pcp1*-Deletionsmutante aufgetragen. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) wurden die Detektionen mit dem anti-Pcp1-Antikörper durchgeführt. Die Laufrichtung der BN-PAGE ist durch den blauen Pfeil markiert.

TM: Transmembrandomäne

In der Wildtypkontrolle wurde Pcp1p jeweils mit einer Größe von 24 kDa nachgewiesen, diese Bande fehlte in der Negativkontrolle  $\Delta pcp1$ . Nachdem die mitochondrialen

Proteinkomplexe der transformierten Stämme in einer BN-PAGE aufgetrennt worden waren, wurde Pcp1p in der zweiten Dimension mit einer Größe von ~24-26 kDa nachgewiesen. Dabei reichte die detektierte Bande von einer Komplexgröße von ~100 kDa bis zur oberen Grenze des Gels bei 5% (~2000 kDa). Pcp1p war sowohl im Wildtyp (*PCP1*) als auch in den einzelnen Transmembrandomänendeletionsmutanten ( $\Delta TM1$  bis  $\Delta TM6$ ) nachweisbar. Die Ausprägung der detektierten Pcp1p-Bande war dabei unterschiedlich stark, wobei es sich wahrscheinlich um eine versuchsbedingte Variation handelte.

Vergleicht man die Pcp1-Banden der zweiten Dimension miteinander, ließen sich keine signifikanten Komplexgrößenunterschiede zwischen den Deletionsmutanten im Vergleich zum Wildtyp erkennen. Pcp1p wurde in einem Komplex bis ca. 2000 kDa nachgewiesen. Ein Größenunterschied von theoretischen 39,6 kDa (s.o.) konnte in dieser Auflösung und Komplexgröße nicht detektiert werden. Es konnte mit dieser Methode nicht eindeutig geklärt werden, ob es sich bei dem Komplex um einen homo- oder einen heteropolymeren Pcp1p-Komplex handelt. Die Deletion einzelner Transmembrandomänen von Pcp1p hatte keinen Einfluss auf die Komplexbildung.

Die Deletion zweier benachbarter Transmembrandomänen der Rhomboidprotease Pcp1p hatte auch keinen Einfluss auf die Größe des Proteinkomplexes, noch auf dessen Bildung (Tab. 3.3.2). Es wurde in allen Doppeltransmembrandeletionsmutanten ein Pcp1-Komplex detektiert, der dem des Wildtyps (siehe dazu  $\Delta pcp1:YEp352-PCP1$ , Abb.3.3.5) entsprach (Daten nicht gezeigt).

**Tab. 3.3.2: Zusammenfassung der Untersuchungen der Doppeltransmembran-deletionsmutanten von Pcp1p**

Die Größe des Pcp1p-Komplexes und dessen Bildung wurde wie bereits für die Transmembrandeletionsmutanten auch für die Doppeltransmembrandomänenmutanten von Pcp1p untersucht. Dafür wurden wie bereits oben beschrieben die Membranproteine mit DDM solubilisiert und in einer BN-PAGE aufgetrennt. In der zweiten Dimension (SDS-PAGE) wurde dann das Pcp1p-Protein detektiert.  
TM: Transmembrandomäne

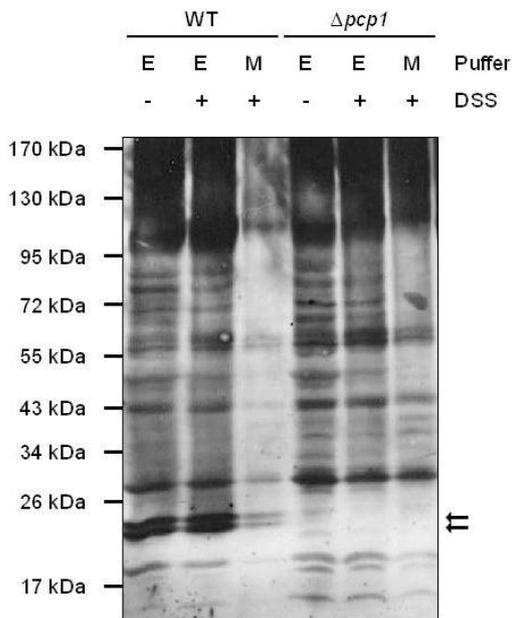
Deletierte TM	Komplex	Komplexgröße
1 & 2	ja	bis über 1000 kDa
2 & 3	ja	bis über 1000 kDa
3 & 4	ja	bis über 1000 kDa
4 & 5	ja	bis über 1000 kDa
5 & 6	ja	bis über 1000 kDa

### 3.3.3 Crosslinking-Versuche zur Identifizierung des Pcp1p-Komplexes

Die chemische Quervernetzung von Proteinen (Crosslinking) ist eine Möglichkeit, Interaktionspartner z.B. eines Komplexes zu identifizieren. Über den Crosslinker werden Proteine, die in sehr engem Kontakt zueinander stehen (wie z.B. in einem Komplex) miteinander kovalent verbunden. Es sollte überprüft werden, ob durch die Verwendung eines Crosslinkers der Pcp1p-Komplex nachweisbar ist.

Als Crosslinker wurde Disuccinimidylsuberat (DSS) verwendet, da es sich hierbei um ein membranpermeables Reagenz handelt. Die reaktiven Gruppen des Crosslinkers sind N-Hydroxysuccinimidester (NHS), die mit primären Amidgruppen, wie sie z.B. in den Seitenketten von Lysin auftreten, kovalente Bindungen ausbilden. In pPcp1p treten 15 Lysine auf, die im gesamten Protein verteilt sind, so dass es zu solchen Bindungen kommen kann.

Zunächst einmal wurden die Mitochondrien aus dem Wildtypstamm und der *pcp1*-Deletionsmutante isoliert und die mitochondrialen Proteine quervernetzt (siehe 2.2.2.9 und 2.2.3.2). Anschließend wurden die Proteine in einem 5-15% SDS-Gradientengel aufgetrennt (siehe 2.2.3.7) und dann auf eine Nitrocellulosemembran transferiert. Die Proteine wurden mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert (siehe 2.2.3.11) (Abb. 3.3.6).



**Abb. 3.3.6: Quervernetzung von Pcp1p im Wildtypstamm**

Aus dem Hefe-Wildtypstamm BY4742 und der Deletionsmutante  $\Delta pcp1$  wurden Mitochondrien isoliert (siehe 2.2.2.8). Die Mitochondrien wurden entweder in SME- oder SMM-Puffer aufgenommen und mit Disuccinimidylsuberat (+, DSS) inkubiert (siehe 2.2.3.2). Anschließend wurden die mitochondrialen Proteine in einem 5-15% SDS-Gel aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Nach dem Transfer auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) wurde die Detektion mit dem anti-Pcp1-Antikörper durchgeführt.

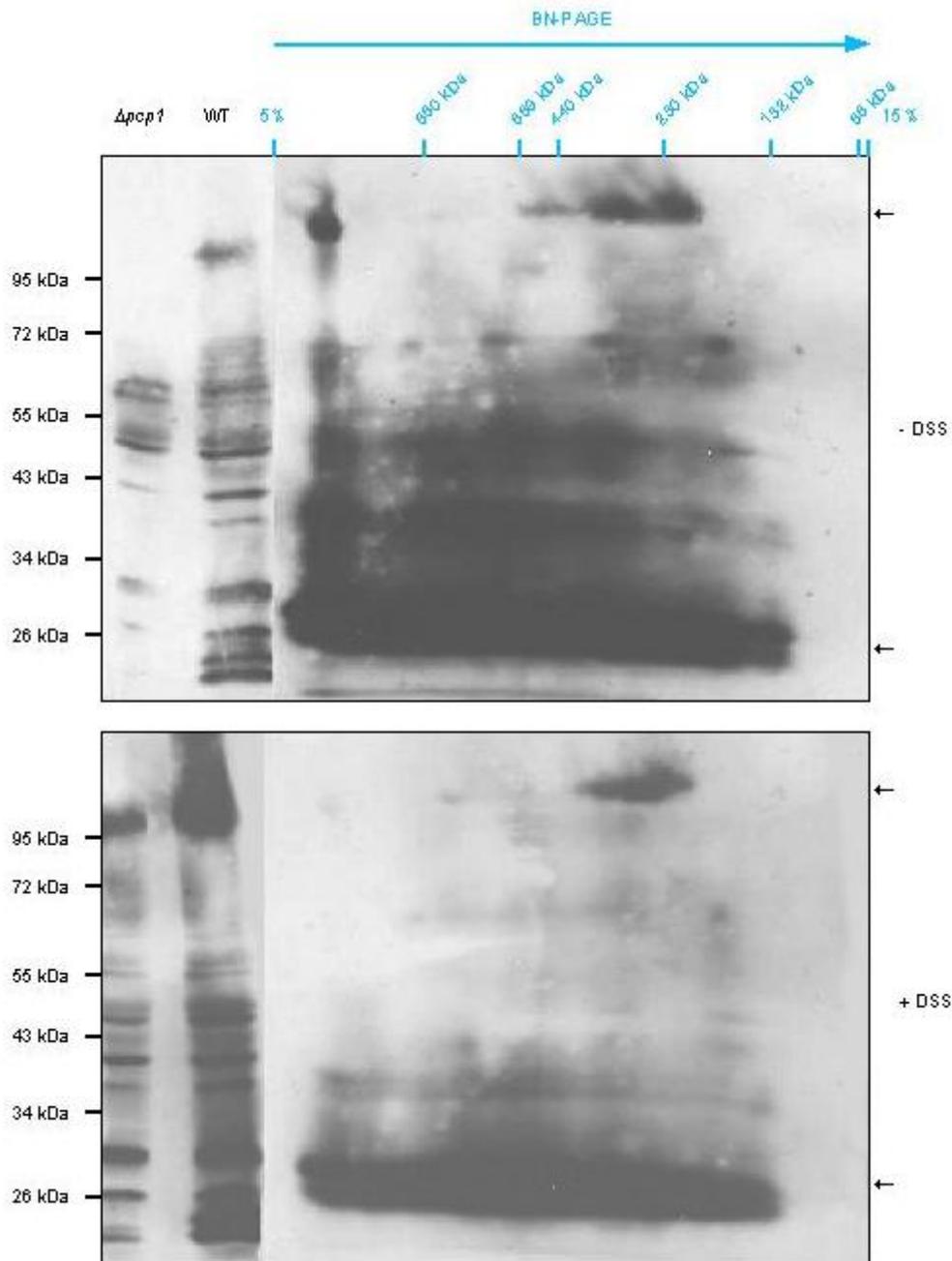
E: SME-Puffer, M: SMM-Puffer, Pcp1p: reifes, nicht quervernetztes Pcp1p

Pcp1p wurde im Wildtypstamm als Doppelbande bei  $\sim$ 24 kDa nachgewiesen. In  $\Delta pcp1$  fehlen diese Banden. Vergleicht man im Wildtyp die detektierten Bandenmuster, traten keine höher molekularen Banden in den gecrosslinkten Ansätzen auf, die nicht auch in der unbehandelten Kontrolle nachweisbar sind. Obwohl von gleichen Mengen Protein in den Ansätzen ausgegangen worden war, waren die detektierten Banden mit dem SME-Puffer deutlich intensiver als die mit dem SMM-Puffer. Vergleicht man im Wildtyp den behandelten und unbehandelten Ansatz mit dem SME-Puffer, waren keine Unterschiede in der Intensität der Pcp1p-Doppelbande erkennbar.

Erfahrungsgemäß werden nur ca. 5-10% des zu untersuchenden Proteins quervernetzt. Es sollte nun in einem weiteren Versuch überprüft werden, ob nach einer BN-PAGE in der

zweiten Dimension neben der monomeren Form von Pcp1p auch gecrosslinkte Produkte angereichert sind. Da DSS ein nicht-spaltbarer Crosslinker ist, sollten diese Komplexe die denaturierenden Prozeduren überstehen.

Aus dem Stamm  $\Delta pcp1$ :YEp352-PCP1 wurden die Mitochondrien isoliert (siehe 2.2.2.9). Die mitochondrialen Proteine wurden anschließend mit DSS gecrosslinkt, mit DMM solubilisiert und in einer BN-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.2 und 2.2.3.5 und 6). Die Gelspuren wurden ausgeschnitten und nach einer denaturierenden Prozedur (siehe 2.2.3.6) jeweils um 90°C gedreht auf ein 12% SDS-Gel aufgelegt und in einer SDS-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.7). Die Proteine wurden dann auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti-PCP1-Antikörper detektiert (siehe 2.2.3.9 und 11) (Abb. 3.3.7).



**Abb. 3.3.7: Auswirkungen auf den Pcp1-Komplex durch die Quervernetzung**

Die Hefemutante  $\Delta pcp1$  wurde mit *PCP1* transformiert. Die Mitochondrien wurden isoliert (siehe 2.2.2.8) und in SME-Puffer aufgenommen und die Proteine mit Disuccinimidylsuberat (DSS) quervernetzt (siehe 2.2.3.2). Die mitochondrialen Membranproteine wurden in 1,43% DDM solubilisiert (siehe 2.2.3.5.) und in einer 5-15% BN-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.6). Als Größenstandard der BN-PAGE wurde ein selbst angefertigter Marker (siehe 2.2.3.6) eingesetzt, dessen Molekulargewichte blau markiert sind. Die Gelspuren wurden um 90° gedreht und jeweils auf ein 12% SDS-Gel aufgelegt. Als Kontrolle wurden die mitochondrialen Proteine des Wildtyp- (WT) und  $\Delta pcp1$ -Stammes aufgetragen. Als Größenstandard wurde der

Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Eine SDS-PAGE wurde durchgeführt und die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) transferiert. Die Detektion wurde mit dem anti-Pcp1-Antikörper durchgeführt. Der blaue Pfeil markiert die Laufrichtung der BN-PAGE.

In der Positivkontrolle (WT) wurde Pcp1p mit einer Größe von ~24 kDa detektiert. Dieses Protein wird in der Negativkontrolle ( $\Delta pcp1$ ) nicht nachgewiesen. In der zweiten Dimension wurde Pcp1p sowohl in dem gecrosslinkten Ansatz als auch der unbehandelten Kontrolle mit gleicher Größe wie die Positivkontrolle detektiert. Die Bande erstreckte sich dabei von einer Komplexgröße zwischen 130 kDa bis über 1000 kDa. Der anti-Pcp1-Antikörper erkannte noch eine weitere Bande auf Höhe der 200 kDa-Komplexe mit einer Größe von über 95 kDa. Allerdings trat diese Bande sowohl mit, als auch ohne Crosslinking auf. Auch in der BN-PAGE wurden keine Pcp1-spezifischen Komplexe nachgewiesen, die auf der Quervernetzung der Proteine beruhten.

### 3.3.4 Untersuchung eines Pcp1p/m-AAA-Protease-Superkomplexes

Als mögliche Untereinheiten des Pcp1p-Komplexes kommt die m-AAA-Protease in Frage. Sie ist in der inneren Membran lokalisiert und in proteolytische Prozesse involviert. Darüber hinaus ist die m-AAA-Protease zusammen mit der Pcp1-Protease für die Prozessierung von Ccp1p verantwortlich (ESSER *et al.* 2002).

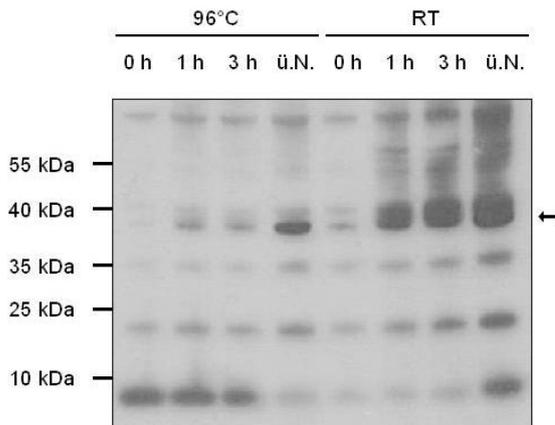
Es sollte untersucht werden, ob Pcp1p in einem Komplex mit der m-AAA-Protease vorkommt. Dazu wurden die Mitochondrien aus der Deletionsmutante  $\Delta yta10$  isoliert (siehe 2.2.2.8). Die mitochondrialen Membranproteine wurden mit DDM solubilisiert (siehe 2.2.3.5) und anschließend in einer BN-PAGE aufgetrennt (siehe 2.2.3.6). Die Gelspur wurde ausgeschnitten und in einer Lösung unter denaturierenden Bedingungen inkubiert (siehe 2.2.3.6), bevor sie um 90° gedreht auf ein SDS-Gel aufgelegt wurde. Die Proteinkomplexe wurden in der SDS-PAGE in ihre Untereinheiten aufgetrennt (siehe 2.2.3.7), die anschließend auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert wurden (siehe 2.2.3.8 und 9) (Abb. 3.3.8).



bestehend aus einem Serin und einem Histidin gemein ist. Darüber hinaus findet man in Abhängigkeit des Verwandtschaftsgrades mehr oder weniger stark konservierte Bereiche, die sich über das gesamte Protein erstrecken (LEMBERG & FREEMAN, 2007). Teilweise können Rhomboide sich ersetzen, so dass sie dann in einem anderen Organismus dessen Aufgabe übernehmen. Das mitochondriale Rhomboid des Menschen kann z.B. die Funktion des Hefeenzym übernehmen (MCQUIBBAN *et al.*, 2003).

Eine bekannte Rhomboidprotease aus *E. coli* ist GlpG, welche in der cytosolischen Membran lokalisiert ist. Sie weist u.a. auch mit Pcp1p Sequenz- und Strukturhomologien auf. Es sollte zunächst geprüft werden, ob Pcp1p nach der Expression in *E. coli* vom Organismus in die cytosolische Membran integriert wird.

Dafür wurde das pET-Expressions-System von Novagen verwendet. Das *PCP1*-Gen wurde auf zweierlei Weise in den pET-30a(+)-Vektor kloniert: Im ersten Fall wird nur Pcp1p gebildet, im zweiten Fall verfügt das Protein über einen N-terminalen His-Tag, der aufgrund einer Enterokinaseschnittstelle direkt vor Pcp1p abspaltbar ist (siehe Anhang IV). Der Rosetta(DE3)-Stamm (Novagen) wurde mit pET-30a(+)-*HIS-PCP1* transformiert und die Expression induziert (siehe 2.2.2.4). Dabei wurden jeweils nach 0 h, 1 h, 3 h und ü.N. Proben genommen und mit einem 4-12% Bis-Tris-Gel von invitrogen, Carlsbad, USA analysiert (siehe Beschreibung Abb. 3.4.1). Es war bekannt, dass Pcp1p beim Denaturieren durch Erhitzen aggregiert, weshalb es mit dem spezifischen Antikörper schlecht nachgewiesen kann. Da aber nicht bekannt war, wie es sich in *E. coli* verhält, wurde die Proben vor der SDS-PAGE sowohl bei 96°C als auch bei RT inkubiert. Da nach einer Coomassie-Färbung des Gels kein Expressionsmuster erkennbar war (Daten hier nicht gezeigt), wurden die aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert (siehe 2.2.3.8-9 und 11) (Abb. 3.4.1).



**Abb. 3.4.1: Expression von PCP1 in *E. coli***

Der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) wurde mit pET-30a(+)-*HIS-PCP1* transformiert und die Expression mit 1 mM IPTG induziert (siehe 2.2.2.4). Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen von je 1 ml Kultur sedimentiert und in 100 µl Lysispuffer (0,1 M NaOH, 1% SDS) aufgenommen. Je 10 µl dieser Fraktion wurden in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und entweder 5 min bei 96°C oder 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit einem 4-12% BisTris-Gel (NuPAGE, invitrogen) analysiert (MES-Puffer, SDS-PAGE nach Angaben des Herstellers). Als Größenstandard wurde der Proteinmarker PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran (Ø 0,4 µm) transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert. Der Pfeil indiziert das überexprimierte Pcp1-Protein.

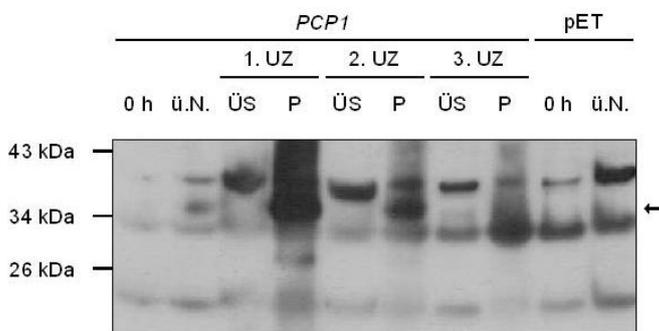
RT: Raumtemperatur; ü.N.: über Nacht

Pcp1p hat eine theoretische Größe von 38 kDa. Der N-terminale His-Tag ist inklusive der Zwischensequenz 43 Aminosäuren lang, was ca. 4,7 kDa entspricht. His-Pcp1p hätte demnach eine theoretische Größe von 42,7 kDa. Mit dem anti-Pcp1-Anikörper wurde ein ~38 kDa großes Protein detektiert. Die Intensität der Bande nahm in den bei 96°C inkubierten Proben langsam zu und war in dem ü.N.-Ansatz am Stärksten ausgeprägt. Bei den bei RT inkubierten Ansätzen war die Intensität dieser Bande schon eine Stunde nach der Induktion genauso ausgeprägt vorhanden, wie in der ü.N.-Probe.

Die *HIS-PCP1*-Expression in *E. coli* führte zu einem bei ~38 kDa detektierbaren Protein. Nach Induktionsbeginn nahm die Proteinmenge zu und ist in der ü.N.-Kultur am Größten.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass His-Pcp1p in *E. coli* exprimiert wird, sollte geprüft werden, ob Pcp1p in die cytosolische Membran integriert wird. Dafür wurde der *E. coli*-Stamm Rosetta(DE3) mit pET-30a(+)-*PCP1* transformiert und die Expression in einer

Flüssigkultur induziert (siehe 2.2.2.4). Als Expressions-Kontrolle wurde das gleiche mit dem leeren Vektor pET-30a(+) durchgeführt. Aus den Zellen der ü.N.-Kultur wurden die Membranen isoliert (siehe 2.2.2.7). Dabei wurde für die spätere Analyse jeweils eine Probe von den Sedimenten und Überständen der einzelnen Aufreinigungsschritte genommen. Die Proben sowie die Membranen (Sediment nach der letzten Ultrazentrifugierung) wurden in einem 4-12% Bis-Tris-Gel von invitrogen, Carlsbad, USA analysiert. Die aufgetrennten Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert (Abb. 3.4.2).



**Abb. 3.4.2:** Lokalisierung von Pcp1p in *E. coli*

Der *E. coli*-Stamm Rosetta (DE3) wurde mit pET-30a(+)-PCP1 (PCP1) oder dem leeren Vektor (pET) transformiert. Die Expression wurde mit 1 mM IPTG induziert (siehe 2.2.2.4). Anschließend wurden die Membranen dieser Zellen isoliert (siehe 2.2.2.7). Die Membranenfraction entspricht dem Sediment nach der 3. Ultrazentrifugierung. Die einzelnen Fraktionen wurden in 2xSDS-Probenpuffer aufgenommen und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Proteine mit einem 4-12% BisTris-Gel (NuPAGE, invitrogen) analysiert (MES-Puffer, SDS-PAGE nach Angaben des Herstellers). Als Proteinstandard wurde der PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Fermentas) verwendet. Die Proteine wurden auf eine Nitrocellulosemembran ( $\varnothing$  0,4  $\mu$ m) transferiert und mit dem anti-Pcp1-Antikörper detektiert. Der Pfeil kennzeichnet das überexprimierte Pcp1-Protein.

ü.N.: über Nacht, ÜS: Überstand, P: Sediment (Pellet), UZ: Ultrazentrifugierung

Nach der Induktion von pET-30a(+)-PCP1 und pET-30a(+) wurde lediglich in dem PCP1-Ansatz ü.N. eine Extra-Bande detektiert, die ~36 kDa groß ist. Da die Bande nur in den induzierten Pcp1-Proben nachgewiesen wurde, handelte es sich um Pcp1p. Nach der ersten Ultrazentrifugierung wurde Pcp1p nur im Sediment, nicht aber im Überstand detektiert. Da sich im Sediment unter anderem auch die „Inclusionbodies“ befanden, war davon auszugehen, dass das Pcp1p dort eingeschlossen wurde. Nach der zweiten

Ultrazentrifugierung war ebenfalls im Sediment Pcp1p detektierbar, nicht aber im Überstand. Möglicherweise war bei der Präparation nach der ersten Ultrazentrifugierung etwas von dem Sediment mit in den Überstand gelangt. Durch die dritte Ultrazentrifugierung wurden die Membranen sedimentiert. In dieser Fraktion war Pcp1p nicht detektierbar. Pcp1p wurde von *E. coli* nicht in die cytosolische Membran integriert, sondern in den Inclusionbodies eingeschlossen. Eine Präparation der „Inclusionbodies“ war im Rahmen dieser Dissertation nicht angedacht.

## 4. Diskussion

### 4.1 Wachstum der Zellen beeinflusst die Expression von *PCP1*

Die Rhomboide stellen eine Klasse der intramembranen Serinproteasen dar. Das aktive Zentrum, bestehend aus einem Serin und einem Histidin, ist in Transmembrandomänen lokalisiert, und auch die Substrate dieser Proteasen werden innerhalb der Membran gespalten (FREEMAN 2008). Die mitochondrialen Rhomboide gehören zur PARL-Familie, so benannt nach dem mitochondrialen Rhomboid des Menschen.

Ein bekanntes Substrat der mitochondrialen Rhomboidprotease Pcp1p von Hefe ist die dynamin-ähnliche GTPase Mgm1 (Mitochondrial genome maintenance) (HERLAN *et al.* 2003, MCQUIBBAN *et al.* 2003). Mgm1 kommt in der Zelle in einer längeren (l-Mgm1) und einer kürzeren Form (s-Mgm1) vor, die beide für die Fusionierung der Mitochondrien notwendig sind. Der genaue Mechanismus hierfür ist noch nicht geklärt (HERLAN *et al.*, 2004), jedoch ist bekannt, dass Pcp1p durch proteolytische Spaltung die lange Form in die kurze Form s-Mgm1 umwandelt (HERLAN *et al.* 2003, MCQUIBBAN *et al.* 2003). Interessanterweise ist diese Spaltung abhängig von dem ATP-Gehalt in der Zelle. Mitochondrien mit geschädigter mtDNA werden auf diese Weise aus dem mitochondrialen Netzwerk ausgeschlossen und nicht weitervererbt. Eine Abnahme der Spaltung wird auch in Hefekulturen beobachtet, wenn sie die logarithmische Wachstumsphase verlassen. Die Spaltungsrate von l-Mgm1p nimmt von ca. 95% auf 50% ab, wohingegen die Gesamt-Mgm1p-Menge konstant bleibt. MCQUIBBAN *et al.* (2003) beschreiben, dass gleichzeitig die Menge an Pcp1p sinkt, ein Befund, der in dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte.

In dieser Arbeit wird zunächst die Expression von *PCP1* auf der RNA-Ebene untersucht. Dabei wird die Transkriptmenge während der unterschiedlichen Wachstumsphasen betrachtet: früh-logarithmisch, logarithmisch, spät-logarithmisch und stationär (Abb. 3.1.1). Die Menge der *PCP1*-mRNA steigt nach Verlassen der früh-logarithmischen Wachstumsphase an und ist in der logarithmischen am höchsten. Beim Übergang in die stationäre Phase nimmt die Expression ab, bis das Transkript nicht mehr nachgewiesen werden kann (Abb. 3.1.2). Diese Beobachtungen stehen im Einklang mit den von MCQUIBBAN *et al.* (2003) beschriebenen Ergebnissen.

Untersuchungen zur Expression von Pcp1p auf Proteinebene stimmen jedoch nicht mit denen der RNA-Ebene überein. In dieser Arbeit wird gezeigt, dass in der stationären Phase am meisten Pcp1p detektiert wird. Nach der früh-logarithmischen Wachstumsphase nimmt die Menge an Pcp1p sogar stark ab, bevor sie in der spät-logarithmischen Phase wieder zunimmt (Abb. 3.1.7). Ein Grund dafür könnte die Stabilität des Proteins sein, so dass es sich ansammeln kann und in der stationären Phase in größerer Menge vorkommt. Denkbar wäre auch, dass die Prozessierung von Mgm1p nicht nur, wie von MCQUIBBAN *et al.* (2003) vorgeschlagen, durch die Expression von Pcp1p reguliert wird, sondern auch durch andere Signalwege beeinflusst wird, die direkt oder indirekt Pcp1p aktivieren. Bisher ist noch nicht genau bekannt, wie die Rhomboid-Proteasen reguliert werden bzw. auf ihre Aktivität Einfluss genommen wird (URBAN 2006). Eine andere Möglichkeit für diese Abweichungen von den Ergebnissen von MCQUIBBAN *et al.* (2003) könnte in der Durchführung des Versuches begründet sein, da hier nicht zu bestimmten Zeitpunkten Proben der Kultur genommen wurden, sondern es sich um vier einzelne Kulturen handelt, die unter gleichen Bedingungen angeimpft worden waren. Dagegen spricht allerdings, dass in den folgenden Nachweisen von Pcp1p die Mitochondrien ca. 17-20 h nach dem Animpfen isoliert wurden. Obwohl sich die Kulturen zu diesem Zeitpunkt bereits in der stationären Phase befinden (Abb. 3.1.1), kann Pcp1p zumeist mit einer vergleichbaren Intensität nachgewiesen werden (siehe z.B. Abb. 3.2.1).

Ein weiteres bekanntes und Namensgebendes Substrat von Pcp1p ist die Cytochrome c Peroxidase, die am Abbau der für die Zelle schädlichen Wasserstoffperoxydradikale beteiligt ist (ESSER *et al.*, 2002). Induziert man H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress, wäre eine denkbare Antwort der Zelle eine vermehrte Expression von Ccp1p, verbunden mit einer erhöhten proteolytischen Spaltungsrate und dadurch bedingter erhöhter Bedarf an Pcp1p. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induziertem Stress auf die Expression von Pcp1p untersucht. Die Expressionsrate von *PCP1* nach der Induktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress ist mit der der nicht-induzierten Kontrolle vergleichbar (Abb. 3.1.2 und 4). Auf der Proteinebene ist ebenfalls keine Zunahme von Pcp1p in dem induzierten Ansatz im Vergleich zur Kontrolle detektierbar (Abb. 3.1.7). In beiden Ansätzen werden vergleichbare Mengen Pcp1p nachgewiesen. Erhöhte Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> haben zwar eine Auswirkung auf die Überlebensrate der Hefezellen, die mit zunehmender Konzentration abnimmt bis hin zum Absterben (Abb. 3.1.3), nicht aber auf die Menge an *PCP1*-mRNA und Protein.

Generell ist nicht davon auszugehen, dass Pcp1p in einen „Stress-Response Signalling Pathway“ involviert ist, denn auch die Induktion von Hitzestress führte nicht zu einem

Anstieg des *PCP1*-Transkripts (Abb. 3.1.5-6). FREEMAN (2008) beschreibt, dass das physiologisch relevante Substrat des Hefeenzym Mgm1p ist, da Mutanten mit deletiertem *PCP1* oder *MGM1* einen identischen Phänotyp aufweisen, wie z.B. fragmentierte Mitochondrien oder der sekundäre Verlust der mtDNA. Die hier beschriebenen Ergebnisse belegen diese Aussage.

## 4.2 Pcp1p weist keine posttranslationale Modifikationen auf

Bei der Expression von Pcp1p in *E. coli* fällt auf, dass mit dem anti-Pcp1-Antikörper lediglich eine Bande detektiert wird (siehe Abb. 3.4.2). In den Hefemitochondrien erkennt der Antikörper in den meisten Fällen eine Doppelbande des Proteins (siehe z.B. Abb. 3.2.1). Bei der Doppelbande könnte es sich um ein Abbauprodukt von Pcp1p handeln. Es wurde beobachtet, dass wiederholtes Auftauen und Einfrieren der isolierten Mitochondrien dazu führt, dass die Intensität der oberen Bande abnimmt, während die der unteren Bande zunahm. Da dieses Auftreten der Doppelbande allerdings auch in frisch isolierten Mitochondrien beobachtet wird, in denen von Anfang an die gleiche Intensität für beide Banden festgestellt werden kann, gibt es weitere Erklärungen für dieses Phänomen.

Eine Möglichkeit für das Auftreten dieser Doppelbande wäre eine Modifizierung des Proteins. Modifizierungen können die Größe eines Proteins erkennbar verändern. Pro Phosphorylierung z.B. nimmt die Größe des Proteins um ca. 80 Da zu, im Falle einer Glycosylierung sogar um min. 800 Da (MANN & JENSEN, 2003). Das in *E. coli* nur eine Pcp1p-Bande nachgewiesen wird, ist ein guter Hinweis auf eine Modifizierung, da das exprimierte Protein nicht in der Zelle modifiziert werden kann. Weil es sich bei Pcp1p um ein Enzym handelt, kommt u.a. eine Phosphorylierung des Proteins in Betracht, da durch sie Enzyme z.B. aktiviert oder deaktiviert werden können.

Bislang ist wenig darüber bekannt, wie Rhomboide reguliert werden. Beispielsweise wird der N-Terminus der humanen Rhomboidprotease PARL in zwei Schritten prozessiert. Der Bereich (P $\beta$ ) zwischen diesen beiden Spaltstellen ist phosphoryliert und verhindert damit den zweiten Prozessierungsschritt. Erst nach der Dephosphorylierung kann die zweite Spaltung erfolgen, durch die das P $\beta$ -Peptid, welches ein Kernlokalisierungssignal enthält,

freigesetzt wird und in den Zellkern gelangt. Bislang ist allerdings noch nicht bekannt, was das Peptid im Kern für eine Funktion hat (Sik *et al.*, 2004; JEYARAJU *et al.*, 2006).

Die Phosphorylierung von Pcp1p wäre also eine Möglichkeit, die Aktivität des Enzyms zu kontrollieren. Es ist denkbar, dass die Rhomboidprotease durch den Phosphorylierungszustand des Proteins aktiv an- bzw. abgeschaltet werden kann.

Untersuchungen der Pcp1p-Sequenz mit den Programmen NetPhos 2.0 und NetPhosYeast 1.0 haben ergeben, dass Pcp1p diverse potentielle Bereiche für eine Phosphorylierung aufweist. Im Rahmen dieser Arbeit wird untersucht, ob die Behandlung der Mitochondrien des Hefewildtyps mit der Phosphatase CIAP (Calf Intestine Alkaline Phosphatase) einen Einfluss auf die Pcp1p-Doppelbande hat. CIAP ist eine Phosphatase, die Phosphorylierungen von Proteinen abspaltet. Je nach Grad der Phosphorylierung würde sich die Größe des Proteins sichtbar ändern.

Unabhängig davon, ob Mitochondrien oder Mitoplasten mit CIAP inkubiert worden waren, konnte kein Unterschied zu den nicht behandelten Kontrollen festgestellt werden. Die Intensität der Doppelbanden war in allen Ansätzen unverändert und entsprach den Kontrollen (Abb. 3.1.8). Es wird auch keine Veränderung in der Größe der Banden detektiert.

Mit der hier eingesetzten Untersuchung ist eine Phosphorylierung von Pcp1p nicht nachweisbar. Aufgrund fehlender Positivkontrollen mit bekannten phosphorylierten mitochondrialen Proteinen kann sie aber auch nicht ausgeschlossen werden.

Auch Untersuchungen einer möglichen Glycosylierung von Pcp1p bringen keine weiteren Erkenntnisse über eine mögliche Modifikation der Protease. Durch die Behandlung mit Tunicamycin kann die Glycosylierung von Proteinen gehemmt werden. Aus dem Hefewildtypstamm wurden nach der Inkubation mit dem Hemmstoff die mitochondrialen Membranen isoliert und untersucht (Abb. 3.1.9), aber auch in diesem Fall können keine Unterschiede zwischen der Kontrolle und dem behandelten Ansatz festgestellt werden. In den Membranansätzen wird im Vergleich zu der Mitochondrien-Kontrolle des Wildtyps nur eine statt zwei Pcp1-Banden detektiert. Allerdings ist das Auftreten der Einfach-Bande nicht nur auf isolierte Membranen begrenzt, sondern kann auch in Mitochondrien nachgewiesen werden (siehe z.B. Abb. 3.2.1). Wie auch für die untersuchte Phosphorylierung von Pcp1p gilt, dass mit dem hier eingesetzten Versuchsaufbau eine Glycosylierung des Proteins nicht nachgewiesen werden kann, aufgrund fehlender Positiv-Kontrollen kann sie aber auch nicht ausgeschlossen werden.

### 4.3 Bekannte mitochondriale Signalpeptidasen sind nicht an der Prozessierung von Pcp1p beteiligt

Die meisten mitochondrialen Proteine sind kernkodiert und werden als Vorläuferproteine im Cytosol synthetisiert. Mittels einer Signalsequenz werden sie zu den Mitochondrien befördert und importiert (NEUPERT & HERMANN, 2007). Während des Imports werden die Proteine dann prozessiert, korrekt gefaltet und/oder modifiziert. Ein Beispiel hierfür ist die Cytochrom *c* Peroxidase, die mit dem N-Terminus bis in die innere mitochondriale Membran importiert wird. Eine Hämgruppe bindet kovalent an den C-Terminus und der N-Terminus in zwei Schritten proteolytisch abgespalten, so dass das reife Protein in den Intramembranraum entlassen wird. Die proteolytische Reifung wird von der m-AAA-Protease und Pcp1p durchgeführt, wobei Pcp1p für den zweiten Prozessierungsschritt verantwortlich ist (ESSER *et al.* 2002).

Das kernkodierte Pcp1p wird auch in die Mitochondrien importiert und dort in die innere Membran integriert. Es wurde bereits gezeigt, dass Pcp1p selbst auch während des Imports prozessiert wird. Das Vorläuferprotein hat inklusive eines C-terminalen *myc*-Tags eine Größe von 33 kDa, das reife Protein mit dem *myc*-Tag hingegen nur eine Größe von 28 kDa. Es ist 5 kDa kleiner und damit mindestens 45 Aminosäuren kürzer. Außerdem erfolgt die Prozessierung am N-Terminus, da der C-terminal angehängte *myc*-Tag auch beim reifen Pcp1p detektierbar ist (MICHAELIS *et al.* 2005). Um zu prüfen, welche Peptidasen für die Prozessierung von Pcp1p verantwortlich sind, werden in dieser Arbeit insgesamt 60 Hefemutanten untersucht (Tab. 3.2.1, Abb. 3.2.1). Bei den Mutanten handelt es sich um Deletionen oder temperatursensitive Mutationen möglicher Signalpeptidasegene oder mit Peptidasen interagierender Proteine.

Zunächst wurde überprüft, ob die bereits bekannten mitochondrialen Signalpeptidasen MPP (Mitochondrial Processing Peptidase), MIP (Mitochondrial Intermediate Peptidase) und IMP (Mitochondrial Inner Membrane Peptidase) für die Prozessierung von Pcp1p verantwortlich sind. In allen Mutanten (*mas1<sup>ts</sup>*, *mas2<sup>ts</sup>*,  $\Delta$ *mip1*,  $\Delta$ *imp1*,  $\Delta$ *imp2*) wird ein 23 kDa großes Protein (ohne *myc*-Tag) detektiert, das dem Wildtyp-Pcp1 entspricht. Die Signalpeptidasen sind nicht an der proteolytischen Reifung von Pcp1 beteiligt, wobei Einschränkungen gemacht werden müssen.

Der Phänotyp der temperatursensitiven Mutanten *mas1<sup>ts</sup>* und *mas2<sup>ts</sup>* wird durch die Inkubation bei 36°C ausgeprägt. Dabei kann es sein, dass die Hitzeeinwirkung zu kurz oder zu lang ist, so dass es nicht zur vollständigen Ausprägung des Phänotyps kommt. Da die Kulturen zunächst unter normalen Bedingungen angezogen werden, lässt sich meistens auch die reife Form des zu untersuchenden Proteins finden. Der Pcp1-Antikörper erkennt neben Pcp1p auch unspezifische Banden, so dass es möglich ist, dass sich das Vorläuferprotein hinter einer dieser Nebenbanden verbirgt.

Nachdem MPP sein Substrat prozessiert hat, spaltet MIP ein Oktapeptid ab (BRANDA & ISAYA 1995). Das Oktapeptid ist aber kleiner als 1 kDa und würde sich im Falle von Pcp1 nicht nachweisen lassen, da die Auftrennung des SDS-Gels nicht ausreicht.

Untersuchungen der bekannten MIP-Substrate haben zu einem Motiv geführt, anhand dessen man mögliche MIP-Substrate identifizieren kann (BRANDA & ISAYA 1995). Das Motiv lautet: RX(↓)(F/L/I)XX(T/S/G)XXXX(↓), wobei die Pfeile die Spaltungsstellen angeben und das RX aus dem Motiv ein Signal für die MPP ist. In der Pcp1p-Sequenz trifft man im N-Terminus auch auf dieses Motiv (Abb. 4.3.1). Da zwischen dem detektierten Pcp1p in der *mip1*-Deletionsmutante und dem Wildtyp kein Größenunterschied feststellbar ist, kann man davon ausgehen, dass MIP den letzten Prozessierungsschritt ausüben würde. Dies könnte aber nur durch eine Sequenzierung des reifen Pcp1p sicher belegt werden. Sollte MIP also tatsächlich das putative Oktapeptid (AS 66 - 73) von Pcp1p abspalten, gilt es die Peptidase(n) zu identifizieren, die die Aufgabe von MPP übernimmt, da diese normalerweise vor der MIP proteolytisch aktiv ist (ISAYA *et al.* 1992).

1	MSGVS	SVMLG	LRPAT	RIFFR	SNISV	SPSRT	FVSYI	GRSQS	40
41	TSILK	NAPNL	EDNVT	NLQKI	IPKRF↓	<u>FSQTS</u>	ILK↓SR	WKPIF	80
81	NEETT	NRYVR	LNRFQ	QYQQQ	RSGGN	PLGSM	TILGL	SLMAG	120
121	IYFGS	PYLFE	HVPPF	TYFKT	HPKNL	VYALL	GINVA	VFGLW	160
161	QLPKC	WRFLQ	KYMLL	QKDYV	TSKIS	IIGSA	FSHQE	FWHLG	200
201	MNMLA	LWSFG	TSLAT	MLGAS	NFFSL	YMNSA	IAGSL	FSLWY	240
241	PKLAR	LAIVG	PSLGA	SGALF	GVLGC	FSYLF	PHAKI	LLFVF	280
281	PVPGG	AWVAF	LASVA	WNAAG	CALRW	GSFDY	AAHLG	GSMMG	320
321	VLYGW	YISKA	VEKQR	QRRLQ	AAGRW	F*			346

**Abb. 4.3.1: MIP-Motiv im N-Terminus von Pcp1p**

In der Proteinsequenz von Pcp1 findet man im N-Terminus das MIP-Erkennungsmotiv (Rx↓(F/L/I)xx(T/S/G)xxxx↓). Die drei relevanten Aminosäuren R, F und T sind fett dargestellt, das potentiell von MIP gespaltene Oktapeptid (AS 66-73) ist unterstrichen.

In allen weiteren untersuchten Deletionsmutanten wird wie auch schon für die Signalpeptidasen MPP, MIP und IMP das 23 kDa große Pcp1p detektiert, das in seiner Größe dem im Wildtyp nachgewiesenen entspricht. Es werden auch keine größeren Formen von Pcp1p nachgewiesen. Keine der überprüften Peptidasekandidaten ist an der Prozessierung von Pcp1p beteiligt, ebenso wenig keines der mit Peptidasen interagierenden Proteine. Wie bereits für MPP oben beschrieben, erkennt der Antikörper auch unspezifische Banden. Dies erschwert die Identifizierung weiterer möglicher auftretender Pcp1p-Varianten in den Mutantenstämmen, da die Banden auf gleicher Höhe detektiert werden.

Die untersuchte mitochondriale Protease Pim1p ist kernkodiert und wird während des Importsprozessiert. Dies geschieht in einer zweistufigen Prozessierung, wobei die MPP den ersten Schritt der Prozessierung ausführt. Der zweite Prozessierungsschritt wird autokatalytisch durchgeführt, so dass das reife Protein anschließend in der Matrix lokalisiert ist (WAGNER *et al.* 1997). Da Pcp1p eine Rhomboidprotease ist und Signalpeptidaseaktivität besitzt (ESSER *et al.* 2002, HERLAN *et al.* 2003, McQUIBBAN *et al.* 2003), wurde in dieser Arbeit untersucht, ob Pcp1p sich autokatalytischprozessiert. Dafür wurden Punktmutationen in die Aminosäuren der katalytischen Dyade eingeführt, die zu einer Deaktivierung der Peptidaseaktivität von Pcp1p führen. Bei den mutierten Aminosäuren handelte es sich um Serin256 und Histidin313, die zu Isoleucin bzw.

Glutamin umgewandelt wurden. Außerdem wurde noch ein weiteres konserviertes Histidin (Histidin 193) zu einem Alanin mutiert. Es befindet sich zwischen zwei Transmembrandomänen (siehe Abb. 4.4.1). Das Histidin ist in allen Rhomboiden konserviert, ebenso wie die Aminosäuren der katalytischen Dyade, weshalb ursprünglich angenommen wurde, dass es bei der Aktivität der Protease eine Rolle spielen könnte (PELLEGRINI *et al.*, 2001).

Nachdem das Wildtypallel *PCP1* in  $\Delta pcp1$  exprimiert wird, kann das 23 kDa große Pcp1p in den Mitochondrien nachgewiesen werden, ebenso wie im Hefewildtyp. Nach der Expression von *PCP1*<sup>H193A</sup>, *PCP1*<sup>S256I</sup>, *PCP1*<sup>H313Q</sup> wird in diesen Mitochondrien ebenfalls das reife Pcp1p detektiert (Abb. 3.2.2, A). Die Punktmutationen führen also nicht zu einem Abbau des Proteins und sie haben auch keinen Einfluss auf dessen Import. Des Weiteren wird Pcp1p trotz der Mutationen in der katalytischen Dyade in die reife Form überführt. Die Punktmutationen in der katalytischen Dyade sorgen dafür, dass die Pcp1-Rhomboidprotease ihre Aktivität verliert und die intermediäre Form des Substrates Ccp1p akkumuliert. In den Mutanten mit den Allelen *PCP1* oder *PCP1*<sup>H193A</sup> wird die reife Form von Ccp1p nachgewiesen (Abb. 3.2.2, B). Da trotz des Verlustes der Peptidaseaktivität von Pcp1p die reife Form des Proteins in diesen Mutanten nachgewiesen werden kann, ist eine autokatalytische Prozessierung von Pcp1p auszuschließen.

Für die Prozessierung der Rhomboidprotease Pcp1p könnte ein bislang nicht analysiertes Gen verantwortlich sein. Möglicherweise sind aber auch mehrere Gene gleichzeitig aktiv, so dass die verantwortlichen Gene nur mit Hilfe von Doppelmutanten identifiziert werden können. Die  $\Delta pcp1$ -Mutante wächst auf nicht fermentierbarem Medium schlecht bis gar nicht. Dies hängt mit dem Verlust der mtDNA zusammen, welcher als sekundärer Effekt auftritt. Eine genetische Selektion ist wegen dieses schwierigen Phänotyps der *pcp1*-Deletionsmutante nicht einsetzbar.

#### 4.4 Pcp1p bildet einen Proteinkomplex in der inneren Mitochondrienmembran

Proteine erfüllen die unterschiedlichsten Aufgaben in einem Organismus aufgrund dessen sie in drei Klassen zugeordnet werden können: Enzyme, „Cell Signalling“ und Ligandentransport und Strukturproteine. Dabei ist das einzelne Protein nicht unbedingt

ausreichend, um aktiv zu sein. Meist schließen sich mehrere Proteine (Untereinheiten) zu einem funktionellen Komplex zusammen. Die MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) z.B. setzt sich aus den Untereinheiten Mas1p und Mas2p zusammen, wobei Mas1p katalytisch aktiv und Mas2p scheinbar für die Substraterkennung verantwortlich ist (GAKH *et al.* 2002). Weitere bekannte Komplexe sind die Atmungskettenkomplexe, die in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind. Diese Komplexe setzen sich auch jeweils aus diversen Untereinheiten zusammen (SCHÄGGER & PFEIFFER, 2000). Interessanterweise sind die Komplexe der Atmungskette aber nicht zufällig in der inneren Mitochondrienmembran verteilt, sondern bilden so genannte Superkomplexe. Der Komplex III bildet z.B. einen dimeren Komplex aus, der noch an Superkomplexen mit dem monomeren oder dimeren Komplex IV beteiligt ist ( $III_2IV_1$  und  $III_2IV_2$ ). Die Menge der jeweiligen Superkomplexe ist variabel und hängt u.a. von den Wachstumsbedingungen ab (SCHÄGGER & PFEIFFER 2000). Vorteile solcher Superkomplexe sind z.B. „Substrate Channelling“, Verstärkung der katalytischen Aktivität, Arrestierung reaktiver intermediärer Formen und schneller intramolekularer Transfer (FERSHT, 1999).

In dieser Arbeit wird gezeigt, dass Pcp1p ebenfalls in einem Komplex organisiert ist (Abb. 3.3.1). Die Größe des Komplexes ließ sich dabei allerdings nicht bestimmen, da Pcp1p in der zweiten Dimension mit einer Bande detektiert wurde, die von der monomeren Form (> 66 kDa) bis hin zu einer Größe von 350 kDa reichte. Der Versuch, diesen Bereich besser aufzutrennen, indem auf den Gradienten (5-15%) in der ersten Dimension verzichtet und statt dessen ein 9%-iges Gel eingesetzt wurde, bestätigt, dass die Hauptmenge an Pcp1p in einer Komplexgröße von 180-200 kDa vorkommt. Allerdings läßt sich Pcp1p auch in den Bereichen von 66-170 kDa und 220-350 kDa nachweisen (Abb. 3.3.2). In weiteren Versuchen verlagerte sich diese Bande sogar von einer Komplexgröße von 130 kDa bis zu über 1000 kDa (Abb. 3.3.5 & 7). Da die Anzucht der Hefestämme unter gleichen Bedingungen stattfand (z.B. Medium, Temperaturen, Wachstumsphasen), können als Ursache für diese Schwankungen in den detektierten Komplexgrößen veränderte Wachstumsbedingungen ausgeschlossen werden.

Pcp1p ist allerdings nicht das einzige Protein, das mit solch einer lang gezogenen Bande in der zweiten Dimension detektiert wird. BAP29 und BAP31 sind Membranproteine des Endoplasmatischen Retikulums und werden über einen Bereich von 5,5-14% (gesamte BN-PAGE) nachgewiesen, wobei die Hauptmenge der Proteine bei einer Komplexgröße von über 880 kDa detektiert wird (CAMACHO-CARVAJAL *et al.* 2004). BAP29 und BAP31 sind 29 bzw. 31 kDa groß und enthalten drei Transmembrandomänen (SCHAMEL *et al.*

2003). Pcp1p weist mit seinen mindestens sechs Transmembrandomänen eine höhere Hydrophobizität auf, die in Bezug auf die Ergebnisse mit BAP29 und BAP31 nicht allein verantwortlich für die lang gezogene detektierte Proteinbande ist.

Eine weitere Möglichkeit, die Größe von Proteinkomplexen zu bestimmen und daran beteiligte Proteine zu identifizieren, ist die chemische Quervernetzung von Proteinen durch Crosslinker. Das Crosslinking-Reagenz DSS (Disuccinimidylsuberat) ist ein homobifunktionaler N-hydroxysuccinimidester, der mit primären Aminen, wie sie in der Seitenkette von Lysin oder am N-Terminus vorkommen, reagiert und ist aufgrund seiner nicht-wasserlöslichen Eigenschaft membran-permeabel und daher auch für intramembranes Crosslinking geeignet. Außerdem wird er durch  $\beta$ -Mercaptoethanol nicht gespalten, sodass die gecrosslinkten Proteine in einer Standard-SDS-PAGE nicht voneinander getrennt werden (Pierce, Rockford, IL 61105, USA). Der Nachweis von Pcp1p im Wildtyp zeigt keine detektierbaren Unterschiede in dem gecrosslinkten Ansatz und der Kontrolle (Abb. 3.3.6). Da häufig nur ein Teil des zu untersuchenden Proteins chemisch quervernetzt wird, fällt es oft schwer, diesen Unterschied mittels einer normalen SDS-PAGE zu detektieren. Daher wurde untersucht, ob sich möglicherweise neben der monomeren Form von nicht-gecrosslinktem Protein nach einer 2D BN/SDS-PAGE Pcp1p in einem größeren Verbund detektieren lässt. In einer BN-PAGE wird im Verhältnis zur normalen SDS-PAGE fast die siebenfache Menge mitochondrialen Proteins eingesetzt. In dem gecrosslinkten Ansatz wird neben der Bande für die monomere Form von Pcp1p auch eine Bande mit über 95 kDa bei einer Komplexgröße von ca. 200 kDa detektiert (Abb. 3.3.7). Interessanterweise wird aber auch in der Kontrolle solch eine Bande nachgewiesen. Zusätzlich erkennt der anti-Pcp1-Antikörper eine weitere Bande bei über 1000 kDa. Da DSS der einzige Unterschied in den Ansätzen ist, kann es nicht für das Entstehen dieser Bande verantwortlich sein. Um Proteine zu crosslinken, werden nicht nur spezielle Crosslinker eingesetzt, sondern auch Chemikalien. So kann man z.B. Formaldehyd zum Crosslinken von Proteinen benutzen (GUERRERO *et al.* 2006). Möglicherweise hat das DMSO, in dem das DSS gelöst und das auch der Kontrolle zugefügt wurde, ebenfalls eine quervernetzende Wirkung auf Pcp1p. Diese Untersuchungen sind allerdings nicht mehr Bestandteil dieser Arbeit.

Wie bereits oben beschrieben, bilden entweder mehrere Untereinheiten einen funktionellen Komplex oder mehrere funktionelle Einheiten einen Superkomplex. Für die Rhomboidprotease GlpG aus *E. coli* wurde gezeigt, dass sie nach der Solubilisierung und

Aufreinigung immer noch aktiv war (LEMBERG *et al.* 2004). Das deutet darauf hin, dass Rhomboide ihre Substrate spalten ohne dafür vorher mit weiteren Untereinheiten einen Komplex bilden zu müssen. Folglich wäre Pcp1p Teil eines homopolymeren Komplexes. Um dies zu überprüfen, wurden verschiedene Pcp1-Mutanten hergestellt, in denen jeweils eine oder zwei benachbarte Transmembrandomänen (TMD) oder der C-Terminus deletiert waren (Abb. 3.3.3). Aufgrund diverser Programme zur Bestimmung der Transmembrandomänen eines Proteins wurde bei Pcp1p von insgesamt sechs TMD's ausgegangen (Tab. 3.3.1), obwohl in der Literatur meist von sieben TMD's berichtet wird (URBAN, 2006; LEMBERG & FREEMAN, 2007). Diese Angaben beruhen bislang nur auf Sequenzvergleichen und Strukturvorhersagen von bekannten Rhomboiden, sowie aufgrund dieser Daten erstellter phylogenetischer Stammbäume. Lediglich für die Rhomboidprotease GlpG aus *E. coli* wurde die Kristallstruktur nachgewiesen mit insgesamt sechs Transmembrandomänen (WU *et al.*, 2006).

Die Deletionen der Transmembrandomänen führen in jedem Fall zu einem Aktivitätsverlust von Pcp1p, das Substrat iCcp1p wird in diesen Mutanten nicht prozessiert (Abb. 3.3.4, B). Dennoch werden die Mutantenformen von Pcp1p in den Mitochondrien nachgewiesen (Abb. 3.3.4, A). Die Mutantenproteine werden mit einem Größenunterschied von 1-4 kDa im Vergleich zum Wildtyp detektiert. Trotz der Deletion des C-Terminus konnte Pcp1p das Intermediat iCcp1p prozessieren. Allerdings wird Pcp1p- $\Delta$ C-Term nicht vom Antikörper erkannt. Das spricht dafür, dass das Epitop für den Antikörper im C-Terminus lokalisiert ist. Es ist anzunehmen, dass der Aktivitätsverlust der Protease Pcp1p nach der Deletion einer oder mehrerer Transmembrandomänen auf eine Konformationsänderung des Proteins zurückzuführen ist. Diese Konformationsänderung führt nicht zu einem Abbau des fehlerhaften Proteins und sie hat auch keinen Einfluss auf den Import in die Mitochondrien und die Integration in die innere Membran. Denkbar ist, dass die Konformationsänderung z.B. verhindert, dass das Substrat der Protease korrekt zugeführt wird. Möglicherweise lagern sich die Proteine, die das Substrat in die Membran ziehen, an Pcp1p an. Durch die Konformationsänderung ist diese Anlagerung nicht mehr möglich, so dass die ATP-getriebene Maschinerie das Protein nicht (weit genug) in die innere Membran befördern kann, um von Pcp1p prozessiert zu werden.

Die Komplexgrößen für die Mutantenproteine mit einer deletierten Transmembrandomäne wurden untersucht und mit dem Wildtypprotein verglichen. Unabhängig davon, welche der TMD's fehlt, kann in allen Mutanten ein Komplex nachgewiesen werden, der von der Größe her nicht von dem des Wildtyps zu unterscheiden ist. Er reicht von 130 kDa bis über 1000 kDa hinaus (Abb. 3.3.5). Die Deletion einzelner Transmembrandomänen

beeinträchtigt die Komplexbildung von Pcp1p nicht. In einer Größe von über 1000 kDa sind die fehlenden 1-4 kDa pro Pcp1p nicht nachweisbar. Auch der Versuch aufgrund des Größenunterschiedes von 4 kDa zwischen dem Wildtyp und der Mutante Pcp1- $\Delta$ TM2-3 beide Ansätze in derselben Spur aufzutrennen und in der SDS-PAGE zu analysieren, führte zu keinem Ergebnis. Es wurde nur eine Pcp1p-Bande detektiert (Daten nicht gezeigt).

Eine andere Möglichkeit für die Zusammensetzung des Pcp1p-Superkomplexes sind neben Pcp1p weitere Komplexe der inneren Membran. Dafür kommt z.B. die m-AAA-Protease in Frage. Zusammen mit Pcp1p ist sie an der Prozessierung von Ccp1p beteiligt. Die bereits oben angesprochenen Vorteile einer räumlichen Nähe kämen hier zum Tragen. Die m-AAA-Protease könnte durch das „Substrate-Channelling“ das Ccp1-Intermediat direkt an Pcp1p weiterreichen. Die Prozessierung kann schneller erfolgen. Gerade, wenn die Zelle H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress ausgesetzt ist, wäre ein schnelles zur Verfügung stellen von Ccp1p für die Zelle wichtig. Da die Expression von Pcp1p durch die Induzierung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Stress unbeeinflusst bleibt (siehe 4.1), könnte ein Superkomplex dieser beiden Proteasen diese Aufgabe bewältigen. Die m-AAA-Protease wird aus den Untereinheiten Yta10p und Yta12p zusammengesetzt und bildet einen 850 kDa großen Komplex. Der Komplex wird nicht assembliert, wenn eine der beiden Untereinheiten fehlt (ARLT *et al.* 1996). In  $\Delta$ yta10 konnte eine Pcp1p-Bande detektiert werden (Abb. 3.3.8), die der des Wildtyps entspricht (siehe Abb. 3.3.5). Ein 850 kDa großer Unterschied wäre detektierbar gewesen. Demzufolge bilden die m-AAA-Protease und Pcp1p keinen Superkomplex.

#### 4.5 Homologien zwischen Pcp1p und GlpG reichen nicht für die Integration in die periplasmatische Membran in *E. coli* aus

Rhomboidproteasen wurden in allen Organismenreichen identifiziert, doch beschränken sich die Homologien zwischen einzelnen Vertretern überwiegend auf die Transmembrandomänen, insbesondere auf die Bereiche um die katalytische Dyade (Abb. 4.4.1). Dennoch können die mitochondrialen Rhomboide des Menschen die Funktion des Hefe-Rhomboids Pcp1 übernehmen, wenn das entsprechende Gen in die Hefe gebracht werden (MCQUIBBAN *et al.*, 2003). Im Gegensatz dazu kann das homologe Enzym von *Arabidopsis thaliana* die Proteasefunktion des Hefeenzym nicht ersetzen,

obwohl das Pflanzenprotein in den Hefemitochondrien nachgewiesen werden konnte (KMIEC-WISNIEWSKA *et al.*, 2008).

GlpG ist eine Rhomboidprotease in *E. coli*, die in die Unterfamilie der einfachen Sekretasen eingeordnet wird (LEMBERG & FREEMAN, 2007). Der Kernbereich dieser Proteasen wird von sechs Transmembrandomänen gebildet, eine siebte stromauf- bzw. abwärts fehlt allerdings (siehe Abb. 1.5.1). Wie alle aktiven Rhomboidproteasen besitzt GlpG die charakteristische katalytische Dyade aus Serin und Histidin (WU *et al.*, 2006). Ein Vergleich einiger mitochondrialer Rhomboidproteasen mit der Sequenz des Enzyms aus *E. coli* ist in Abb. 4.4.1 dargestellt. In dieser Arbeit wurde untersucht, ob in *E. coli* exprimiertes Pcp1p in die periplasmatische Bakterien-Membran integriert wird, in der natürlicherweise GlpG lokalisiert ist.

ScPcp1	-----MSGVSSVMLGLRPATRIFFRSNISVSPSRTFVSYIGR-----SQST	41
HsPARL	MAWRGWAQRGWGCGQAWGASVGGRSCEELTAVLTTPQLLGRRFNFFIQOKCGFRKAPRKV	60
AtRBL12	-----MKAI FNRRVVDSSSRLTKLLANPTTHS-----HLNR-----QTFT	36
EcGlpG	-----MLMITSFAN-----PRVA	13
ScPcp1	SILKNAPNLEDNVTNLQKIIP----KRFFSQTSILKSRWKPIFNEETTNRVRLNRFQOY	97
HsPARL	EPRRSDPGTSGEAYKRSALIPPVEETVFYPSYPYPIRSLIKPLFFTVGFTG-CAFGSAAIW	119
AtRBL12	SLYKPNQSRHFRTHYLPSSPSSPPVSRFDPSQLWRSEKIRGFFASALGNKAVKLGNLVES	96
EcGlpG	QAFVDYMATQGVILTIOQHNQ----SDVWLADESQAERVRAELARFLENPADPRYLAASW	69
ScPcp1	QQQRSGGNPLGSMTILGLSLMAGIYFG-SPYLFEHVPPFTYFKTHPKNLVYALLGINVAV	156
HsPARL	QYESLKS RVQSYFDGIKADWLDSIRPOKEGDFRKEINKWNNNSDQRTVTVTGIIAANVLV	179
AtRBL12	RVGFIGSQFP-----KKGFEFQRFSGFQRRGWKHWLQGLSDRDVVLGLVIANAGV	146
EcGlpG	QAGHTG-----SGLHYRRYPFFAA-----LRERAGPVTWVMMIACVVV	107
ScPcp1	FGLWQLPKCWRFLLQKYMLLQKDYVTSKIS-IIGSAFSSHQEFWHLGMNMLALWSFGTSLAT	215
HsPARL	FCLWRVPSLQRTMIRYFTSNPASKVLCSPML-LSTFSSHFLFHMMAANMYVLWSFSSSIVN	238
AtRBL12	FVMWRVFNQOFMMNFMISLDFKSGRLHTLITSAFSHIDIGHIVSNMIGLYFFGTSIAR	206
EcGlpG	FIAMQILGDQEVMLWLAWPFDPAKKEFWRYFTHALMHFSLMHILFNLLWWWYLGAVEK	167
ScPcp1	MLGASNFFSLYMNSA IAGSLFSLWYPKLARLA-----IVGPSL GASGALFGVL	263
HsPARL	ILGQEQFMAYLSAGVISNFVS--YVGKVATGRY-----GPSL GASGAIMTVL	284
AtRBL12	NFGPQFLKLYLAGALGGSVFYLIHHAYMAATSPKQGAFVRDPSRTPGL GASGAVNAIM	266
EcGlpG	RLSGKLLIVITLISALLS-----GYVQOKFSG-----PWFG---GLSGVVYA-L	207
ScPcp1	GCFSYLFPHAKILLFVFP-VPGGAWVAFLASVAWNAAGCALRWGSFDYAAHLGGSMMGVL	322
HsPARL	AAVCTKIPEGRLAIIIFLPMFTFTAGNALKAIIAMDTAGMILGWKFFDHAAHLGGALFGIW	344
AtRBL12	LLDIFLHPRATLYLEFFIPVP--AMLLGIFLIGKDILRITEGNSNISGSAHLGGAVAVAI	324
EcGlpG	MGYVWLRGERDPQSGIYLQRG----LIIFALIWI VAGWFDLFGMSMANGAHIAGLAVGLA	263
ScPcp1	YGWYISKAVEKQRQ-----RRLQAAGRWF-----	346
HsPARL	YVTYGHელიWKNREPLVKIWEIRTNPKKGGGSK	379
AtRBL12	AWARIRKGRFRF-----	336
EcGlpG	MAFVDSLNAKRK-----	276

#### Abb. 4.4.1: Alignment verschiedener Rhomboidpeptidasen

Die Sequenzen der mitochondrialen Rhomboide von Hefe (ScPcp1), des Menschen (HsPARL), von *Arabidopsis thaliana* (AtRBL12) und *E. coli* (EcGlpG) wurden mit ClustalW2 verglichen. Die katalytische Dyade ist grün hinterlegt, Aminosäuren, die in allen Rhomboiden identisch sind, gelb. Die grau hinterlegten Aminosäuren sind in mindestens zwei Rhomboiden identisch. Die Transmembrandomänen wurden mit TMpred vorausgesagt und sind fett und unterstrichen dargestellt.

Pcp1p wird in *E. coli* exprimiert (Abb. 3.4.1 & 2). Die Isolierung und Untersuchung der Membranen zeigt allerdings, dass Pcp1p nicht in die Membran integriert, sondern wahrscheinlich in „Inclusion-Bodies“ eingelagert wird, da nach der ersten Zentrifugierung der aufgeschlossenen Zellen das Pcp1-Protein im Sediment nachweisbar ist (Abb. 3.4.2). Die Größe des in *E. coli* nachgewiesenen Pcp1p beträgt ~38 kDa. Es entspricht damit zwar der theoretischen Größe von Pcp1p, ist aber auch deutlich größer als das in der

Hefe nachgewiesene *in vivo*-Protein (24 kDa) (siehe z.B. 3.2.1). Ein Grund für diesen Größenunterschied ist, dass das in *E. coli* exprimierte Pcp1p nicht prozessiert wurde und somit dem Vorläuferprotein entspricht. Der Größenunterschied zwischen dem Vorläuferprotein und der reifen Form von Pcp1p beträgt aber nicht 14 kDa, sondern lediglich 5 kDa (MICHAELIS *et al.*, 2005).

Ein weiterer Grund ist möglicherweise in der Denaturierung der aufgetragenen Proteingemische zu sehen. Um Pcp1p nachweisen zu können, werden die Proteingemische zur Denaturierung lediglich mit SDS und  $\beta$ -Mercaptoethanol denaturiert. Auf ein Erhitzen der Proben auf 96°C wird verzichtet, da dies zur Aggregation von Pcp1p führt. Das Protein ist dann fast nicht nachweisbar (Daten nicht gezeigt). Das in der Hefe detektierte Pcp1p ist im Gegensatz zu dem in *E. coli* exprimierten Protein korrekt gefaltet. Es ist also denkbar, dass sich das Protein ohne die Hitzeinkubation nicht vollständig entfaltet, und dadurch im Vergleich zu dem gar nicht erst gefalteten Protein ein anderes Laufverhalten hat.

Die Homologien zwischen Pcp1p und GlpG reichen nicht aus, dass Pcp1p von der *E. coli*-Zelle erkannt, gefaltet und in die Membran integriert wird.

## 4.6 Ausblick

Das Kerngen *PCP1* kodiert für ein mitochondriales Protein, das in seiner reifen, prozessierten Form in die innere Mitochondrienmembran integriert ist und dort selbst an der proteolytischen Reifung anderer mitochondrialer Proteine beteiligt ist. Die an der eigenen Prozessierung beteiligten Signalpeptidasen konnten bislang nicht identifiziert werden. Da eine autokatalytische Spaltung des Proteins ausgeschlossen ist und auch die bislang bekannten Signalpeptidasen ebenso wie andere bekannte mitochondriale Peptidasen nicht an der Prozessierung beteiligt sind, müssen weitere mögliche Kandidaten herausgesucht und getestet werden. Eine MALDI-TOF-Analyse kann darüber hinaus Aufschluss geben, ob MIP tatsächlich ein Oktapeptid vom N-Terminus von Pcp1p spaltet. Dafür muß das Pcp1-Protein allerdings aufgereinigt werden.

Pcp1p kommt in einem Komplex in der inneren mitochondrialen Membran vor. Die genaue Größe des Komplexes, ebenso wie seine Zusammensetzung konnten bislang nicht aufgeklärt werden. Bislang wurde nur mit einem Crosslinker getestet, ob sich die

Komplexgröße näher eingrenzen lässt. Der Einsatz weiterer Crosslinker könnte interessante Ergebnisse bringen, ebenso wie die Untersuchung, ob DMSO möglicherweise quervernetzende Eigenschaften hat. Eine weitere Möglichkeit, den Pcp1p-Komplex näher zu charakterisieren, bietet auch „Bimolecular Fluorescence Complementation“. Dies ist eine Methode, bei der das Yellow-Fluorescent-Protein (YFP) geteilt wird und die beiden Proteinhälften N- oder C-terminal an das Zielprotein gekoppelt werden. Wenn die auf diese Weise markierten Proteine miteinander interagieren, bilden die beiden YFP-Hälften ein funktionales Protein und emittieren gelbes Licht. Die hauptsächlich in Pflanzen angewandte Methode wurde von SUNG & HUH (2007) auch in *S. cerevisiae* etabliert.

Da in *E. coli* exprimiertes Pcp1p in „Inclusion-Bodies“ verpackt wird, wäre es interessant, das Verhalten von Pcp1p in einem anderen Expressionssystem zu testen. Hierfür kommt z.B. *Pichia pastoris* in Frage, bei der es sich ebenfalls um eine Hefe handelt. Die eventuelle Anreicherung und Integration von Pcp1p in z.B. die Membranen könnte eine anschließende Aufreinigung des Proteins über einen HIS-Tag stark vereinfachen, so dass idealerweise weitere Strukturanalysen etc. möglich sind. Sollte das Protein integriert und prozessiert werden, kann mittels einer Sequenzierung das reife Pcp1p bestimmt werden. Die Rhomboidprotease aus *E. coli* in der Hefe zu exprimieren und auf Funktionalität zu prüfen wäre insofern interessant, da das Hefeenzym eine zusätzliche N-terminale Transmembrandomäne besitzt, die dem *E. coli*-Enzym fehlt.

## 5. Zusammenfassung

Intramembrane Serinproteasen gehören zur Familie der Rhomboide, die in allen Organismenreichen vertreten sind. Charakteristisch für die Rhomboidproteasen sind sechs bis sieben Membranspannende Domänen und ein katalytisches Zentrum. Dieses besteht aus einem Serin und einem Histidin, die beide innerhalb verschiedener Membrandomänen lokalisiert sind und entsprechend ihre Substrate innerhalb der Membran spalten.

Über die mitochondriale Rhomboidprotease Pcp1 aus der Hefe ist bislang sehr wenig bekannt. Meist wird sie nur in Zusammenhang mit ihren Substraten, die Cytochrom *c* Peroxidase und Mgm1, beschrieben. Daher konzentriert sich diese Arbeit auf die Charakterisierung dieser Protease. Die Genregulierung, Prozessierung und Organisation in der Membran werden untersucht.

Die kernkodierte Rhomboidprotease Pcp1 der Hefe wird in die Mitochondrien importiert und ist dort als Signalpeptidase am Abbau von reaktivem Sauerstoff, sowie an der Fusion von Mitochondrien beteiligt. Das Vorläuferprotein Pcp1p wird im Cytosol mit einer N-terminalen Signalsequenz synthetisiert, die während des Imports in die Mitochondrien abgespalten wird.

Zur Identifizierung der an der Prozessierung der Rhomboidprotease Pcp1p beteiligten Signalpeptidase(n) wurden in dieser Arbeit 60 Mutanten analysiert, in denen die Gene für potentielle mitochondriale Proteasen bzw. Proteine, die mit Proteasen interagieren, deletiert oder inaktiviert waren. Keine der bekannten Signalpeptidasen ist an dieser proteolytischen Spaltung beteiligt, ebenso wenig wie alle weiteren bekannten mitochondrialen Proteasen. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass die Prozessierung nicht autokatalytisch erfolgt, obwohl Pcp1p selbst als Signalpeptidase aktiv ist. Pcp1p besitzt eine katalytische Dyade, die aus dem Serin an Position 256 und dem Histidin an Position 313 besteht. Punktmutationen in diesen Aminosäuren führen zu einem vollständigen Verlust der Protease-Aktivität, verhindern aber nicht ihre Integration in die innere mitochondriale Membran.

Untersuchungen zur Genregulierung von *PCP1* haben gezeigt, dass während der logarithmischen Wachstumsphase am meisten *PCP1*-mRNA nachgewiesen werden kann, die Menge des reifen Proteins ist allerdings während der stationären Wachstumsphase

am Größten. Darüber hinaus ließ sich kein Hinweis darauf finden, dass die Proteaseaktivität von Pcp1p durch eine Phosphorylierung reguliert wird.

Die Untersuchung solubilisierter mitochondrialer Membranproteine mittels der Blue Native-PAGE (BN-PAGE) ergab, dass Pcp1p in einem Komplex organisiert ist. Die Größe des Komplexes ließ sich durch den Nachweis von Pcp1p nicht eindeutig bestimmen, da die detektierte Bande von einer Komplexgröße von 130 kDa bis über 1000 kDa reichte.

Die Deletion einzelner oder benachbarter Transmembrandomänen aus Pcp1p führte zu einem Aktivitätsverlust der Protease, die trotzdem in die Membran und auch in den Komplex integriert wurde. Die Deletionen hatten keinen sichtbaren Einfluss auf die Komplexgröße.

Aus der Literatur war bekannt, dass das Gen für die mitochondriale Rhomboidprotease des Menschen nach Expression in der Hefe die Funktion des Hefegens übernehmen kann. Im Gegensatz dazu wurde in *E. coli* exprimiertes Pcp1p trotz der Homologien zu dem bakteriellen Rhomboid GlpG nicht von der *E. coli*-Zelle erkannt und in die periplasmatische Membran integriert.

## 6. Literatur

ARNOLD I, PFEIFFER K, NEUPERT K, STUART RA & SCHÄGGER H:

ATP Synthase of Yeast Mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene.

*J Biol Chem* **274** (1999) 36-40

ARNOLD I & LANGER T:

Membrane protein degradation by AAA proteases in mitochondria.

*Biochim Biophys Acta.* **1592** (2002) 89-96

ARLT H, TAUER R, FELDMANN H, NEUPERT W & LANGER T:

The YTA10-12 Complex, an AAA Protease with Chaperone-like Activity in the Inner Membrane of Mitochondria.

*Cell* **85** (1996) 875-885

ARLT H, STEGLICH G, PERRYMAN R, GUIARD B, NEUPERT W & LANGER T:

The Formation of Respiratory Chain Complexes in Mitochondria Is Under the Proteolytic Control of the m-AAA Protease.

*EMBO J.* **17** (1998) 4837-4847

BAKER RP, WIJETILAKA R & URBAN S:

Two Plasmodium rhomboid proteases preferentially cleave different adhesins implicated in all invasive stages of malaria.

*PloS Pathog.* **2** (10) (2006) e113

BANNUR SV, KULGOD SV, METKAR SS, MAHAJAN SK & SAINIS JK:

Protein determination by ponceau S using digital color image analysis of protein spots on nitrocellulose membranes.

*Anal Biochem* **267** (1999) 382-389

BASSETT JR DE, BASRAI MA, CONNELLY C, HYLAND KM, KITAGAWA K, MAYER ML, MORROW DM, PAGE AM, RESTO VA, SKIBBENS RV & HIETER P:

Exploiting the complete yeast genome sequence.

*Curr Opin Genet Dev* **6** (1996) 763-766

BENNETZEN JL & HALL BD:

Codon Selection in Yeast.

*J Biol Chem.* **257** (1982) 3026-3031

BIRNBOIM HC & DOLY J:

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

*Nucleic Acids Res* **7**(6) (1979) 1513-1523

BLEAZARD W, MCCAFFERY JM, KING EJ, BALE S, MOZDY A, TIEU Q, NUNNARI J & SHAW JM:

The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast.

*Cell Biol* **1** (1999) 298-304

BRANDA SS & ISAYA G:

Prediction and Identification of New Natural Substrates of the Yeast Mitochondrial Intermediate Peptidase.

*J Biol. Chem.* **270** (1995) 27366-27373

BROCK TD, MADIGAN MT, MARTINKO JM & PARKER J:

Biology of Microorganisms.

9<sup>th</sup> Edition, Upper Saddle River: Prentice Hall, 2000

BROWN MS, YE J, RAWSON RB & GOLDSTEIN JL:

Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans.

*Cell* **100** (2000) 391-398

BULLOCK WO, FERNANDEZ JM & SHORT JM:

XL1-blue: A high efficiency plasmid transforming *reca Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection.

*Biotechniques* **5** (1987) 376-379

CAMACHO-CARVAJAL MM, WOLLSCHIED B, AEBERSOLD R, STEIMLE V & SCHAMEL WWA:

Two-dimensional Blue Native/SDS Gel Electrophoresis of Mult-Protein Complexes from Whole Cellular Lysates.

*Mol. Cell. Proteomics* **3** (2) (2004) 176-182

CARTER P & WELLS JA:

Disecting the Catalytic Triad of a Serine Protease.

*Nature* **332** (1988) 564-568

CHACINSKA A, REHLING P, GUIARD B, FRAZIER AE, SCHULZE-SPECKING A, PFANNER N, VOOS W & MEISINGER C:

Mitochondrial translocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex.

*EMBO J* **22** (20) (2003) 5370-5381

CIPOLAT S, MARTINS DE BRITO O, DAL ZILIO B & SCORRANO L:

OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion.

*PNAS* **104** (45) (2004) 15927-15932

CIPOLAT S, RUDKA T, HARTMANN D, COSTA V, SERNEELS L, *ET AL.*:

Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling.

*Cell* **126** (2006) 163-175

COLLINSON LP & DAWES IW:

Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress.

*Journal of General Microbiology* **138** (1992) 329-335

DALEY DO, ADAMS K, CLIFTON R, QUALMANN SR, MILLAR AH, PALMER JD, PRATJE E & WHELAN J:

Gene transfer from mitochondrion to the nucleus: novel mechanisms for gene activation from Cox2.

*Plant J.* **30** (2002) 11-21

DICKINSON J & SCHWEIZER M:

The Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Auflage, London: Taylor & Francis Group, 1999

DIETMEIER K, HONLINGER A, BOMER U, DEKKER PJ, ECKERSKORN C, LOTTSPEICH F, KUBRICH M & PFANNER N:

Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore.

*Nature* **388** (1997) 195-200

DIMMER KS, FRITZ S, FUCHS F, MESSERSCHMITT M, WEINBACH N, NEUPERT W & WESTERMANN B:

Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Mol Biol Cell.* **13** (2002) 847-853

DUJON B:

The yeast genome project: what did we learn?.

*Trends Genet* **12** (1996) 263-270

DUVEZIN-CAUBET S, KOPPEN M, WAGENER J, ZICK M, ISRAEL L, BERNACCHIA A, JAGASIA R, RUGARLI EI, IMHOF A, NEUPERT W, LANGER T & REICHERT AS:

OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria.

*Mol Biol Cell.* **18** (9) (1996) 3582-3590

ESSER K, TURSUN B, INGENHOVEN M, MICHAELIS G & PRATJE E:

A Novel Two-Step Mechanism for Removal of a Mitochondrial Signal Sequence Involves the mAAA Complex and the Putative Rhomboid Protease Pcp1.

*J. Mol. Biol.* **323** (2002) 835-843

FERSHT A:

Structure and Mechanism in Protein Science: A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding.

1<sup>st</sup> Edition, New York, USA: W. H. Freeman and Company, 1999

FLUHRER R, GRAMMER , ISRAEL L, CONDRON MM, HAFFNER C, *ET AL.*:

A gamma-secretase-like intramembrane cleavage of TNFalpha by the GxGD aspartyl protease SPPL2b.

*Nat Cell Biol.* **8** (2006) 894-896

FREZZA C, CIPOLAT S, MARTINS DE RITO O, MICARONI M, BEZNOUSSENKO GV, *ET AL.*:

OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion.

*Cell* **126** (2006) 177-189

GAKH O, CAVADINI P & ISAYA G:

Mitochondrial processing peptidases.

*BBA* **1592** (2002) 63-77

GALLIO M, STURGILL G, RATHER P & KYLSTEN P:

A Conserved Mechanism for Extracellular Signaling in Eukaryotes and Prokaryotes.

*PNAS.* **99** (2002) 12208-12213

GELI V, YANG MJ, SUDA K, LUSTIG A & SCHATZ G:

The MAS-encoded processing protease of yeast mitochondria. Overproduction and characterization of its two nonidentical subunits.

*J Biol Chem* **265** (1990) 19216-19222

GIETZ D, SUGINO A:

New Yeast – *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with *in vitro* mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites.

*Gene* **74** (1988) 527-534

GIETZ D, ST JEAN A, WOODS RA & SCHIESTL RH:

Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells.

*Nucleic Acids Res* **20** (1992) 1425

GRAY MW:

The evolutionary origins of organelles.

*Trends Genet* **5** (1989) 294-299

GRAY MW, BURGER G & LANG BF:

The origin and early evolution of mitochondria.

*Genome Biol.* **2** (2001) 1018.1-1081.5

GUERRERO C, TAGWERKER C, KAISER P & HUANG L:

An Integrated Mass Spectrometry-based Proteomic Approach.

*Mol Cell Proteomics* **5** (2) (2006) 366-378

HARTL FU & NEUPERT W:

Protein Sorting to Mitochondria: Evolutionary Conservations of Folding and Assembly.

*Science* **247** (1990) 930-938

HERLAN M, VOGEL F, BORNHÖVD C, NEUPERT W & REICHERT AS:

Processing of Mgm1 by the Rhomboid-type Protease Pcp1 Is Required for Maintenance of Mitochondrial Morphology and of Mitochondrial DNA.

*J. of Biol. Chem.* **278** (2003) 30, 27781-27788

HILL JE, MYERS AM, KOERNER TJ & TZAGOLOFF A:

Yeast / *E. coli* shuttle vectors with multiple unique restriction sites.

*Yeast* **2** (1986) 163-167

INOUE H, NOJIMA H & OKAYAMA H:

High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids.

*Gene* **96** (1990) 23-28

ISAYA G, KALOUSEK F, FENTON WA & ROSENBERG LE:

Cleavage of precursors by the mitochondrial processing peptidase requires a compatible mature protein or an intermediate octapeptide.

*J Cell Biol* **113** (1991) 65-76

ISAYA G, KALOUSEK F & ROSENBERG LE:

Amino-terminal octapeptides function as recognition signals for the mitochondrial intermediate peptidase.

*J Biol Chem* **267** (1992) 7904-7910

JAN PS, ESSER K, PRATJE E & MICHAELIS G:

Som1, a third component of the yeast mitochondrial inner membrane peptidase complex that contains Imp1 and Imp2.

*Mol. Gen. Genet.* **263** (2000) 483-491

JEYARAJU DV, XU L, LETELLIER MC, BANDARU S, ZUNINO R, BERG EA, MCBRIDE HM & PELLEGRINI L:

Phosphorylation and cleavage of presenilin-associated rhomboid-like protein (PARL) promotes changes in mitochondrial morphology.

*PNAS* **103** (49) (2006) 18562-18567

KAPUT J, BRANDRISS MC & PRUSSAK-WIECKOWSKA T:

In Vitro Import of Cytochrome c Peroxidase into the Intermembrane Space: Release of the Processed Form by Intact Mitochondria.

*Journal of Cell Biology.* **109** (1989) 101-112

KASER M, KAMBACHELD M, KISTERS-WOIKE B & LANGER T:

Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease.

*J Biol Chem.* **278** (47) (2003) 46414-46423

KMIEC-WISNIEWSKA B, KRUMPE K, URANTOWKA A, SAKAMOTO W, PRATJE E & JANSKA H:

Plant mitochondrial rhomboid, AtRBL12, has different substrate specificity from its yeast counter part.

*Plant Mol Biol.* **68** (1-2) (2008) 159-171

KNIPPERS R, PHILIPPSEN P, SCHÄFER KP & FANNING E:

Molekulare Genetik.

5. neubearbeitete und erweiterte Auflage, Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1990

KÖHRER K & DOMDEY H:

Preparation of high molecular weight RNA.

*Methods Enzymol.* **194** (1991) 398-405

KUO SC & LAMPEN JO:

Tunicamycin – An Inhibitor of Yeast Glycoprotein Synthesis.

*Biochem Biophys Res Commun.* **58** (1) (1974) 287-295

KUTIK S, GUIARD B, MEYER HE, WIEDEMANN N & PFANNER N:

Cooperation of translocase complexes in mitochondrial protein import.

*JCB* **179** (4) (2007) 585-591

KUTIK S, STOJANOVSKI D, BECKER L, BECKERT, MEINECKE M, KRÜGER V, PRINZ C, MEISINGER C, GUIARD B, WAGNER R, PFANNER N & WIEDEMANN N:

Dissecting membrane insertion of mitochondrial beta-barrel proteins.

*Cell.* **132** (6) (2008) 1011-1024

KWON M, CHONG S, HAN S & KIM K:

Oxidative stresses elevate the expression of cytochrome c peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Biochem Biophys Acta.* **1623** (2003) 1-5

LAEMMLI UK:

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.

*Nature* **227** (1970) 680-685

LANGER T:

AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins.

*Trends Biochem Sci.* **25** (2000) 247-51

LAW RHP, MANON S, DEVENISH RJ & NAGLEY P:

ATP synthase from *Saccharomyces cerevisiae*.

*Meth Enzymol.* **260** (1995) 133-163

LEE FJ:

Modified protocol for yeast DNA mini-preparation.

*Biotechniques.* **12** (5) (1992) 677

LEIDHOLD C, VON JANOWSKY B, BECKER D, BENDER T & VOOS W:

Structure and function of Hsp78, the mitochondrial ClpB homolog.

*J Struct Biol.* **156** (2006) 149-164

LEMBERG MK, MENENDEZ J, MISIK A, GARCIA M, KOTH CM & FREEMAN M:

Mechanism of intramembrane proteolysis investigated with purified rhomboid proteases.

*EMBO J.* **24** (3) (2004) 464-472

LEMBERG MK & FREEMAN M:

Functional and evolutionary implications of enhanced genomic analysis of rhomboid intramembrane proteases.

*Genome Res.* **17** (2007) 1634-1646

LEONHARD K, HERRMANN JM, STUART RA, MANNHAUPT G, NEUPERT W & LANGER T:

AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces comprise a proteolytic system for the ATP-dependent degradation of inner membrane proteins in mitochondria.

*EMBO J* **15** (1996) 4218-4229

LODISH H, BERK A, ZIPURSKY SL, MATSUDAIRA P, BALTIMORE D & DARNELL J:

Molecular Cell Biology.

4<sup>th</sup> Edition, New York: W. H. Freeman and Company, 2000

MANN M & JENSEN ON:

Proteomic analysis of post-translational modifications.

*Nat Biotechnol.* **21** (3) (2003) 255-61

MARC P, MARGEOT A, DEVAUX F, BLUGEON C, CORRAL-DEBRINSKI M & JACQ C:

Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria.

*EMBO reports* **3** (2002) 159-164

MARGULIS L:

Origin of eukaryotic cells.

New Haven, CT: Yale Univ. Press., 1970

MARTINEZ-CABALLERO S, GRIGORIEV SM, HERMANN JM, CAMPO ML & KINALY KW:

Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23.

*J Biol Chem.* **282** (2) (2007a) 3584-93

MARTINEZ-CABALLERO S, PEIXTO PM, KINALLY KW & CAMPO ML:

A fluorescence assay for peptide translocation into mitochondria.

*Anal Biochem.* **362** (1) (2007b) 76-82

MCQUIBBAN GA, SAURYA S & FREEMAN M:

Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease.

*Nature.* **423** (6939) (2003) 537-541

MICHAELIS G, ESSER K, TURSUN B, STOHN JP, HANSON S & PRATJE E:

Mitochondrial signal peptidases of yeast: the rhomboid peptidase Pcp1 and its substrate cytochrome C peroxidase.

*Gene.* **354** (2005) 58-63

MEYER W, BÖMER U & PRATJE E:

Mitochondrial inner membrane bound Pet1402 is rapidly imported into mitochondria and affects the integrity of the cytochrome oxidase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complexes.

*Biol Chem.* **378** (1997) 1373-1379

MOKRANJAC D, SICHTING M, NEUPERT W & HELL K:

Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria.

*EMBO J.* **22** (19) (2003) 4945-4956

MÜHLHARDT C:

Der Experimentator: Molekularbiologie / Genomics.

3. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, 2002

NARAYANAN S, SATO T & WOLFE MS:

A C-terminal region of signal peptide peptidase defines a functional domain for intramembrane aspartic protease catalysis.

*J Biol Chem.* **282** (2007) 20172-20179

NEUPERT W:

Protein import into mitochondria.  
*Annu Rev Biochem* **66** (1997) 863-917

NEUPERT W & HERMANN JM:

Translocation of Proteins into Mitochondria.  
*Annu Rev Biochem* **76** (2007) 6.1-6.27

NOVAGEN®:

Novagen®: pET System Manual.  
11. Edition, Merck KgaA Darmstadt01/2006

NUNNARI J FOX TD & WALTER P:

A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities.  
*Science* **262** (1993) 1997-2004

OTERA H, TAIRAY, HORIE C, SUZUKI Y, SUZUKI H, SETOGUCHI K, KATO H, OKA T & MIHARA K:

A novel insertion pathway of mitochondrial outer membrane proteins with multiple transmembrane segments.  
*J Cell Biol.* **179**(7) (2007) 1355-1363

PAUL MF & TZAGOLOFF A:

Mutations in *RCA1* and *AFG3* inhibit F1-ATPase assembly in *S. cerevisiae*.  
*FEBS Lett.* **373** (1995) 66-70

PEARCE DA & SHERMAN F:

Degradation of Cytochrome Oxidase Subunits in Mutants of Yeast Lacking Cytochrome *c* and Suppression of the Degradation by Mutation of *yme1*.  
*J. Biol. Chem.* **270** (1995) 20879-20882

PEIXOTO PM, GRANA F, ROY TJ, DUNN CD, FLORES M, JENSEN RE & CAMPO ML:

Awaking TIM22, a dynamic ligand-gated channel for protein insertion in the mitochondrial inner membrane.

*J. Biol. Chem.* **282** (2007) 18694-18701

PELLEGRINI L, PASSER BJ, CANELLES M, LEFTEROV I, GANJEI JK, FOWLKES BJ *et al.*:

PAMP and PARL, two novel putative metalloproteases interacting with the COOH-terminus of Presenilin-1 and 2.

*J. Alzheimer's Dis.* **3** (2001) 181-190

PERRY AJ, RIMMER KA, MERTENS HD, WALLER RF, MULHERN TD, LITHGOW T & GOOLEY PR:

Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria.

*Plant Physiol Biochem.* **46**(3) (2008) 265-274

PFANNER N & GEISSLER A:

Versatility of the Mitochondrial Protein Import Machinery.

*Nat Rev Mol Cell Biol.* **2** (2001) 339-349

POPOV-CELEKETIC D, MAPA K, NEUPERT W & MOKRANJAC D:

Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria.

*EMBO J.* **27** (10) (2008) 1469-1480

PRATJE E & MICHAELIS G:

Allelism studies of mitochondrial mutants resistant to antimycin A or funiculosin in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Mol Gen Genet* **152** (1977a) 167-174

PRATJE E & MICHAELIS G:

Mapping of the two mitochondrial antimycin A resistance loci in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Mol Gen Genet* **156** (1977b) 79-85

PRATJE E & GUIARD B:

One nuclear gene controls the removal of transient pre-sequences from two yeast proteins: one encoded by nuclear the other by mitochondrial genome.

*EMBO J* **5** (1986) 1313-1317

PRATJE E, ESSER KH & MICHAELIS G:

The mitochondrial inner membrane peptidase.

ed. by G. von Heijne, Austin: RG Landes Company 1994

QUALMANN S:

Cytochrom *c*-Oxidase-Untereinheit 2: Mitochondrialer Import und proteolytische Reifung eines pflanzlichen Proteins in der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae* Meyen ex Hansen).

Diss. Universität Hamburg, 2003

RAWSON RB, ZELENSKI NG, NIJHAWAN D, YE J, SAKAI J *ET AL.*:

Complementation cloning of S2P, a gene encoding a putative metalloprotease required for intramembrane cleavage of SREBPs.

*Mol Cell.* **1** (1997) 47-57

REHM H:

Der Experimentator: Proteinbiochemie / Proteomics.

4. Auflage, Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag, Gustav Fischer, 2002

REHLING P, MODEL K, BRANDNER K, KOVERMANN P, SICKMANN A, MEYER HE, KÜHLBRANDT W, WAGNER R, TRUSCOTT KN & PFANNER N:

Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase.

*Science* **299** (5613) (2003) 1747-1751

REID GA, YONETANI T & SCHATZ G:

Import of Proteins into Mitochondria: Import and Maturation of the Mitochondrial Intermembrane Space Enzymes Cytochrome *b*<sub>2</sub> and Cytochrome *c* Peroxidase in Intact Yeast Cells.

*Journal of Biological Chemistry.* **257** (1984) 13068-13074

REINDERS J, ZAHEDI RP, PFANNER N, MEISINGER C & SICKMANN A:

Toward the Complete Yeast Mitochondrial Proteome: Multidimensional Separation Techniques for Mitochondrial Proteomics.

*J Proteome Res.* **5** (2006) 1543-1554

ROCHE:

DIG Application Manual for Filter Hybridization.

*Roche Diagnostics GmbH.* (2000)

ROISE D:

Recognition and binding of mitochondrial presequences during the import of proteins into mitochondria.

*J Bioenerg Biomembranes* **29** (1997) 19-27

ROISE D & SCHATZ G:

Mitochondrial presequences.

*J Biol Chem.* **263** (1988) 4509-4511

SAKAKI K, TASHIRO K, KUHARA S & MIHARA K:

Response of Genes Associated with Mitochondrial Function to Mild Heat Stress in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*.

*J Biochem.* **134** (2003) 373-384

SAMBROOK J, MANIATIS T & FRITSCH EF:

Molecular cloning: A laboratory manual.

2<sup>nd</sup> Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989

SAMBROOK J & RUSSELL DW:

Molecular cloning: A laboratory manual.

3<sup>rd</sup> Edition, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001

SCHÄGGER H & VON JAGOW G:

Blue Native Electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.

Analytical Biochemistry **199** (2) (1991) 223-231

SCHÄGGER H, CRAMER WA & JAGOW G V:

Analysis of Molecular Masses and Oligomeric States of Protein Complexes by Blue Native Electrophoresis and Isolation of Membrane Protein Complexes by Two-Dimensional Native Electrophoresis.

Analytical Biochemistry **217** (1994) 220-230

SCHÄGGER H & PFEIFFER K:

Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria.

*EMBO J* **19** (2000) 1777-1783

SCHÄGGER H:

Respiratory chain supercomplexes of mitochondria and bacteria.

*Biochimica et Biophysica Acta* **1555** (2002) 154-159

SCHAMEL WWA, KUPPIG S, BECKER B, GIMBORN K, HAURI, HP & RETH M

A high-molecular-weight complex of the membrane proteins BAP29/BAP31 is involved in the retention of membrane-bound IgD in the endoplasmic reticulum.

*PNAS* **100** (17) (2003) 9861-9866

SEIBEL N:

Intramitochondrialer Proteintransport: Charakterisierung des am Cytochrom c Peroxidase-Transport beteiligten YGR101w-Proteins.

Diplomarb. Universität Hamburg, 2002

SESAKI H, SOUTHARD SM, HOBBS AE & JENSEN RE:

Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion.

*Biochem Biophys Res Commun.* **308** (2) (2003) 276-283

SESAKI H, SOUTHARD SM, YAFFE MP & JENSEN RE:

Mgm1p, a Dynamin-related GTPase, Is Essential for Fusion of the Mitochondrial Outer Membrane.

*Mol Biol Cell* **14** (2003) 2342-2356

SHANKLIN J, ACHIM C, SCHMIDT H, FOX BG & MÜNCK E:

Mössbauer studies of alkane  $\omega$ -hydrolase: Evidence for a diiron cluster in an integral-membrane enzyme.

*PNAS.* **4** (1997) 2981-2986

SIK A, PASSER BJ, KOONIN EV & PELLEGRINI L:

Self-regulated cleavage of the mitochondrial intramembrane-cleaving protease PARL yields Pbeta, a nuclear-targeted peptide.

*J Biol Chem.* **48** (3) (2004) 459-468

SINGH S, PLASSMEYER M, GAUR D & MILLER LH:

Mononeme: a new secretory organelle in Plasmodium falciparum merozoites identified by localization of rhomboid-1 protease.

*PNAS.* **104** (50) (2007) 20043-20048

STEENSMA HY, HOLTERMAN L, DEKKER I VAN LUIS CA & WENZEL TJ:

Molecular cloning of the gene for the E1 $\alpha$  subunit of the pyruvate dehydrogenase complex from *Saccharomyces cerevisiae*.

*Eur. J. Biochem.* **191** (1990) 769-774

STEIN G:

Analyse funktionell unbekannter Gene der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*.

Diss. Düsseldorf 1999

STEINMETZ LM, SCHARFE, C DEUTSCHBAUER AM, MOKRANJAC D, HERMAN ZS, JONES T, CHU AM, GIAEVER G, PROKISCH H, OEFNER PJ & DAVIS RW:

Systematic screen for human disease genes in yeast.

*Nature Genetics* **31** (2002) 400-404

STEVENSON LG, STRISOVSKY K, CLEMMER KM, BHATT S, FREEMAN M & RATHER PN:

Rhomboid protease AarA mediates quorum-sensing in *Providencia stuartii* by activating TatA of the twin-arginine translocase.

*PNAS* **104** (3) (2007) 1003-1008

STOJANOVSKI D, GUIARD B, KOZJAK-PAVLOVIC V, PFANNER N & MEISINGER C:

Alternative function for the mitochondrial SAM complex in biogenesis of alpha-helical TOM proteins.

*J Cell Biol.* **179** (5) (2007) 881-893

STRASBURGER E, SITTE P, ZIEGLER H, EHRENDORFER F & BRESINSKY A:

Lehrbuch der Botanik.

34. Auflage, Stuttgart: Gustav Fischer Verlag, 1998

STRIEBEL HM, RYSAVY P, ADAMEC J, SPIZEK J & KALOUSEK F:

Mutational analysis of both subunits from rat mitochondrial processing peptidase.

*Arch Biochem Biophys.* **335** (1996) 211-218

Stryer L:

Biochemie.

4. Auflage (korrigierter Nachdruck), Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag GmbH, 1999

SUNG MK & HUH WK:

Bimolecular fluorescence complementation analysis system for *in vivo* detection of protein-protein interaction in *Saccharomyces cerevisiae*.

*Yeast* **27** (2007) 767-775

TAYLOR AB, SMITH BS, KITADA S, KOJIMA K, MIYaura H, OTWINOWSKI Z, ITO A & DEISENHOFER J:

Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences.

*Structure (Cambridge)* **9** (2001) 615-625

TAYLOR FJR:

Implications and Extensions of the Serial Endosymbiosis Theory of the Origin of Eukaryotes.

*Taxon* **23** (1974) 229-258

TOWBIN H, STAHELIN T & GORDON J:

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications.

*Proc Natl Acad Sci USA* **76** (1979) 4350-4354

TURSUN B:

Biogenese von Hefemitochondrien. Lokalisation und proteolytische Reifung der Cytochrom c Peroxidase in *Saccharomyces cerevisiae*.

Diplomarb. Universität Hamburg, 2001

TZAGOLOFF A, YUE J, JANG J & PAUL MF:

A new member of a family of ATPases is essential for assembly of mitochondrial respiratory chain and ATP synthetase complexes in *S. cerevisiae*.

*J. Biol. Chem.* **269** (1994) 26144-26151

URBAN S, LEE JR & FREEMAN M:

Drosophila Rhomboid-1 Defines a Family of Putative Intramembrane Serine Proteases.

*Cell.* **107** (2001) 173-182

URBAN S, LEE JR, & FREEMAN M:

A family of Rhomboid intramembrane proteases activates all *Drosophila* membrane-tethered EGF-ligands.

*EMBO J.* **21** (2002) 4277-4286

URBAN S:

Rhomboid proteins: conserved membrane proteases with divergent biological functions.

*Genes Dev.* **20** (2008) 3054-3068

VAN DER LAAN M, RISSLER M & REHLING P:

Mitochondrial preprotein translocases as dynamic molecular machines.

*FEMS Yeast Res.* **6** (6) (2006) 849-61

VAN DYCK L & LANGER T:

ATP-Dependent Proteases Controlling Mitochondrial Function in the Yeast *Sacharomyces cerevisiae*.

*CMLS.* **56** (1999) 825-842

VON HEIJNE G, STEPPUHN J & HERMANN RG:

Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides.

*Eur J Biochem.* **180** (1989) 535-545

WAGNER I, VAN DYCK L, S.SAVEL'EV A, NEUPERT W & LANGER T:

Autocatalytic processing of the ATP-dependent PIM1 protease: crucial function of a pro-region for sorting to mitochondria.

*EMBO J* **16** (24) (1997) 7317-7325

WANG Y, ZHANG Y & HA Y:

Crystal structure of a rhomboid family intramembrane protease.

*Nature* **444** (7116) (2006) 179-180

WASSERMAN JD, URBAN S & FREEMAN M:

A family of rhomboid-like genes: *Drosophila* rhomboid-1 and roughoid/rhomboid-3 cooperate to activate EGF receptor signalling.

*Genes & Development*. **14** (2000) 1651-1663

WENZEL TJ, TEUNISSEN AWRH & STEENSMA HY:

*PDA1* mRNA: a standard for quantitation of mRNA in *Saccharomyces cerevisiae* superior to *Act1* mRNA.

*Nucl. Acid Res.* **23** (5) (1995) 883-884

WHEALAN J, TANUDJI MR, SMITH MK & DAY DA:

Evidence for a link between translocation and processing during import into soybean mitochondria.

*Biochim. Biophys. Acta* **1312** (1996) 48-54

WINZELER EA, SHOEMAKER DD, ASTROMOFF A, LIANG H, ANDERSON K, ANDRE B, BANGHAM R, BENITO R, BOEKE JD, BUSSEY H, CHU AM, CONNELLY C, DAVIS K, DIETRICH F, DOW SW, EL BAKKOURY M, FOURY F, FRIEND SH, GENTALEN E, GIAEVER G, HEGEMANN JH, JONES T, LAUB M, LIAO H, DAVIS RW, *et al.*:

Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis.

*Science* **285** (1999) 901-906

WITTIG I, BRAUN HP & SCHÄGGER H:

Blue native PAGE.

*Nature Protocols* **1** (1) (2006) 418-428

WOLFE MS, XIA W, OSTASZEWSKI BL, DIEHL TS, KIMBERLY WT & SELKOE DJ:

Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity.

*Nature* **398** (1999) 513-537

WONG ED, WAGNER JA, GORSICH SW, McCAFFERY JM, SHAW, JM & NUNNARIJ:  
The Dynamin-related GTPase, Mgm1p, Is an Intermembrane Space Protein  
Required for Maintenance of Fusion Competent Mitochondria.  
*J Cell Biol.* **151** (2000) 341-352

WONG ED, WAGNER JA, SCOTT SV, OKREGLAK V, HOLEWINSKE TJ, CASSIDY-STONE A &  
NUNNARI J:  
The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a  
protein complex that mediates mitochondrial fusion.  
*J Cell Biol.* **160** (2003) 303-311

WU Z, YAN N, FENG L, OBERSTEIN A, YAN H, BAKER RP, GU L, JEFFEREY PD, URBAN S &  
SHI Y:  
Structural analysis of a rhomboid family intramembrane protease reveals a  
gating mechanism for substrate entry.  
*Nat Struct. Mol Biol.* **13** (12) (2006) 1084-1091

YAFFE MP, OHTA S & SCHATZ G:  
A yeast mutant temperature-sensitive for mitochondrial assembly is deficient  
in a mitochondrial protease activity that cleaves imported precursor  
polypeptides.  
*EMBO J* **4** (1985) 2069-2074

YAFFE MP:  
Analysis of mitochondrial function and assembly.  
*Meth. Enzymol.* **194** (1991) 627-643

YAFFE MP:  
The Machinery of Mitochondrial Inheritance and Behavior.  
*Science* **283** (1999a) 1493-1497

YAFFE MP:  
Dynamic mitochondria.  
*Nat Cell Biol.* **1** (1999b) E149-E150

YANG M, JENSEN RE, YAFFE MP, OPPLIGER W & SCHATZ G:

Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear MAS1 and MAS2 genes.

*EMBO J* 7 (1988) 3857-3862

## Verwendete Datenbanken und Internetquellen

Allgemeine Recherche

<http://www.google.de>

NCBI (National Center for Biotechnology Information, u.a. PubMed)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

*Saccharomyces* Genome Database (*Saccharomyces* Genom-Datenbank)

<http://www.yeastgenome.org>

Peptidase-Datenbank:

<http://merops.sanger.ac.uk/>

Expasy Molecular Biology Server

<http://www.expasy.org/>

ClustalW2 (Alignmentprogramm für Proteine)

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>

NetPhos 2.0 (Programm zur Voraussage von Phosphorylierungsstellen)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>

NetPhosYeast 1.0 (Programm zur Voraussage von Phosphorylierungsstellen in Hefe)

<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhosYeast/>

TMpred

[http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html)

TMHMM

<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>

HMMTOP

<http://www.enzim.hu/hmmtop/>

SOSUI

<http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/>

iPSORT (Voraussage der Lokalisierung anhand der Proteinsequenz)

<http://biocaml.org/ipsort/iPSORT/index.html>

MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences)

<http://mips.gsf.de/>

Mitop2 (Mitochondrial Proteome Database)

<http://www.mitop.de:8080/mitop2/>

## Gen- und Aminosäuresequenz von *PCP1* / *Pcp1p*

Im Folgenden ist die Gensequenz von *PCP1* und die Übersetzung in die Aminosäuresequenz dargestellt. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben.

1	ATGTCAGGTGTAAGCTCTGTTATGCTCGGTCTTCGACCTGCTACAAGAATTTTTTTCCGC	60
<b>1</b>	<b>M S G V S S V M L G L R P A T R I F F R</b>	<b>20</b>
61	AGTAATATTTCCGTTTTCACCTTCGAGGACTTTTGTATCATATATTGGAAGATCCCAGAGC	120
<b>21</b>	<b>S N I S V S P S R T F V S Y I G R S Q S</b>	<b>40</b>
121	ACGTCGATACTCAAAAATGCTCCCAACTTAGAGGACAATGTCACAAATCTTCAGAAAATT	180
<b>41</b>	<b>T S I L K N A P N L E D N V T N L Q K I</b>	<b>60</b>
181	ATACCGAAACGGTCTTTTTCTCAAACATCAATTTTGAAATCAAGGTGGAAGCCTATATTC	240
<b>61</b>	<b>I P K R F F S Q T S I L K S R W K P I F</b>	<b>80</b>
241	AATGAAGAACTACTAATCGATACGTACGTTTGAACAGGTTTCAGCAGTACCAGCAGCAG	300
<b>81</b>	<b>N E E T T N R Y V R L N R F Q Q Y Q Q Q</b>	<b>100</b>
301	AGAAGCGGCGGCAATCCTCTGGGCTCTATGACTATTTTGGGGCTCTCTTTAATGGCAGGA	360
<b>101</b>	<b>R S G G N P L G S M T I L G L S L M A G</b>	<b>120</b>
361	ATATATTTTGGCTCCCCTTATTTGTTTCGAGCACGTTCCACCCTTTACGTATTTTAAGACG	420
<b>121</b>	<b>I Y F G S P Y L F E H V P P F T Y F K T</b>	<b>140</b>
421	CATCCAAAGAATCTGGTATACGCGTTATTAGGCATCAATGTTGCCGTATTTGGACTATGG	480
<b>141</b>	<b>H P K N L V Y A L L G I N V A V F G L W</b>	<b>160</b>
481	CAGCTACCCAAATGCTGGAGGTTTCTACAGAAGTACATGTTGCTGCAAAAGGATTACGTA	540
<b>161</b>	<b>Q L P K C W R F L Q K Y M L L Q K D Y V</b>	<b>180</b>
541	ACTAGCAAAATTTTCGATAATCGGAAGTGCGTTTTTACATCAAGAATTCTGGCACTTAGGT	600
<b>181</b>	<b>T S K I S I I G S A F S H Q E F W H L G</b>	<b>200</b>
601	ATGAACATGCTAGCGTTGTGGTCCTTTGGTACTTCACTCGCAACAATGTTGGGAGCATCC	660
<b>201</b>	<b>M N M L A L W S F G T S L A T M L G A S</b>	<b>220</b>
661	AATTTTTTCTCCTTATATATGAATAGTGCCATTGCAGGTTCTTTGTTTTCGTTATGGTAT	720
<b>221</b>	<b>N F F S L Y M N S A I A G S L F S L W Y</b>	<b>240</b>
721	CCAAAACCTGGCAGCCTAGCCATTGTCGGACCTAGCTTGGGTGCCAGTGGAGCGCTATTT	780
<b>241</b>	<b>P K L A R L A I V G P S L G A S G A L F</b>	<b>260</b>
781	GGGGTTTTAGGATGTTTTTCATATCTATTCCACACGCTAAAATTTTGTGTTTGTTTTC	840
<b>261</b>	<b>G V L G C F S Y L F P H A K I L L F V F</b>	<b>280</b>
841	CCAGTCCCAGGTGGGGCTTGGGTAGCATTCTTGGCTTCAGTGGCATGGAATGCAGCTGGT	900
<b>281</b>	<b>P V P G G A W V A F L A S V A W N A A G</b>	<b>300</b>
901	TGTGCTTTAAGATGGGGGTCAATTTGATTACGCTGCGCATTTAGGTGGCTCTATGATGGGG	960
<b>301</b>	<b>C A L R W G S F D Y A A H L G G S M M G</b>	<b>320</b>
961	GTCTTGTACGGATGGTATATAAGTAAAGCTGTAGAGAAACAAAGGCAGCGTCGCCTTCAG	1020
<b>321</b>	<b>V L Y G W Y I S K A V E K Q R Q R R L Q</b>	<b>340</b>
1021	GCTGCTGGTAGGTGGTTTTTAA	1041
<b>341</b>	<b>A A G R W F *</b>	<b>346</b>

## Hefevektor YCplac111 und YCplac111-Konstrukte

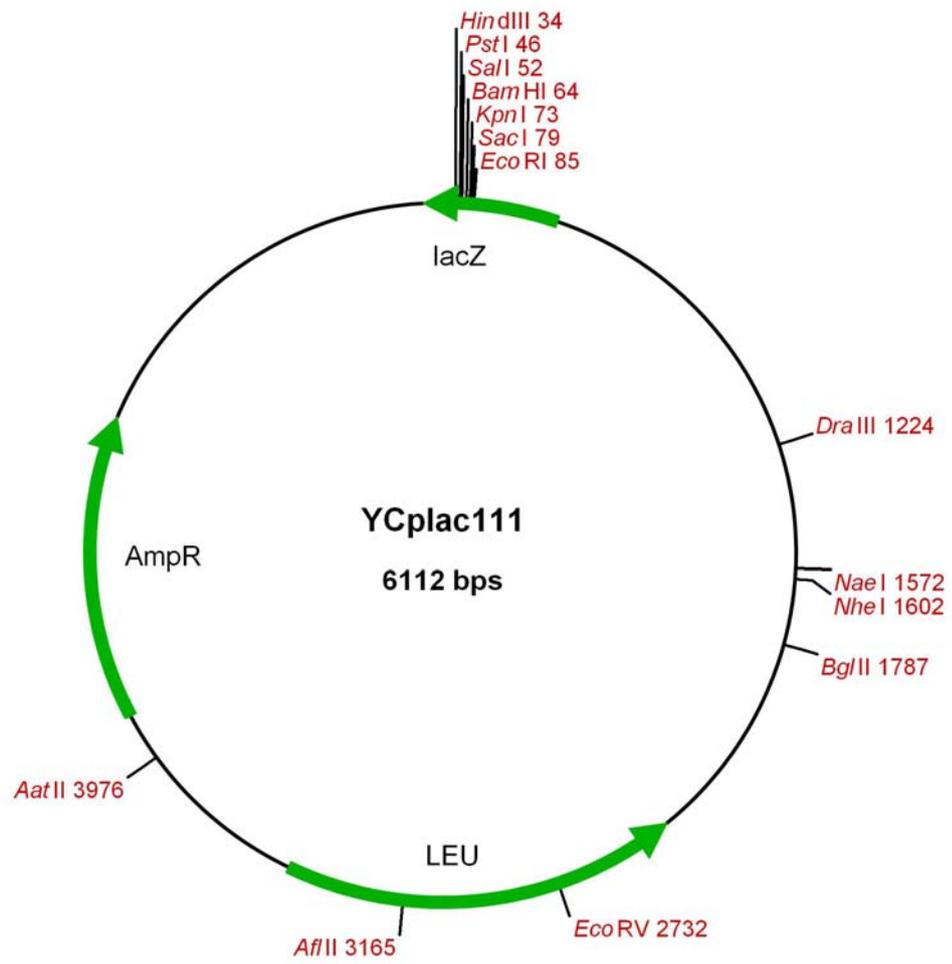
YCplac111 ist ein „low copy“-Vektor (GIETZ & SUGINO 1988). Es handelt sich dabei um einen E. coli/Hefe-Shuttlevektor. Die Sequenz ist auf der Homepage von NCBI unter der Accesion-Nummer X75457 zu finden.

Auf den folgenden Seiten ist sowohl der Hefevektor YCplac111 als auch die entsprechenden Konstrukte dargestellt. Dabei handelt es sich um die Konstrukte mit den Punktmutationen. Das *PCP1*-Gen (genomische DNA als Template) wurde mit den angegebenen Primern in den YCplac111-Vektor kloniert, der dann als Template für die weiteren Konstrukte diente.

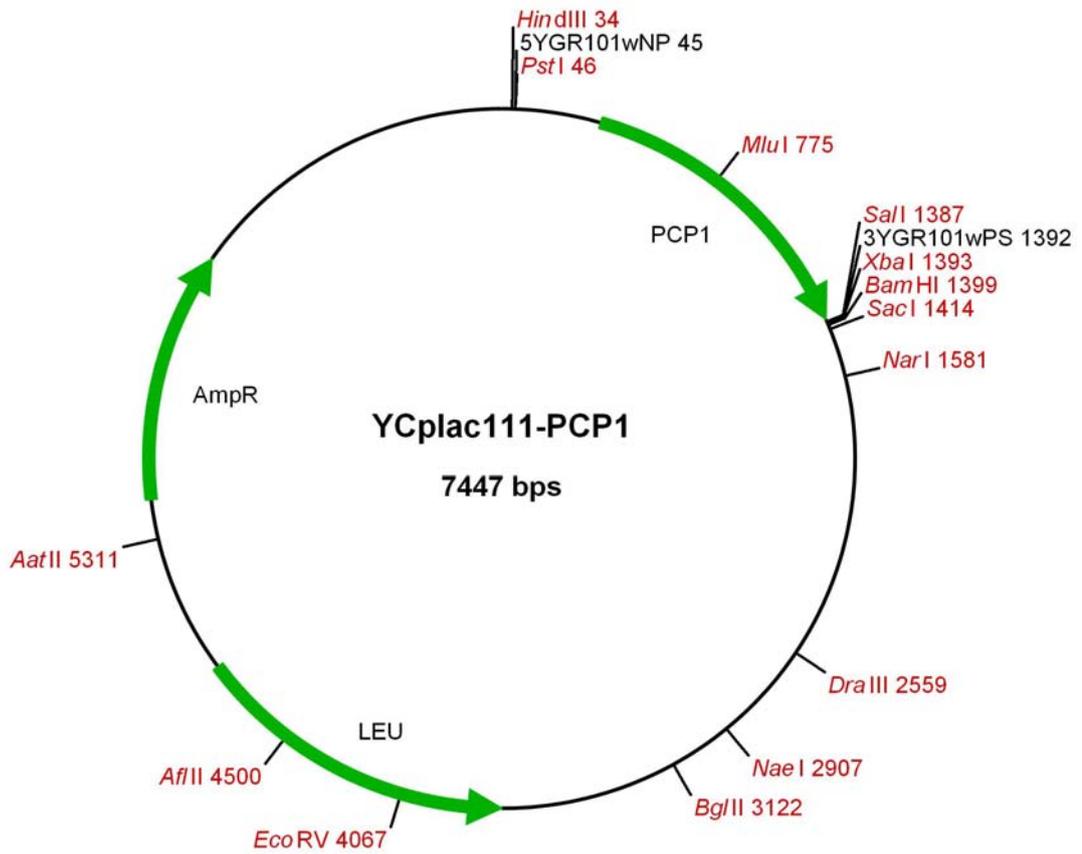
Die Plasmidkarten zeigen das Plasmid und die Konstrukte schematisch. Die Gene sind durch die grünen Pfeile markiert. Restriktionsstellen sind rot und kursiv, Primerbindestellen schwarz angegeben. Die Zahlen dahinter bezeichnen die entsprechende Position innerhalb der Vektoren. Die Gesamtgröße ist ebenso wie der Name angegeben.

Die Sequenzen der Konstrukte sind nur teilweise angegeben. Zur Orientierung sind in der ersten Spalte die Basennummern angegeben. Die Primer sind oberhalb der Sequenz entsprechend ihrer Bindestellen eingezeichnet und gelb hinterlegt. Die Orientierung ist ebenfalls durch eine Pfeilspitze festgelegt ( $3' < 5'$ ,  $5' > 3'$ ). Nicht passende Basen sind in der Primersequenz klein dargestellt, beziehen sich aber nur auf die vorliegende Sequenz. Das klonierte Gen ist unterstrichen.

## Hefevektor YCplac111 (Plasmidkarte)



## Das Konstrukt YCplac111-PCP1 (Plasmidkarte)



---

 Das Konstrukt YCplac111-*PCP1* (Sequenz)

**5YGR101wNP >**

5 CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA AGCTTGCATG CCTGCAGTAT TGAATTTGAA  
 GCATG

65 GCATGAAATC GTGCTTATCA ATTTTATGTC ACCCTAAAAC ATCTGTACGT GTTTATATAG

125 ATATTTAAAG CAATATTTGC CAGGATTTGG TGAAGATCCC TCATATAACT CTCATAAATG

185 CGGATTTTCG GAGCGAAAAA AGCCTAAATF CTTGTCTGGA AGTATAATTG GCGGTGAAAT

245 AGAAAAGGTG GCAATCACGA CTGAAAAGGG TACAGCTTTC GCAACTGACA TATACAGACA

305 GTGAAAAGTA ATAAATTGCC CAAGTGTGAA CATGTCAGGT GTAAGCTCTG TTATGCTCGG

365 TCTTCGACCT GCTACAAGAA TTTTTTCCG CAGTAATATT TCGGTTTCAC CTTCGAGGAC

425 TTTTGTATCA TATATTGGAA GATCCCAGAG CACGTCGATA CTCAAAAATG CTCCCAACTT

485 AGAGGACAAT GTCACAAATC TTCAGAAAAAT TATACCGAAA CGGTTCTTTT CTCAAACATC

545 AATTTTGAAA TCAAGGTGGA AGCCTATATT CAATGAAGAA ACTACTAATC GATACGTACG

605 TTTGAACAGG TTTCAGCAGT ACCAGCAGCA GAGAAGCGGC GGCAATCCTC TGGGCTCTAT

665 GACTATTTTG GGGCTCTCTT TAATGGCAGG AATATATTTT GGCTCCCCTT ATTTGTTCTGA

725 GCACGTTCCA CCCTTTACGT ATTTTAAGAC GCATCCAAAG AATCTGGTAT ACGCGTTATT

785 AGGCATCAAT GTTGCCGTAT TTGGACTATG GCAGCTACCC AAATGCTGGA GGTTTCTACA

845 GAAGTACATG TTGCTGCAAA AGGATTACGT AACTAGCAAA ATTTGATAA TCGGAAGTGC

905 GTTTTCACAT CAAGAATTCT GGCACCTAGG TATGAACATG CTAGCGTTGT GGTCCTTTGG

965 TACTTCACTC GCAACAATGT TGGGAGCATC CAATTTTTTC TCCTTATATA TGAATAGTGC

1025 CATTGCAGGT TCTTTGTTTT CGTTATGGTA TCCAAAACCTG GCACGCCTAG CCATTGTCGG

1085 ACCTAGCTTG GGTGCCAGTG GAGCGCTATT TGGGGTTTTA GGATGTTTTT CATATCTATT

1145 CCCACACGCT AAAATTTTGC TGTTTGTTTT CCCAGTCCCA GGTGGGGCTT GGTAGCATT

1205 CTTGGCTTCA GTGGCATGGA ATGCAGCTGG TTGTGCTTTA AGATGGGGGT CATTGATTA

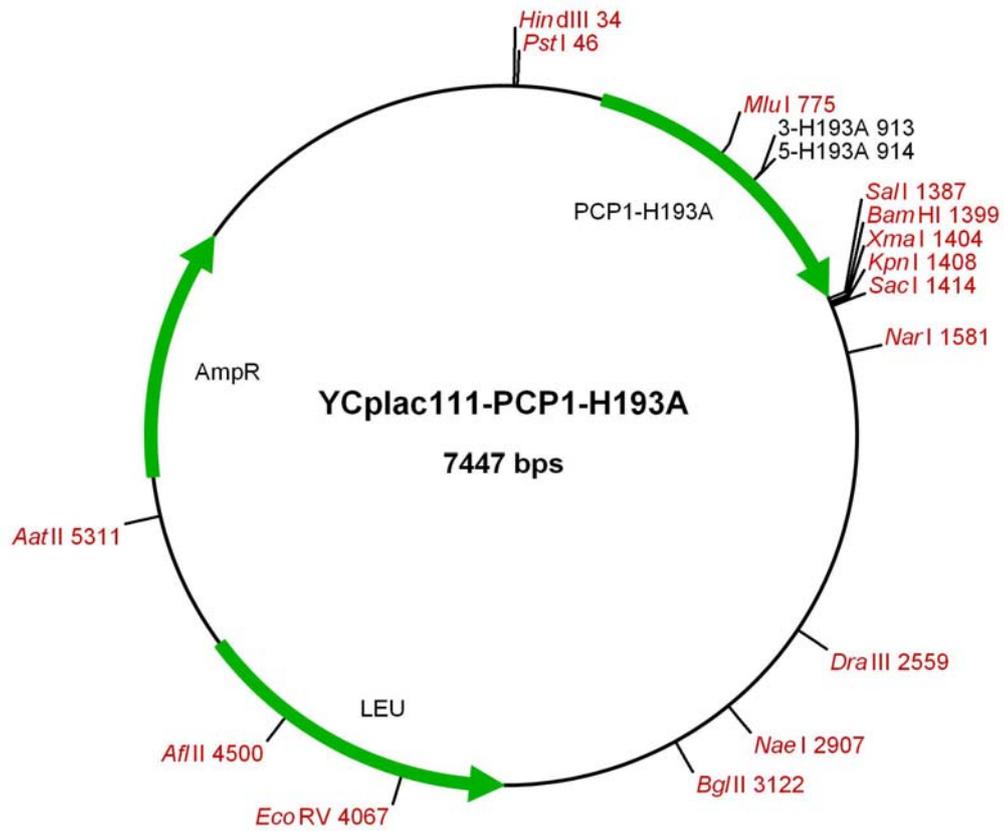
1265 CGCTGCGCAT TTAGGTGGCT CTATGATGGG GGTCTTGTAC GGATGGTATA TAAGTAAAGC

**< 3YGR101wPS**

1325 TGTAGAGAAA CAAAGGCAGC GTCGCCTTCA GGCTGCTGGT AGGTGGTTTT AATCACTTAA  
 TTCAGCTGtgt

1385 AAGTCGACTC TAGAGGATCC CCGGTACCG AGCTCGAATT CACTGGCCGT CGTTTTACA

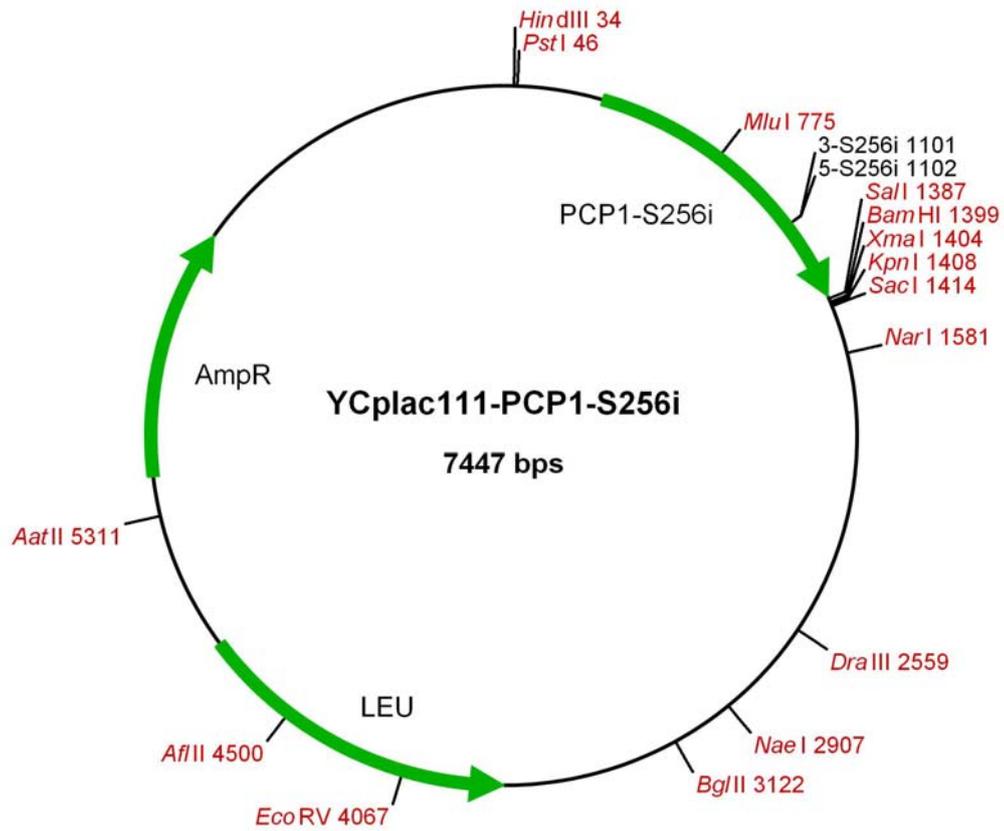
## Das Konstrukt YCplac111-PCP1-H193A (Plasmidkarte)



## Das Konstrukt YCplac111-PCP1-H193A (Sequenz)

5 CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA AGCTTGCATG CCTGCAGTAT TGAATTTGAA  
 65 GCATGAAATC GTGCTTATCA ATTTTATGTC ACCCTAAAAC ATCTGTACGT GTTTATATAG  
 125 ATATTTAAAG CAATATTTGC CAGGATTTGG TGAAGATCCC TCATATAACT CTCATAAATG  
 185 CGGATTTTCG GAGCGAAAAA AGCCTAAATT CTTGTCTGGA AGTATAATTG GCGGTGAAAT  
 245 AGAAAAGGTG GCAATCACGA CTGAAAAGGG TACAGCTTTC GCAACTGACA TATACAGACA  
 305 GTGAAAAGTA ATAAATTGCC CAAGTGTGAA CATGTCAGGT GTAAGCTCTG TTATGCTCGG  
 365 TCTTCGACCT GCTACAAGAA TTTTTTCCG CAGTAATATT TCGGTTTCAC CTTCGAGGAC  
 425 TTTTGTATCA TATATTGGAA GATCCAGAG CACGTCGATA CTCAAAAATG CTCCCAACTT  
 485 AGAGGACAAT GTCACAAATC TTCAGAAAAT TATACCGAAA CGGTTCTTTT CTCAAACATC  
 545 AATTTTGAAA TCAAGGTGGA AGCCTATATT CAATGAAGAA ACTACTAATC GATACGTACG  
 605 TTTGAACAGG TTTCAGCAGT ACCAGCAGCA GAGAAGCGGC GGCAATCCTC TGGGCTCTAT  
 665 GACTATTTTG GGGCTCTCTT TAATGGCAGG AATATATTTT GGCTCCCCTT ATTTGTTCTA  
 725 GCACGTTCCA CCCTTACGT ATTTTAAGAC GCATCCAAAG AATCTGGTAT ACGCGTTATT  
 785 AGGCATCAAT GTTGCCGTAT TTGACTATG GCAGCTACCC AAATGCTGGA GTTTCTACA  
 < 3-H193A  
 845 GAAGTACATG TTGCTGCAA AGGATTACGT AACTAGCAA ATTTCGATA TCGGAAGTGC  
 T AGCCTTCACG  
 5-H193A >  
 G CAAGAATTCT GGCACCTAGG T  
 CAAAAGTCG  
 905 GTTTTCAGCG CAAGAATTCT GGCACCTAGG TATGAACATG CTAGCGTTGT GGTCCTTTGG  
 965 TACTTCACTC GCAACAATGT TGGGAGCATC CAATTTTTTC TCCTTATATA TGAATAGTGC  
 1025 CATTGCAGGT TCTTTGTTTT CGTTATGGTA TCCAAAACCTG GCACGCCTAG CCATTGTCGG  
 1085 ACCTAGCTTG GGTGCCAGTG GAGCGCTATT TGGGGTTTTA GGATGTTTTT CATATCTATT  
 1145 CCCACACGCT AAAATTTTGC TGTFTGTTTT CCCAGTCCCA GGTGGGGCTT GGGTAGCATT  
 1205 CTTGCTTCA GTGGCATGGA ATGCAGCTGG TTGTGCTTTA AGATGGGGGT CATTGATTA  
 1265 CGCTGCGCAT TTAGGTGGCT CTATGATGGG GGTCTTGTAC GGATGGTATA TAAGTAAAGC  
 1325 TGTAGAGAAA CAAAGGCAGC GTCGCCTTCA GGCTGCTGGT AGGTGGTTTT AATCACTTAA  
 1385 AAGTCGACTC TAGAGGATCC CCGGTACCG AGCTCGAATT CACTGGCCGT CGTTTTACA

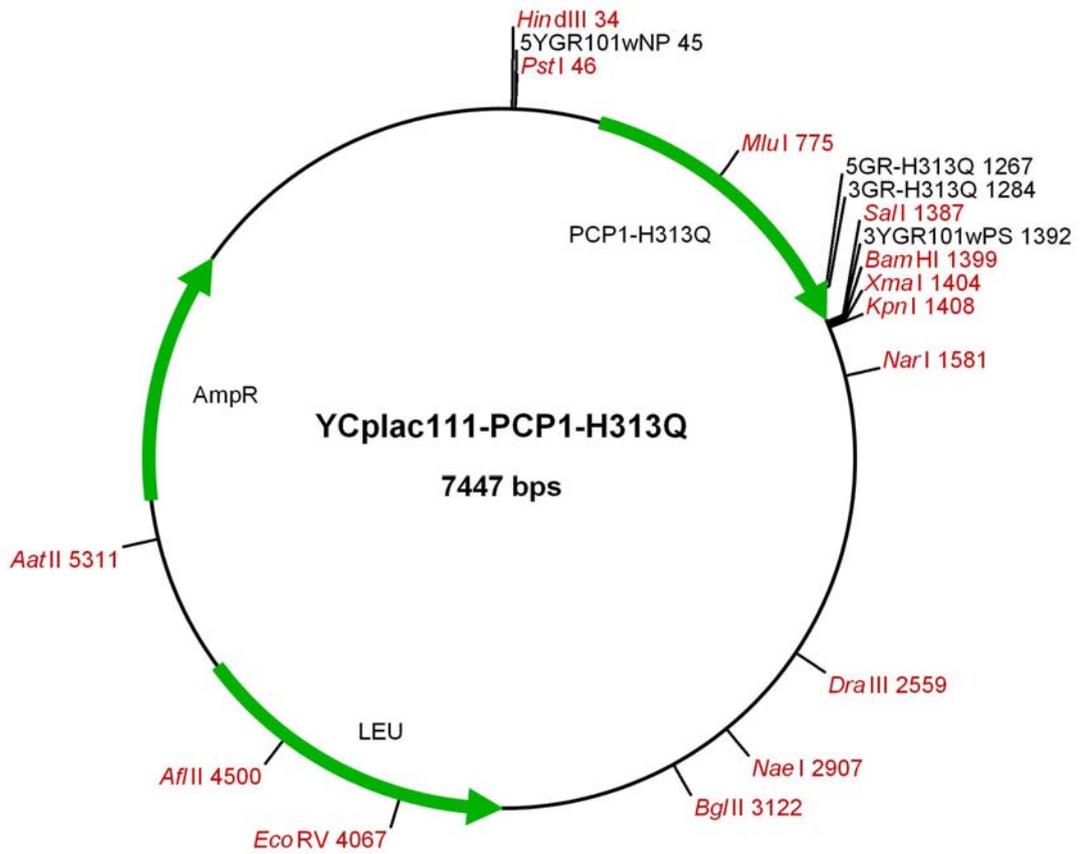
## Das Konstrukt YCplac111-PCP1-S256i (Plasmidkarte)



Das Konstrukt YCplac111-*PCP1-S256i* (Sequenz)

5 CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA AGCTTGCATG CCTGCAGTAT TGAATTTGAA  
 65 GCATGAAATC GTGCTTATCA ATTTTATGTC ACCCTAAAAC ATCTGTACGT GTTTATATAG  
 125 ATATTTAAAG CAATATTTGC CAGGATTTGG TGAAGATCCC TCATATAACT CTCATAAATG  
 185 CGGATTTTCG GAGCGAAAAA AGCCTAAATT CTTGTCTGGA AGTATAATTG GCGGTGAAAT  
 245 AGAAAAGGTG GCAATCACGA CTGAAAAGGG TACAGCTTTC GCAACTGACA TATACAGACA  
 305 GTGAAAAGTA ATAAATTGCC CAAGTGTGAA CATGTCAGGT GTAAGCTCTG TTATGCTCGG  
 365 TCTTCGACCT GCTACAAGAA TTTTTTCCG CAGTAATATT TCGGTTTCAC CTTCGAGGAC  
 425 TTTTGTATCA TATATTGGAA GATCCAGAG CACGTCGATA CTCAAAAATG CTCCCAACTT  
 485 AGAGGACAAT GTCACAAATC TTCAGAAAAA TATACCGAAA CGGTTCTTTT CTCAAACATC  
 545 AATTTTGAAA TCAAGGTGGA AGCCTATATT CAATGAAGAA ACTACTAATC GATACGTACG  
 605 TTTGAACAGG TTTCAGCAGT ACCAGCAGCA GAGAAGCGGC GGCAATCCTC TGGGCTCTAT  
 665 GACTATTTTG GGGCTCTCTT TAATGGCAGG AATATATTTT GGCTCCCCTT ATTTGTTCTG  
 725 GCACGTTCCA CCCTTACGT ATTTTAAGAC GCATCCAAAG AATCTGGTAT ACGCGTTATT  
 785 AGGCATCAAT GTTGCCGTAT TTGACTATG GCAGCTACCC AAATGCTGGA GGTTTCTACA  
 845 GAAGTACATG TTGCTGCAA AGGATTACGT AACTAGCAA ATTTGATAA TCGGAAGTGC  
 905 GTTTTTCACAT CAAGAATTCT GGCACCTAGG TATGAACATG CTAGCGTTGT GGTCCTTTGG  
 965 TACTTCACTC GCAACAATGT TGGGAGCATC CAATTTTTTC TCCTTATATA TGAATAGTGC  
  
 1025 CATTGCAGGT TCTTTGTTTT CGTTATGGTA TCCAAAACCTG GCACGCCTAG CCATTGTCGG **C**  
  
**5-s256i >**  
**< 3-s256i** **TTG GAGCGCTATT TGGGGT**  
**TGGATCGAAC CCACGTT**  
 1085 ACCTAGCTTG GGTGCAATTG GAGCGCTATT TGGGGTTTTA GGATGTTTTT CATATCTATT  
 1145 CCCACACGCT AAAATTTTGC TGTTTGTFFF CCCAGTCCCA GGTGGGGCTT GGGTAGCATT  
 1205 CTTGGCTTCA GTGGCATGGA ATGCAGCTGG TTGTGCTTTA AGATGGGGGT CATTGATTA  
 1265 CGCTGCGCAT TTAGGTGGCT CTATGATGGG GGTCTTGTAC GGATGGTATA TAAGTAAAGC  
 1325 TGTAGAGAAA CAAAGGCAGC GTCGCCTTCA GGCTGCTGGT AGGTGGTTTT AATCACTTAA  
 1385 AAGTCGACTC TAGAGGATCC CCGGGTACCG AGCTCGAATT CACTGGCCGT CGTTTTACA

Das Konstrukt YCplac111-PCP1-H313Q (Plasmidkarte)



## Das Konstrukt YCplac111-PCP1-H313Q (Sequenz)

**5YGR101wNP >**

5 CAGGAAACAG CTATGACCAT GATTACGCCA AGCTTGCATG CCTGCAGTAT TGAATTTGAA  
gtCCTGCAGTAT TGAATTTGAA  
GCATG

65 GCATGAAATC GTGCTTATCA ATTTTATGTC ACCCTAAAAC ATCTGTACGT GTTTATATAG

125 ATATTTTAAAG CAATATTTGC CAGGATTTGG TGAAGATCCC TCATATAACT CTCATAAATG

185 CGGATTTTCG GAGCGAAAAA AGCCTAAATF CTTGTCTGGA AGTATAATTG GCGGTGAAAT

245 AGAAAAGGTG GCAATCACGA CTGAAAAGGG TACAGCTTTC GCAACTGACA TATACAGACA

305 GTGAAAAGTA ATAAATTGCC CAAGTGTGAA CATGTCAGGT GTAAGCTCTG TTATGCTCGG

365 TCTTCGACCT GCTACAAGAA TTTTTTCCG CAGTAATATT TCGGTTTCAC CTTCGAGGAC

425 TTTTGTATCA TATATTGGAA GATCCCAGAG CACGTCGATA CTCAAAAATG CTCCCAACTT

485 AGAGGACAAT GTCACAAAATC TTCAGAAAAAT TATACCGAAA CGGTTCTTTT CTCAAACATC

545 AATTTTGAAA TCAAGGTGGA AGCCTATATT CAATGAAGAA ACTACTAATC GATACGTACG

605 TTTGAACAGG TTTCAGCAGT ACCAGCAGCA GAGAAGCGGC GGCAATCCTC TGGGCTCTAT

665 GACTATTTTG GGGCTCTCTT TAATGGCAGG AATATATTTT GGCTCCCCTT ATTTGTTCTGA

725 GCACGTTCCA CCCTTTACGT ATTTTAAGAC GCATCCAAAG AATCTGGTAT ACGCGTTATT

785 AGGCATCAAT GTTGCCGTAT TTGGACTATG GCAGCTACCC AAATGCTGGA GGTTTCTACA

845 GAAGTACATG TTGCTGCAAA AGGATTACGT AACTAGCAAA ATTTGATAA TCGGAAGTGC

905 GTTTTACAT CAAGAATTCT GGCACCTAGG TATGAACATG CTAGCGTTGT GGTCCTTTGG

965 TACTTCACTC GCAACAATGT TGGGAGCATC CAATTTTTTC TCCTTATATA TGAATAGTGC

1025 CATTGCAGGT TCTTTGTTTT CGTTATGGTA TCCAAAAC TG GCACGCCTAG CCATTGTCGG

1085 ACCTAGCTTG GGTGCCAGTG GAGCGCTATT TGGGGTTTTA GGATGTTTTT CATATCTATT

1145 CCCACACGCT AAAATTTTGC TGTGTTTTT CCCAGTCCCA GGTGGGGCTT GGTAGCATT

1205 CTTGGCTTCA GTGGCATGGA ATGCAGCTGG TTGTGCTTTA AGATGGGGGT CATTGATTA

**5GR-H313Q >**

CTGCGCAA TTGGGTGGCT CT

**< 3GR-H313Q**

GCGACGCGTT AACCCACCGA

1265 CGCTGCGCAA TTGGGTGGCT CTATGATGGG GGTCTTGTAC GGATGGTATA TAAGTAAAGC

**< 3YGR101wPS**

CCAAAA TTAGTGAATT

1325 TGTAGAGAAA CAAAGGCAGC GTCGCCTTCA GGCTGCTGGT AGGTGGTTTT AATCACTTAA

TTCAGCTGtgt

1385 AAGTCGACTC TAGAGGATCC CCGGTACCG AGCTCGAATT CACTGGCCGT CGTTTTACA

---

## Hefevektor YEp352 und YEp352-Konstrukte

YEp352 ist ein „high copy“-Vektor YEp352 (HILL *et al.* 1986). Es handelt sich dabei um einen E. coli/Hefe-Shuttlevektor. Die Sequenz ist auf der Homepage von NCBI unter der Accesion-Nummer L14758 zu finden.

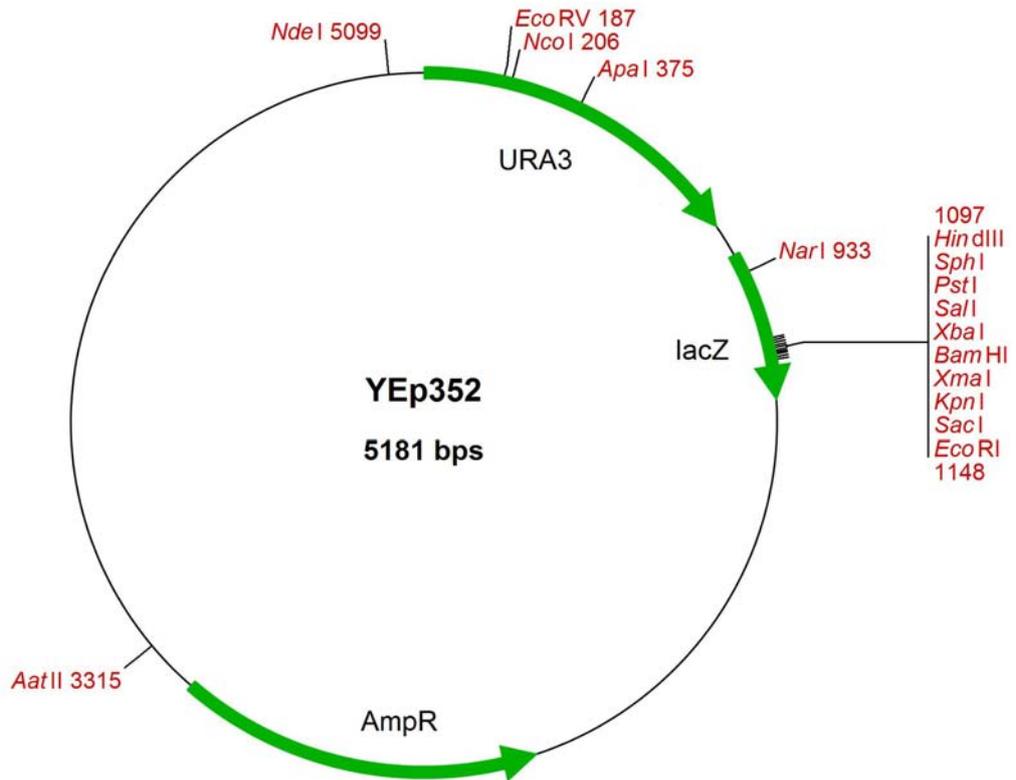
Auf den folgenden Seiten ist sowohl der Hefevektor YEp352 als auch die entsprechenden Konstrukte dargestellt. Dabei handelt es sich um die Konstrukte mit den Transmembrandomänendeletionen. Das *PCP1*-Gen (genomische DNA als Template) wurde mit den angegebenen Primern in den YEp352-Vektor kloniert, der dann als Template für die weiteren Konstrukte diente. Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ C-term wurde unabhängig davon mit den angegebenen Primern kloniert.

Die Plasmidkarten zeigen das Plasmid und die Konstrukte schematisch. Die Gene sind durch die grünen Pfeile markiert. Restriktionsstellen sind rot und kursiv, Primerbindestellen schwarz angegeben. Die Zahlen dahinter bezeichnen die entsprechende Position innerhalb der Vektoren. Die Gesamtgröße ist ebenso wie der Name angegeben.

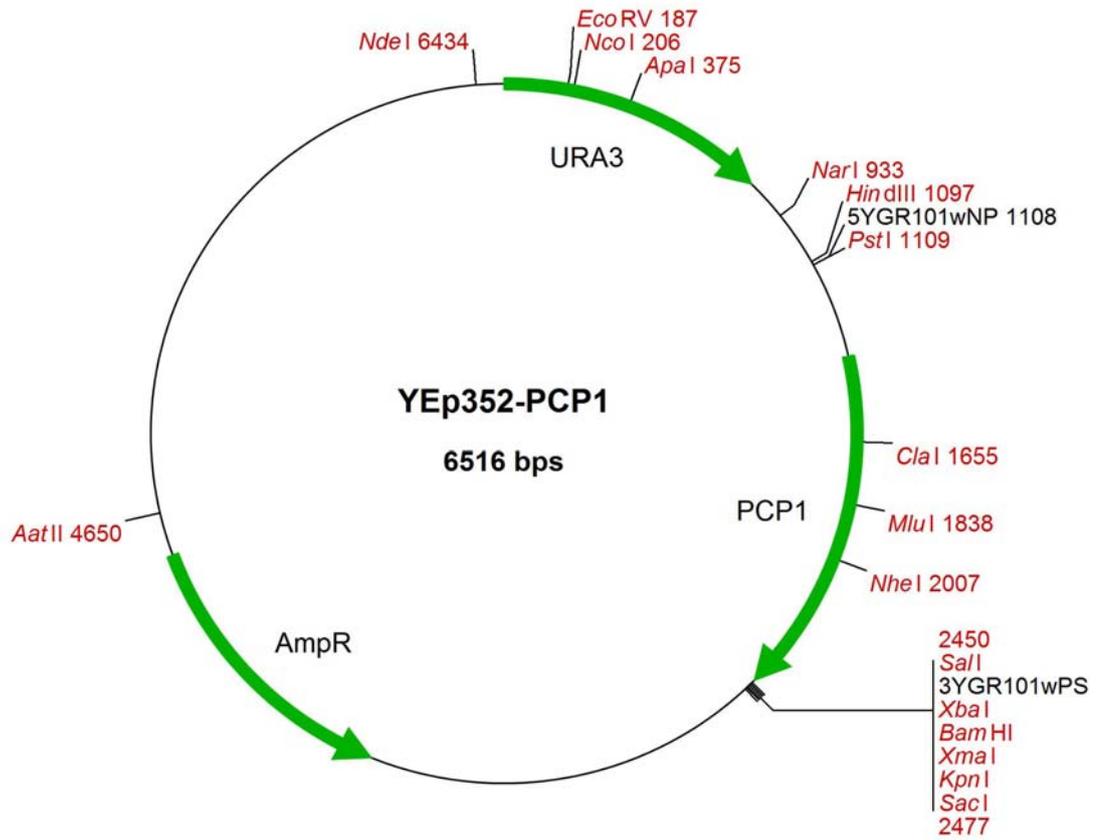
Die Sequenzen der Konstrukte sind nur teilweise angegeben. Zur Orientierung sind in der ersten Spalte die Basennummern angegeben. Die Primer sind oberhalb der Sequenz entsprechend ihrer Bindestellen eingezeichnet und gelb hinterlegt. Die Orientierung ist ebenfalls durch eine Pfeilspitze festgelegt (3' < 5', 5' > 3'). Nicht passende Basen sind in der Primersequenz klein dargestellt, beziehen sich aber nur auf die vorliegende Sequenz. Das klonierte Gen ist unterstrichen.

Die Sequenzen der Transmembrandeletionsmutanten sind nur für das *PCP1*-Gen beginnend mit Basenposition 1399 angegeben. Die jeweils deletierten Bereiche sind in roter Schrift markiert. Die Primerpaarkombinationen sind den jeweiligen Plasmidkarten zu entnehmen.

## Hefevektor YEp352 (Plasmidkarte)



Das Konstrukt YEp352-PCP1 (Plasmidkarte)



## Das Konstrukt YEp352-PCP1 (Sequenz)

**5YGR101wNP >**

gtCCTGCAGT ATTGAATTTG AAGCATG

1076 TGATAAACGA CGGCCAGTGC CAAGCTTGCA TGCCTGCAGT ATTGAATTTG AAGCATGAAA

1136 TCGTGCTTAT CAATTTTATG TCACCCTAAA ACATCTGTAC GTGTTTATAT AGATATTTAA

1196 AGCAATATTT GCCAGGATTT GGTGAAGATC CCTCATATAA CTCTCATAAA TCGGGATTTT

1256 CGGAGCGAAA AAAGCCTAAA TTCTTGCTCTG GAAGTATAAT TGGCGGTGAA ATAGAAAAGG

1316 TGGCAATCAC GACTGAAAAG GGTACAGCTT TCGCAACTGA CATATACAGA CAGTGAAAAG

1376 TAATAAATTG CCCAAGTGTG AACATGTCAG GTGTAAGCTC TGTATGCTC GGTCTTCGAC

1436 CTGCTACAAG AATTTTTTTC CGCAGTAATA TTTCGGTTTC ACCTTCGAGG ACTTTTGTAT

1496 CATATATTGG AAGATCCCAG AGCACGTCGA TACTCAAAAA TGCTCCCAAC TTAGAGGACA

1556 ATGTCACAAA TCTTCAGAAA ATTATACCGA AACGGTTCCT TTCTCAAACA TCAATTTTGA

1616 AATCAAGGTG GAAGCCTATA TTCAATGAAG AAACACTACTAA TCGATACGTA CGTTTGAACA

1676 GGTTTCAGCA GTACCAGCAG CAGAGAAGCG GCGGCAATCC TCTGGGCTCT ATGACTATTT

1736 TGGGGCTCTC TTTAATGGCA GGAATATATT TTGGCTCCCC TTATTTGTTC GAGCACGTTT

1796 CACCCTTTAC GTATTTTAAG ACGCATCCAA AGAATCTGGT ATACGCGTTA TTAGGCATCA

1856 ATGTTGCCGT ATTTGGACTA TGGCAGCTAC CCAAATGCTG GAGGTTTCTA CAGAAGTACA

1916 TGTTGCTGCA AAAGGATTAC GTAAC TAGCA AAATTTTCGAT AATCGGAAGT GCGTTTTTCAC

1976 ATCAAGAATT CTGGCACTTA GGTATGAACA TGCTAGCGTT GTGGTCCTTT GGTACTTCAC

2036 TCGCAACAAT GTTGGGAGCA TCCAATTTTT TCTCCTTATA TATGAATAGT GCCATTGCAG

2096 GTTCTTTGTT TTCGTTATGG TATCCAAAAC TGGCACGCCT AGCCATTGTC GGACCTAGCT

2156 TGGGTGCCAG TGGAGCGCTA TTTGGGGTTT TAGGATGTTT TTCATATCTA TTCCCACAGC

2216 CTAAAATTTT GCTGTTTGTT TTCCCAGTCC CAGGTGGGGC TTGGGTAGCA TTCTTGGCTT

2276 CAGTGGCATG GAATGCAGCT GGTGTGCTT TAAGATGGGG GTCATTTGAT TACGCTGCGC

2336 ATTTAGGTGG CTCTATGATG GGGTCTTGT ACGGATGGTA TATAAGTAAA GCTGTAGAGA

**< 3YGR101wPS**

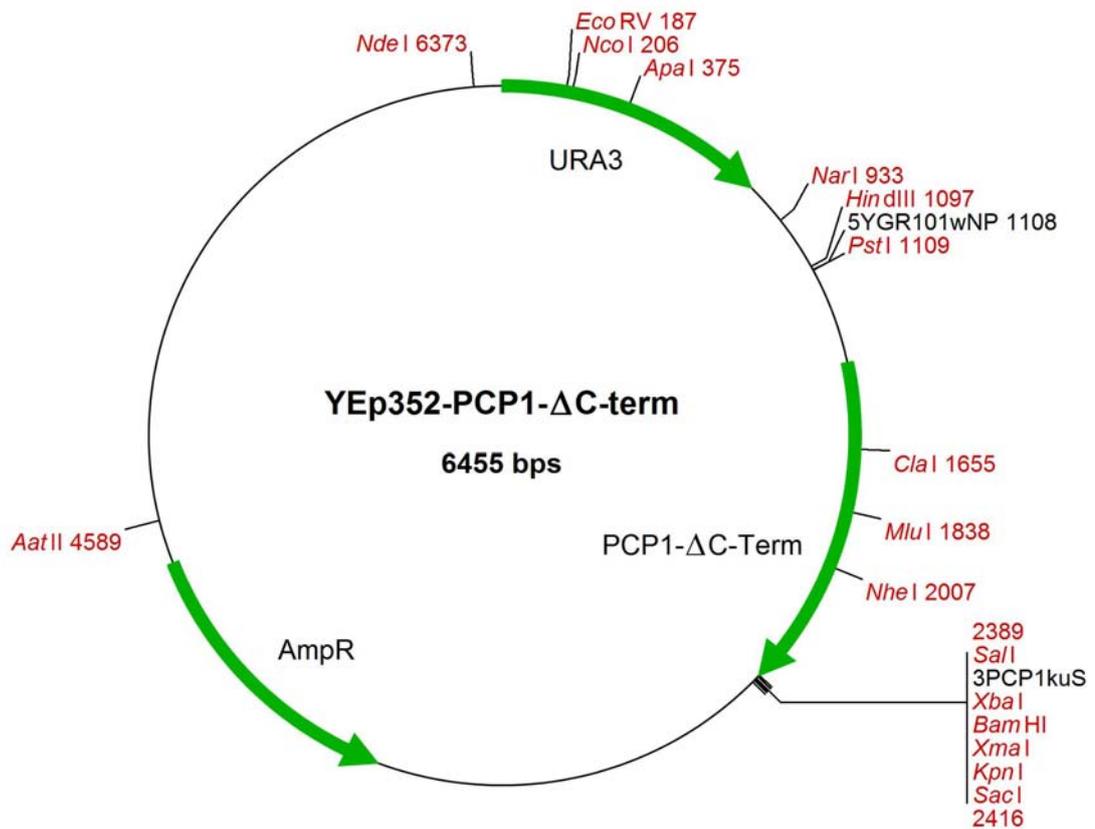
CCAA AATTAGTGAA TTTTCAGCTG

2396 AACAAAGGCA GCGTCGCCTT CAGGCTGCTG GTAGGTGGTT TTAATCACTT AAAAGTCGAC

tgt

2456 TCTAGAGGAT CCCC GGGTAC CGAGCTCGAA TTCGTAATCA TGGTCATAGC TGTTTCCTGT

2516 GTG

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ C-term (Plasmidkarte)

## Das Konstrukt YEp352-PCP1-ΔC-term (Sequenz)

5YGR101wNP >

gtCCTGCAGT ATTGAATTTG AAGCATG

1076 TGATAAACGA CGGCCAGTGC CAAGCTTGCA TGCCTGCAGT ATTGAATTTG AAGCATGAAA

1136 TCGTGCTTAT CAATTTTATG TCACCCTAAA ACATCTGTAC GTGTTTATAT AGATATTTAA

1196 AGCAATATTT GCCAGGATTT GGTGAAGATC CCTCATATAA CTCTCATAAA TGCGGATTTT

1256 CGGAGCGAAA AAAGCCTAAA TTCTTGCTCTG GAAGTATAAT TGGCGGTGAA ATAGAAAAGG

1316 TGGCAATCAC GACTGAAAAG GGTACAGCTT TCGCAACTGA CATATACAGA CAGTGAAAAG

1376 TAATAAATTG CCCAAGTGTG AACATGTCAG GTGTAAGCTC TGTATGCTC GGTCTTCGAC

1436 CTGCTACAAG AATTTTTTTC CGCAGTAATA TTTCGGTTTC ACCTTCGAGG ACTTTTGTAT

1496 CATATATTGG AAGATCCCAG AGCACGTCGA TACTCAAAAA TGCTCCCAAC TTAGAGGACA

1556 ATGTCACAAA TCTTCAGAAA ATTATACCGA AACGGTTCCT TTCTCAAACA TCAATTTTGA

1616 AATCAAGGTG GAAGCCTATA TTCAATGAAG AAACACTACTAA TCGATACGTA CGTTTGAACA

1676 GGTTTCAGCA GTACCAGCAG CAGAGAAGCG GCGGCAATCC TCTGGGCTCT ATGACTATTT

1736 TGGGGCTCTC TTTAATGGCA GGAATATATT TTGGCTCCCC TTATTTGTTC GAGCACGTTT

1796 CACCCTTTAC GTATTTTAAG ACGCATCCAA AGAATCTGGT ATACGCGTTA TTAGGCATCA

1856 ATGTTGCCGT ATTTGGACTA TGGCAGCTAC CCAAATGCTG GAGGTTTCTA CAGAAGTACA

1916 TGTTGCTGCA AAAGGATTAC GTAAC TAGCA AAATTTTCGAT AATCGGAAGT GCGTTTTTCAC

1976 ATCAAGAATT CTGGCACTTA GGTATGAACA TGCTAGCGTT GTGGTCCTTT GGTACTTCAC

2036 TCGCAACAAT GTTGGGAGCA TCCAATTTTT TCTCCTTATA TATGAATAGT GCCATTGCAG

2096 GTTCTTTGTT TTCGTTATGG TATCCAAAAC TGGCACGCCT AGCCATTGTC GGACCTAGCT

2156 TGGGTGCCAG TGGAGCGCTA TTTGGGGTTT TAGGATGTTT TTCATATCTA TTCCCACAGC

2216 CTAAAATTTT GCTGTTTGTT TTCCCAGTCC CAGGTGGGGC TTGGGTAGCA TTCTTGCTT

2276 CAGTGGCATG GAATGCAGCT GGTGTGCTT TAAGATGGGG GTCATTTGAT TACGCTGCGC

< 3PCP1kus

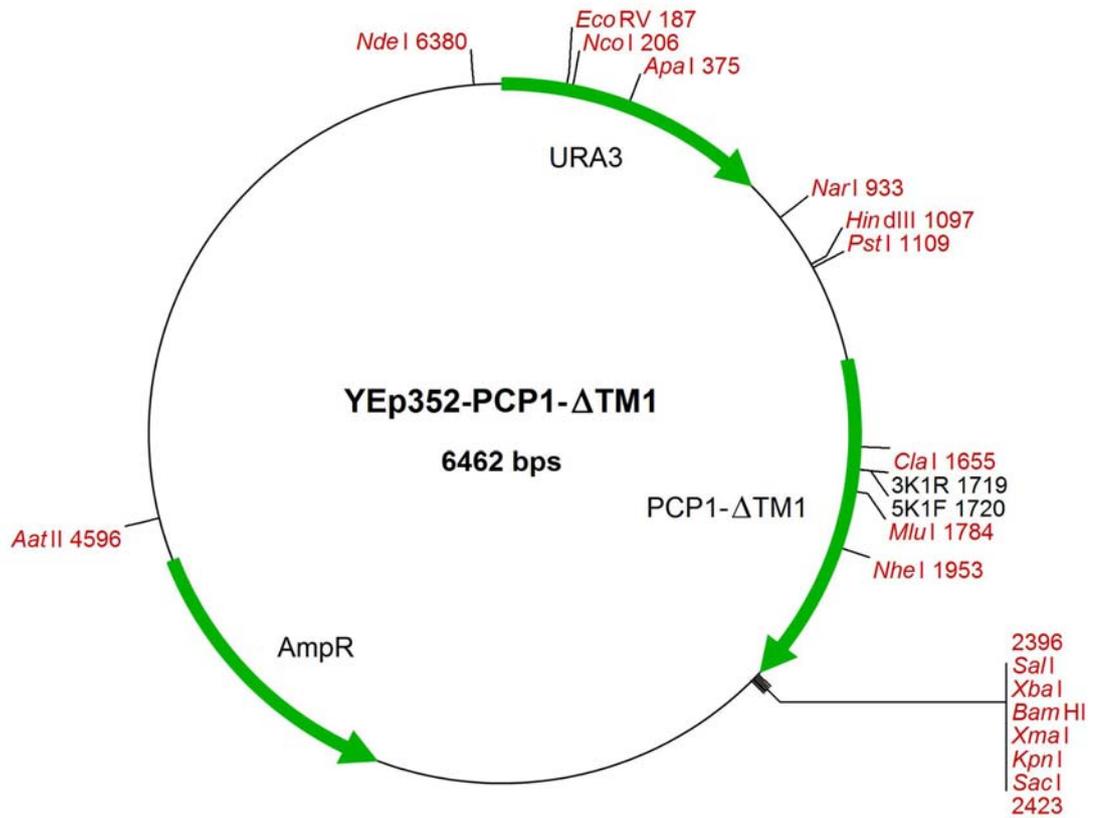
AT ATATTCAATT CGACAGCTG+

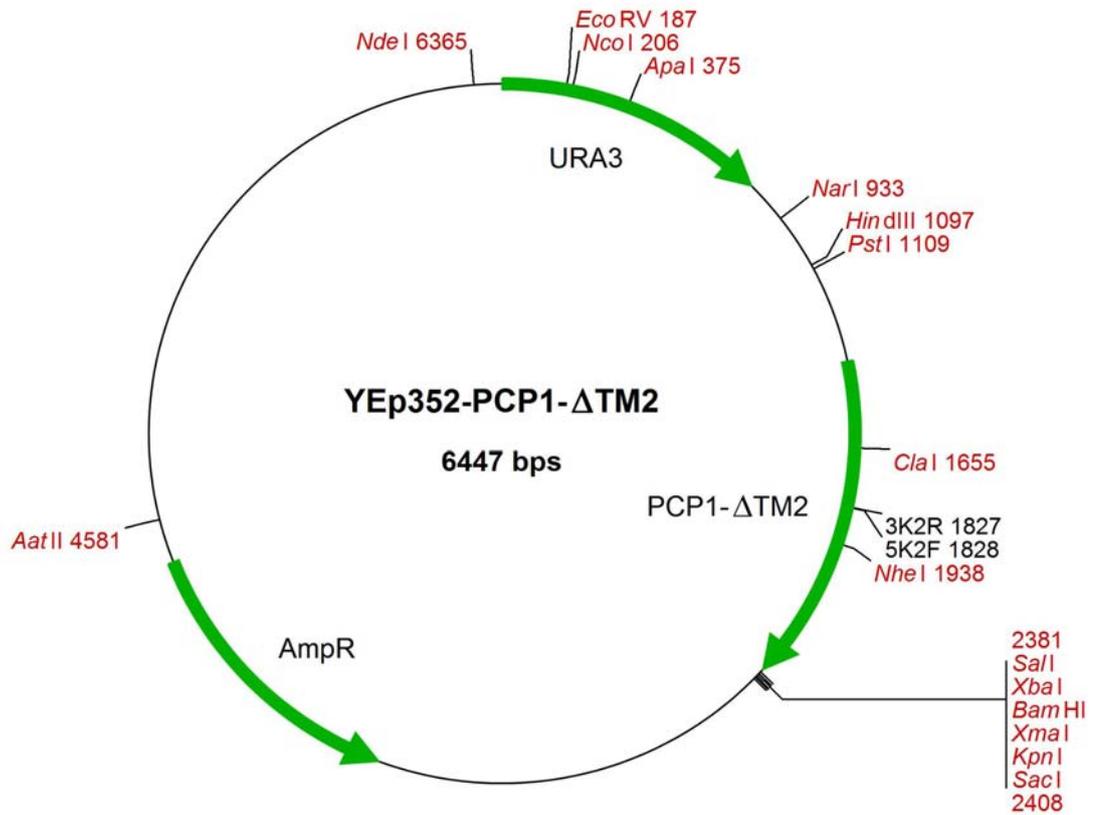
2336 ATTTAGGTGG CTCTATGATG GGGTCTTGT ACGGATGGTA TATAAGTTAA GCTGTCGACT

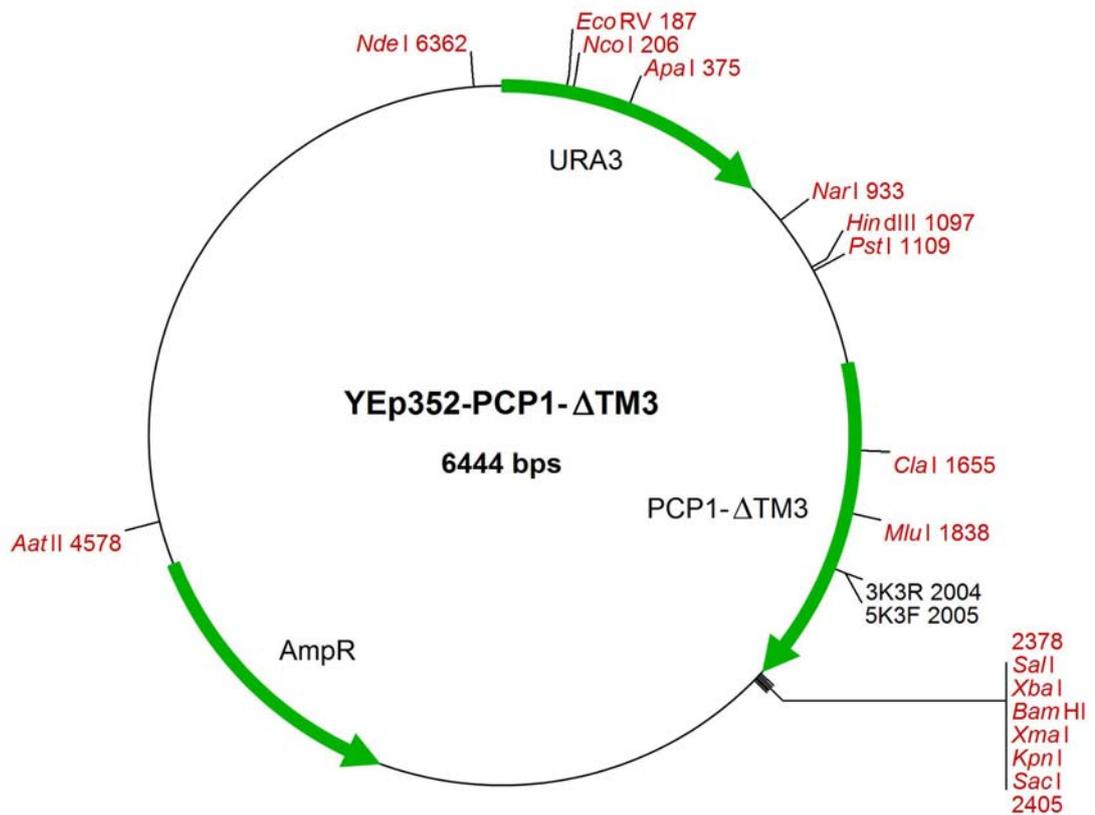
ttg

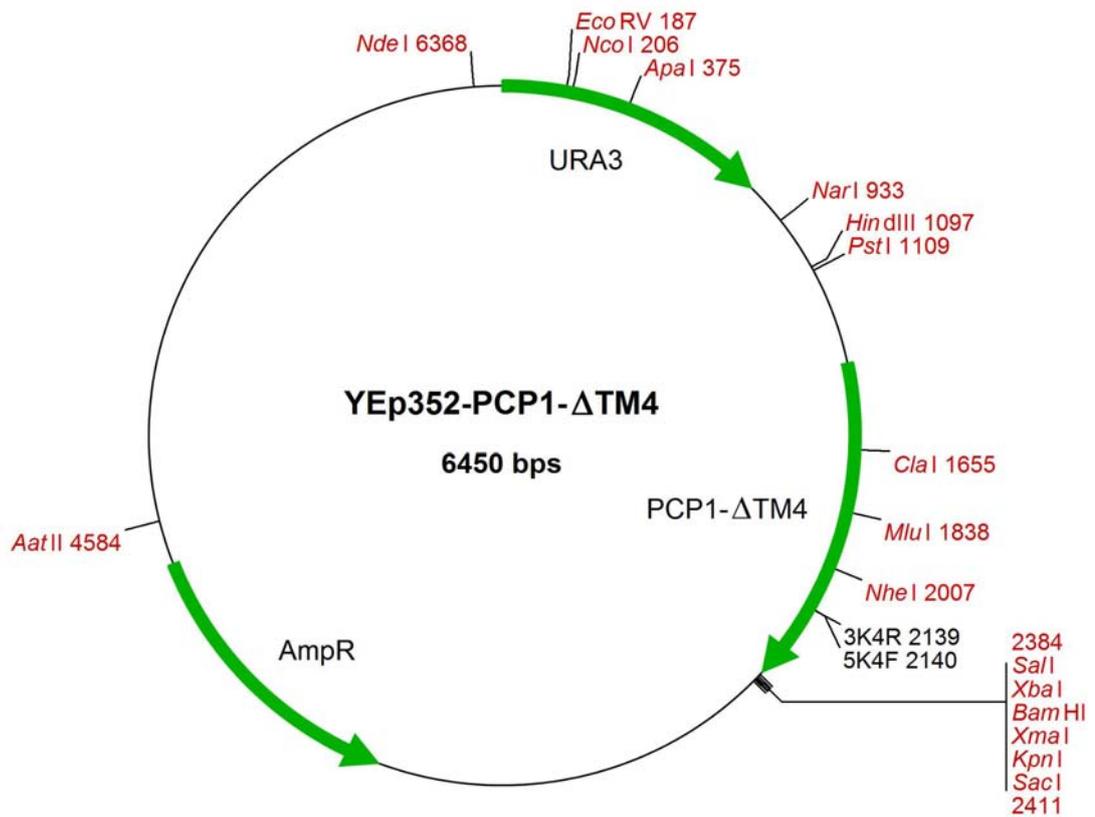
2396 CTAGAGGATC CCCGGGTACC GAGCTCGAAT TCGTAATCAT GGCATAGCT GTTTCCTGTG

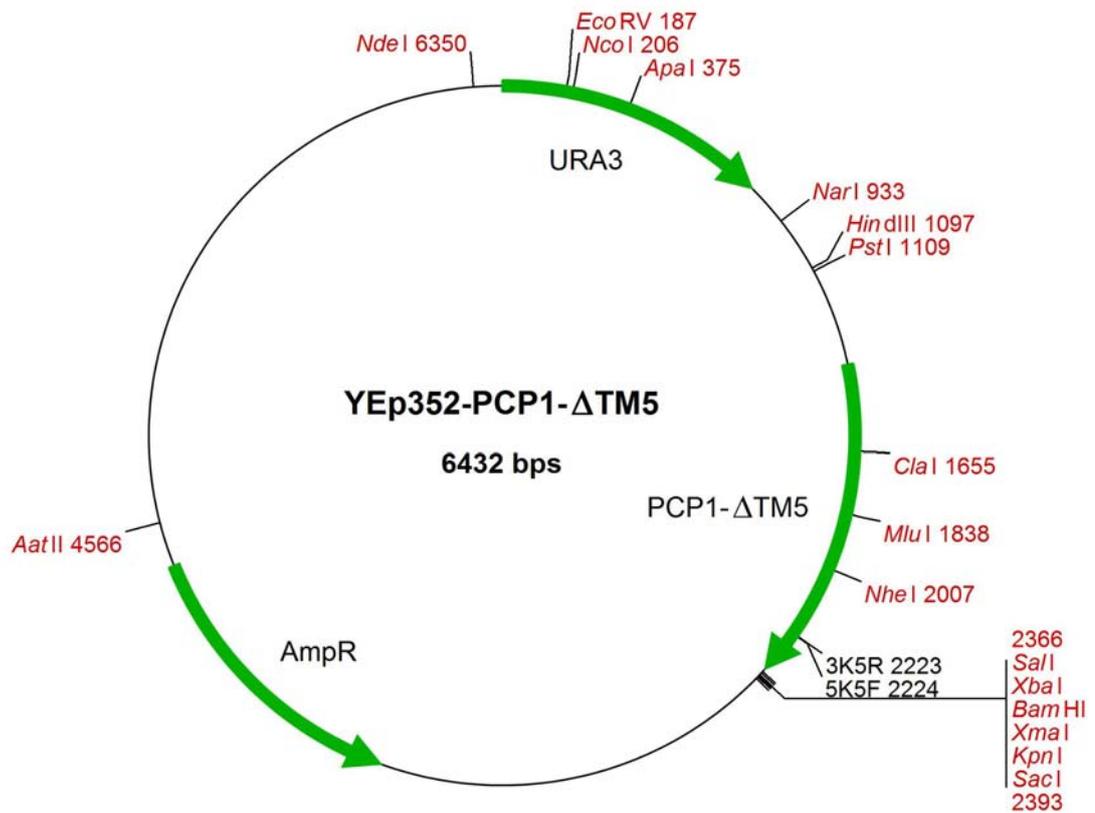
2456 TG

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM1 (Plasmidkarte)

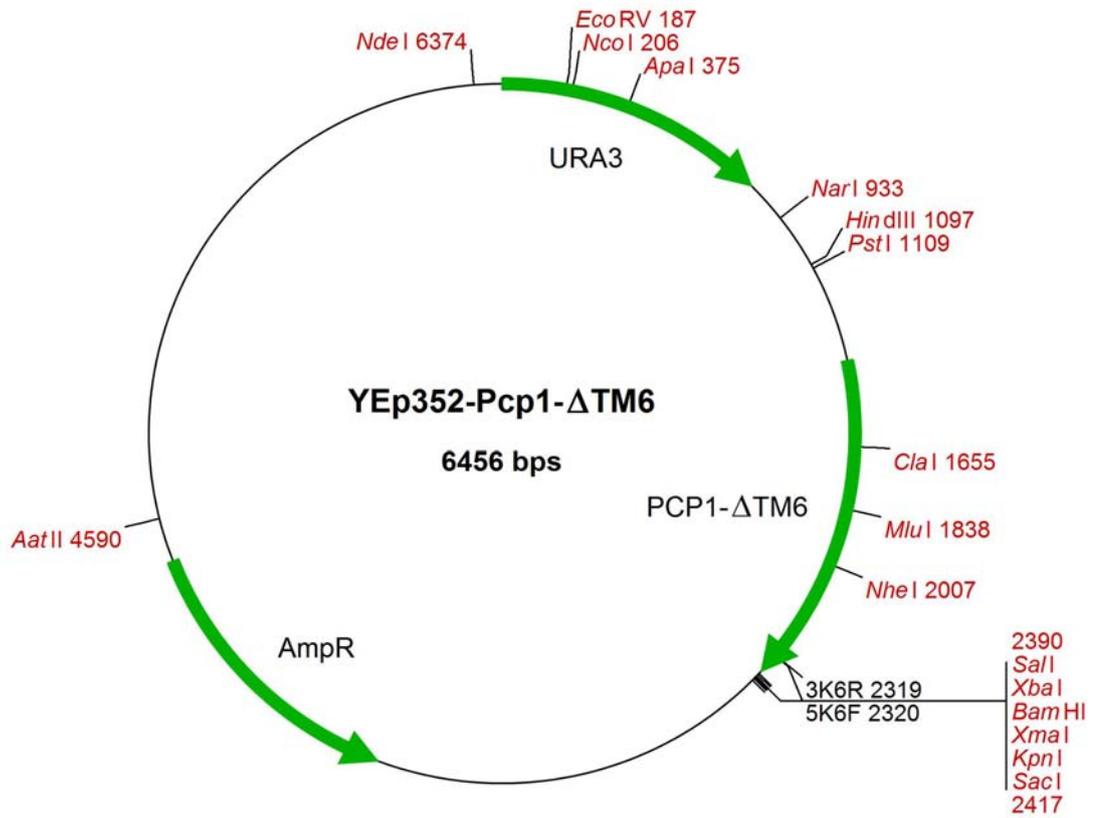
Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM2 (Plasmidkarte)

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM3 (Plasmidkarte)

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM4 (Plasmidkarte)

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM5 (Plasmidkarte)

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM6 (Plasmidkarte)



Die Konstrukte YEp352-PCP1- $\Delta$ TM1-6 (Sequenz)

ATGTCAGGTG TAAGCTCTGT TATGCTCGGT CTTCGACCTG CTACAAGAAT TTTTTTCCGC  
 AGTAATATTT CGGTTTCACC TTCGAGGACT TTTGTATCAT ATATTGGAAG ATCCCAGAGC  
 ACGTCGATAC TCAAAAATGC TCCCAACTTA GAGGACAATG TCACAAATCT TCAGAAAATT  
 ATACCGAAAC GGTTCCTTTC TCAAACATCA ATTTTGAAAT CAAGGTGGAA GCCTATATTC  
 AATGAAGAAA CTAATAATCG ATACGTACGT TTGAACAGGT TTCAGCAGTA CCAGCAGCAG

&lt; 3K1R

C CGTTAGGAGA C

AGAAGCGGCG GCAATCCTCT GGGCTCTATG ACTATTTTGG GGCTCTCTTT AATGGCAGGA

5K1F &gt;

CCTTA TTTGTTCGAG CA

ATTCAGC

ATATATTTTG GCTCCCTTA TTTGTTCGAG CACGTTCCAC CCTTTACGTA TTTTAAGACG

&lt; 3K2R

GTAGGTTTC

CATCCAAAGA ATCTGGTATA CGCGTTATTA GGCATCAATG TTGCCGTATT TGGACTATGG

5K2F &gt;

AG GTTCTACAG AAGTACA

CAGTACCCA AATGCTGGAG GTTCTACAG AAGTACATGT TGCTGCAAAA GGATTACGTA

&lt; 3K3R

CGTGAATCCA

ACTAGCAAAA TTTCGATAAT CGGAAGTGCG TTTTCACATC AAGAATTCTG GCACTTAGGT

TACTTG

ATGAACATGC TAGCGTTGTG GTCCTTTGGT ACTTCACTCG CAACAATGTT GGGAGCATCC

5K3F &gt;

AT GAATAGTGCC ATTGCA

AATTTTTTCT CTTATATAT GAATAGTGCC ATTGCAGGTT CTTGTTTTTC GTTATGGTAT

&lt; 3K4R

TGCGGATCG G

CCAAAACCTGG CACGCCTAGC CATTGTCGGA CCTAGCTTGG GTGCCAGTGG AGCGCTATTT

&lt; 3K5R

AG GGTGTGCGAT TTTAA

5K4F &gt;

TTC CCACACGCTA A

GGGGTTTTAG GATGTTTTTC ATATCTATTC CCACACGCTA AAATTTTGCT GTTTGTTTTTC

CCAGTCCCAG GTGGGGCTTG GGTAGCATTG TTGGCTTCAG TGGCATGGAA TGCAGCTGGT

&lt; 3K6R

ATT CTACCCCCAG T

5K5F &gt;

A GATGGGGGTC AT

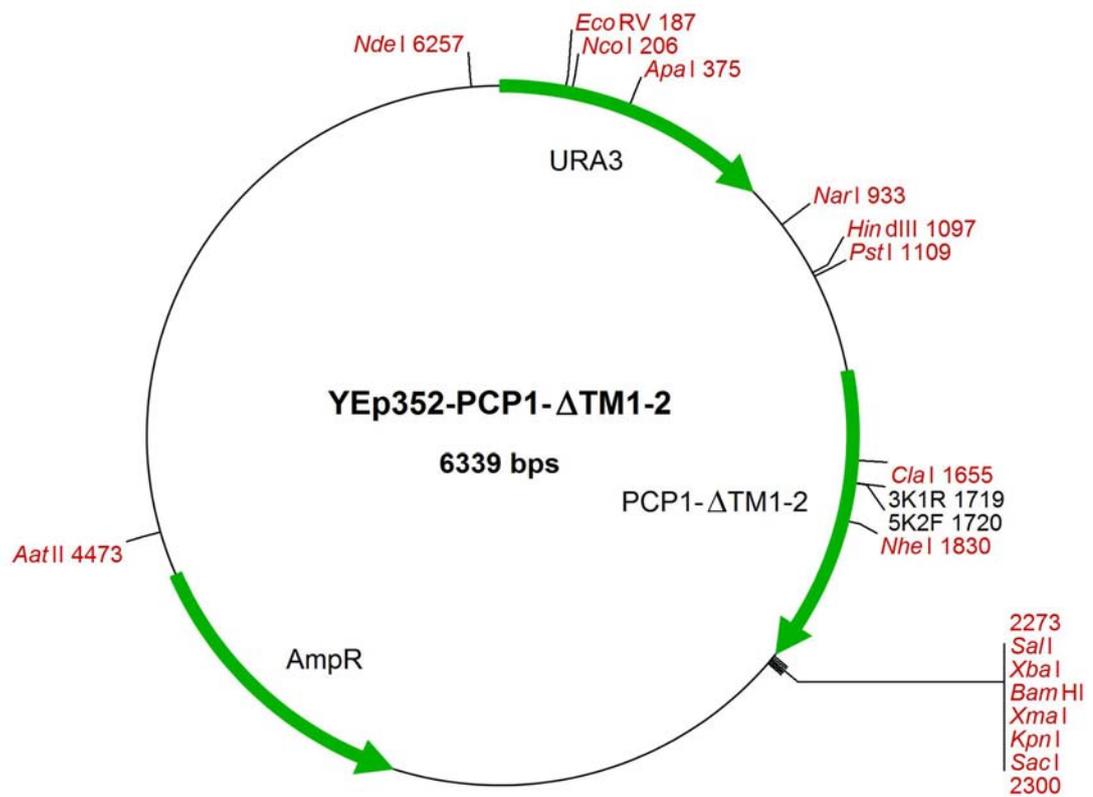
TGTGCTTTAA GATGGGGGTC ATTTGATTAC GCTGCGCATT TAGGTGGCTC TATGATGGGG

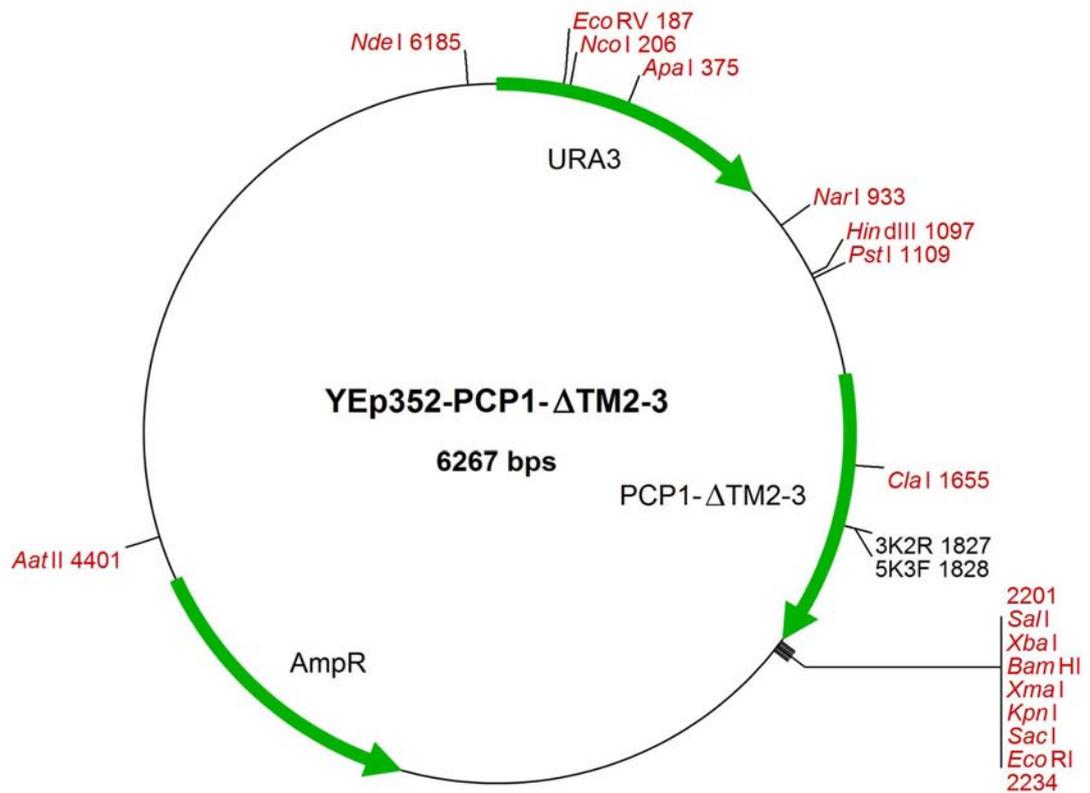
5K6F &gt;

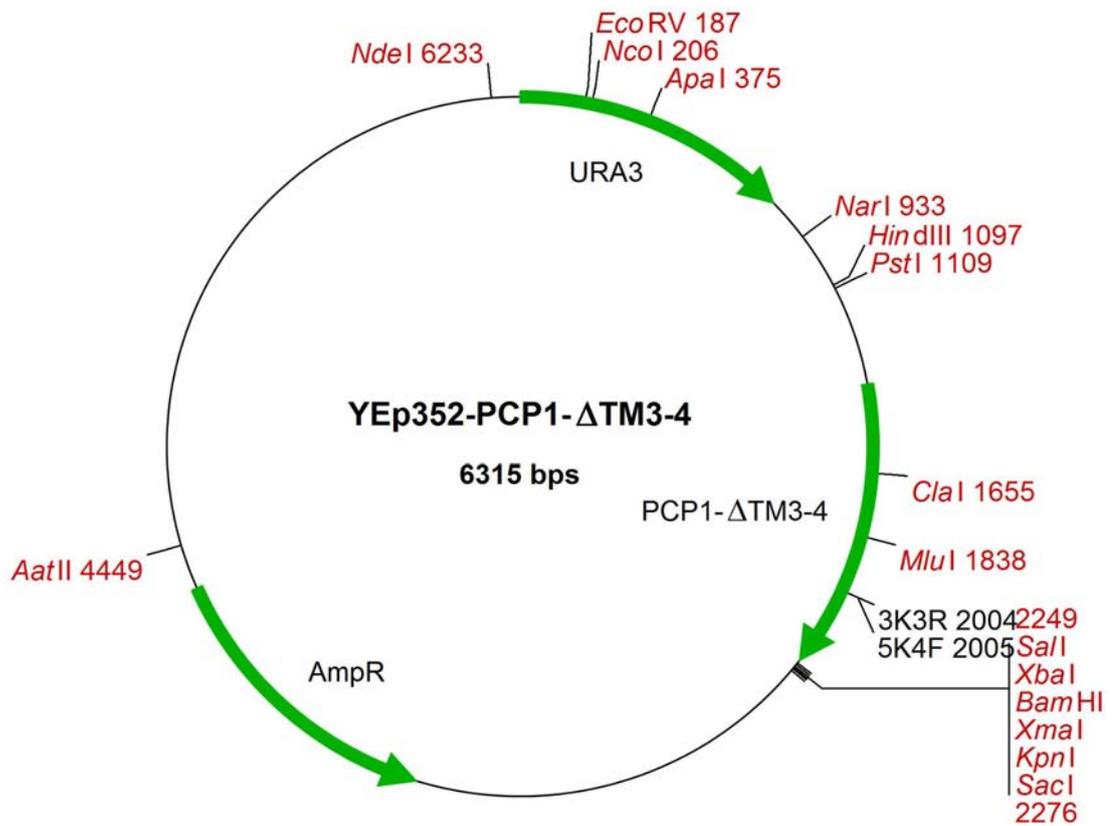
AGTAAAGCT GTAGAGAAAC

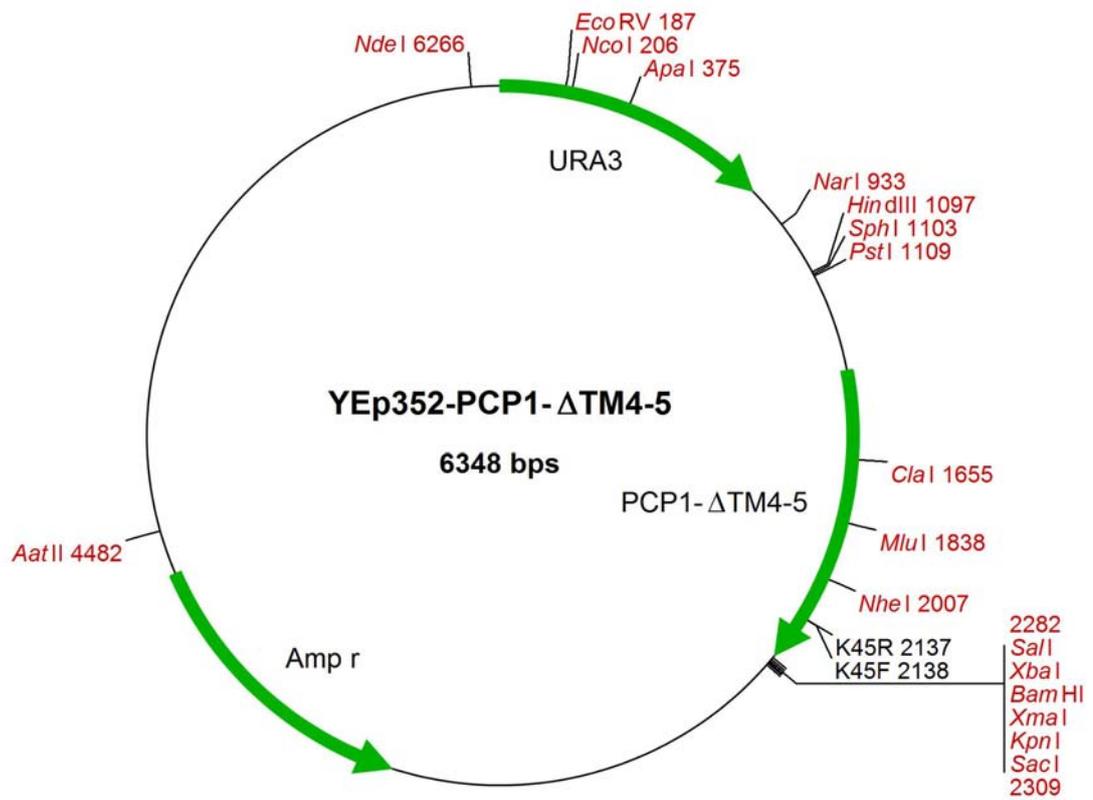
GTCTTGACG GATGGTATAT AAGTAAAGCT GTAGAGAAAC AAAGGCAGCG TCGCCTTCAG

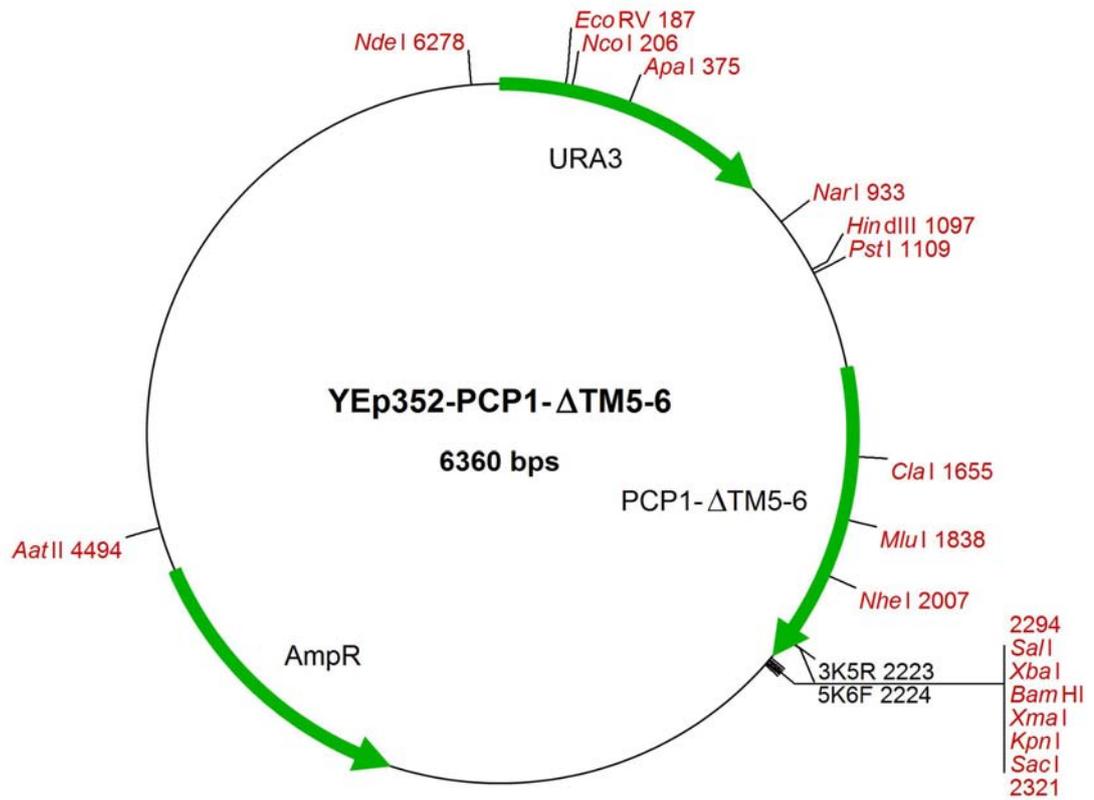
GCTGCTGGTA GGTGGTTTTA A

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM1-2 (Plasmidkarte)

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM2-3 (Plasmidkarte)

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM3-4 (Plasmidkarte)

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM4-5 (Plasmidkarte)

Das Konstrukt YEp352-PCP1- $\Delta$ TM5-6 (Plasmidkarte)

Die Konstrukte YEp352-PCP1- $\Delta$ TM1-2, YEp352-PCP1- $\Delta$ TM3-4,  
YEp352-PCP1- $\Delta$ TM5-6 (Sequenz)

ATGTCAGGTG TAAGCTCTGT TATGCTCGGT CTTGACCTG CTACAAGAAT TTTTTTCCGC  
AGTAATATTT CGGTTTCACC TTCGAGGACT TTTGTATCAT ATATTGGAAG ATCCCAGAGC  
ACGTCGATAC TCAAAAATGC TCCCAACTTA GAGGACAATG TCACAAATCT TCAGAAAATT  
ATACCGAAAC GGTTCCTTTTC TCAAACATCA ATTTTGAAAT CAAGGTGGAA GCCTATATTC  
AATGAAGAAA CTAATAATCG ATACGTACGT TTGAACAGGT TTCAGCAGTA CCAGCAGCAG

< 3K1R

C CGTTAGGAGA C

AGAAGCGGCG GCAATCCTCT GGGCTCTATG ACTATTTTGG GGCTCTCTTT AATGGCAGGA  
ATATATTTTG GCTCCCCTTA TTTGTTCGAG CACGTTCCAC CCTTTACGTA TTTTAAGACG  
CATCAAAGA ATCTGGTATA CGCGTTATTA GGCATCAATG TTGCCGTATT TGGACTATGG

5K2F >

AG GTTCTACAG AAGTACA

CAGCTACCCA AATGCTGGAG GTTCTACAG AAGTACATGT TGCTGCAAAA GGATTACGTA

< 3K3R

CGTGAATCCA

ACTAGCAAAA TTTCGATAAT CGGAAGTGCG TTTTCACATC AAGAATTCTG GCACTTAGGT

TACTTG

ATGAACATGC TAGCGTTGTG GTCCTTTGGT ACTTCACTCG CAACAATGTT GGGAGCATCC  
AATTTTTTCT CTTATATAT GAATAGTGCC ATTGCAGGTT CTTTGTTTTC GTTATGGTAT  
CCAAACTGG CACGCCTAGC CATTGTCGGA CTAGCTTGG GTGCCAGTGG AGCGCTATTT

< 3K5R

AG GGTGTGCGAT TTAA

5K4F >

TTC CCACACGCTA A

GGGGTTTTAG GATGTTTTTC ATATCTATTC CCACACGCTA AAATTTTGCT GTTTGTTTTC  
CCAGTCCCAG GTGGGGCTTG GGTAGCATTG TTGGCTTCAG TGGCATGGAA TGCAGCTGGT  
TGTGCTTTAA GATGGGGGTC ATTTGATTAC GCTGCGCATT TAGGTGGCTC TATGATGGGG

5K6F >

AGTAAAGCT GTAGAGAAAC

GTCTTGACG GATGGTATAT AAGTAAAGCT GTAGAGAAAC AAAGGCAGCG TCGCCTTCAG  
GCTGCTGGTA GGTGGTTTTA A

## Die Konstrukte YEp352-PCP1- $\Delta$ TM2-3 und, YEp352-PCP1- $\Delta$ TM4-5 (Sequenz)

ATGTCAGGTG TAAGCTCTGT TATGCTCGGT CTTCGACCTG CTACAAGAAT TTTTTTCCGC  
 AGTAATATTT CGGTTTCACC TTCGAGGACT TTTGTATCAT ATATTGGAAG ATCCCAGAGC  
 ACGTCGATAC TCAAAAATGC TCCCAACTTA GAGGACAATG TCACAAATCT TCAGAAAATT  
 ATACCGAAAC GGTTCCTTTC TCAAACATCA ATTTTGAAAT CAAGGTGGAA GCCTATATTC  
 AATGAAGAAA CTACTAATCG ATACGTACGT TTGAACAGGT TTCAGCAGTA CCAGCAGCAG  
 AGAAGCGGCG GCAATCCTCT GGGCTCTATG ACTATTTTGG GGCTCTCTTT AATGGCAGGA  
 ATATATTTTG GCTCCCCTTA TTTGTTCGAG CACGTTCCAC CCTTTACGTA TTTTAAGACG

ATTCAGC

< 3K2R

GTAGGTTTC

CATCCAAAGA ATCTGGTATA CGCGTTATTA GGCATCAATG TTGCCGTATT TGGACTATGG  
 CAGCTACCCA AATGCTGGAG GTTCTACAG AAGTACATGT TGCTGCAAAA GGATTACGTA  
 ACTAGCAAAA TTTCGATAAT CGGAAGTGCG TTTTCACATC AAGAATTCTG GCACCTAGGT  
 ATGAACATGC TAGCGTTGTG GTCCTTTGGT ACTTCACTCG CAACAATGTT GGGAGCATCC

5K3F >

AT GAATAGTGCC ATTGCA

AATTTTTTCT CCTTATATAT GAATAGTGCC ATTGCAGGTT CTTTGTTTTT GTTATGGTAT

< K45R

TTGACCGTGCGGATC

CCAAAACCTGG CACGCCTAGC CATTGTCGGA CCTAGCTTGG GTGCCAGTGG AGCGCTATTT  
 GGGTTTTTAG GATGTTTTTC ATATCTATTC CCACACGCTA AAATTTTGCT GTTTGTTTTC  
 CCAGTCCCAG GTGGGGCTTG GGTAGCATTG TTGGCTTCAG TGGCATGGAA TGCAGCTGGT

K45F >

ccA GATGGGGGTC ATT

TGTGCTTTAA GATGGGGGTC ATTTGATTAC GCTGCGCATT TAGGTGGCTC TATGATGGGG  
 GTCTTGACG GATGGTATAT AAGTAAAGCT GTAGAGAAAC AAAGGCAGCG TCGCCTTCAG  
 GCTGCTGGTA GGTGGTTTTA A

---

## Expressionsvektor pET-30a(+) und pET-30a(+)-Konstrukte

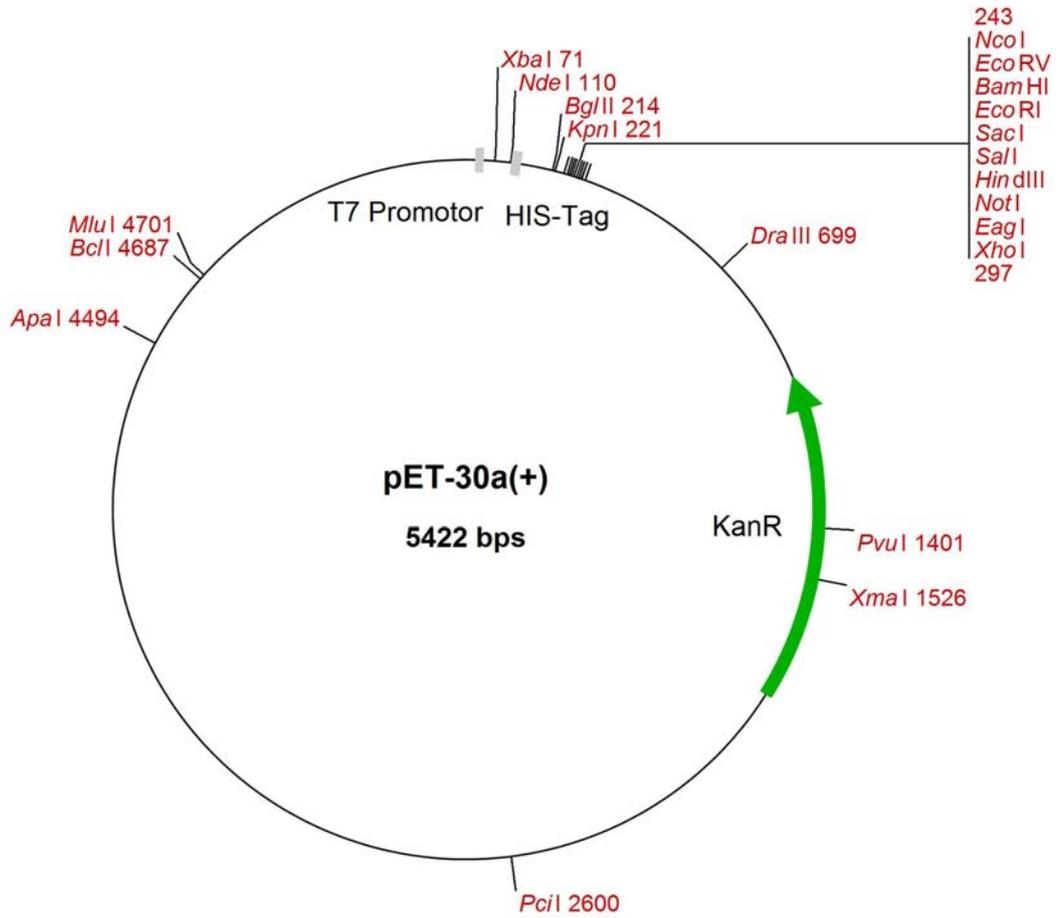
Der Expressionsvektor pET-30a(+) ist Bestandteil des pET- Systems der Firma Novagen (Novagen, pET System Manual, 11th Edition) und dient der Proteinexpression in *E. coli*. Die Sequenz ist auf der Homepage von Novagen zu finden.

Auf den folgenden Seiten ist sowohl der Expressionsvektor pET-30a(+) als auch die entsprechenden Konstrukte dargestellt. Dabei handelt es sich um die Konstrukte zur Expression von *PCP1* in *E. coli*. Das *PCP1*-Gen (YEp352-*PCP1* DNA als Template) wurde zunächst in den Vektor kloniert. Anschließend wurde es mit den angegebenen Primern in den korrekten Leseraster hinter den T7-Promotor positioniert. Dabei wurde ein *HIS*-Tag an den N-Terminus des *PCP1*-Gens kloniert, der über eine Enterokinaseschnittstelle wieder abspaltbar war.

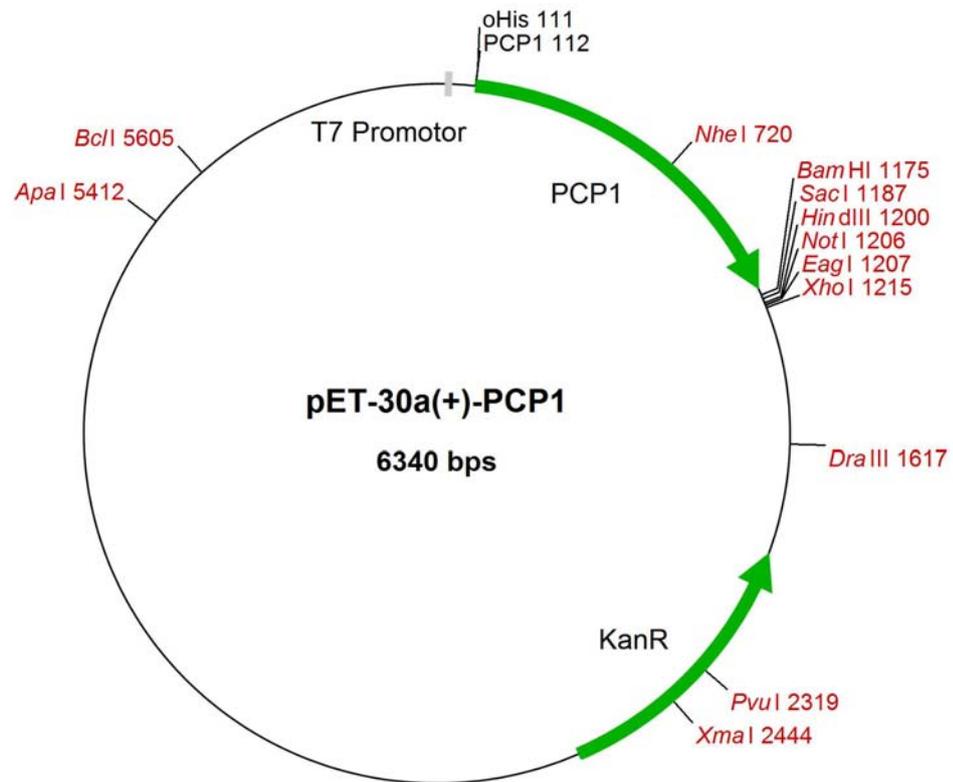
Die Plasmidkarten zeigen das Plasmid und die Konstrukte schematisch. Die Gene sind durch die grünen Pfeile markiert. Restriktionsstellen sind rot und kursiv, Primerbindestellen schwarz angegeben. Die Zahlen dahinter bezeichnen die entsprechende Position innerhalb der Vektoren. Die Gesamtgröße ist ebenso wie der Name angegeben. Die Promotorregion und der *HIS*-Tag sind als graue Balken kenntlich eingetragen.

Die Sequenzen der Konstrukte sind nur teilweise angegeben. Zur Orientierung sind in der ersten Spalte die Basennummern angegeben. Die Primer sind oberhalb der Sequenz entsprechend ihrer Bindestellen eingezeichnet und gelb hinterlegt. Die Orientierung ist ebenfalls durch eine Pfeilspitze festgelegt ( $3' < 5'$ ,  $5' > 3'$ ). Das klonierte Gen ist unterstrichen. Der Promotor und der *HIS*-Tag sind grau hinterlegt. Die Enterokinaseschnittstelle ist in der Sequenz fett dargestellt.

Expressionsvektor pET-30a(+) (Plasmidkarte)



## Das Konstrukt pET-30a(+)-PCP1 (Plasmidkarte)



## Das Konstrukt pET-30a(+)-PCP1 (Sequenz)

**T7-Promotor >**  
 25 TAATACGACT CACTATA GGG GAATTGTGAG CGGATAACAA TTCCCCTCTA GAAATAATTT

**PCP1 >**  
 ATG TCAGGTGTAA GCTCTGT

**< oHis**  
 ACAAATTGAA ATTCTTCCTC TATATGT

85 TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACAATG TCAGGTGTAA GCTCTGTTAT GCTCGGTCTT

145 CGACCTGCTA CAAGAATTTT TTTCCGCAGT AATATTTTCGG TTTCACCTTC GAGGACTTTT

205 GTATCATATA TTGGAAGATC CCAGAGCACG TCGATACTCA AAAATGCTCC CAACTTAGAG

265 GACAATGTCA CAAATCTTCA GAAAATTATA CCGAAACGGT TCTTTTCTCA AACATCAATT

325 TTGAAATCAA GGTGGAAGCC TATATTCAAT GAAGAACTA CTAATCGATA CGTACGTTTG

385 AACAGGTTTC AGCAGTACCA GCAGCAGAGA AGCGGCGGCA ATCCTCTGGG CTCTATGACT

445 ATTTTGGGGC TCTCTTTAAT GGCAGGAATA TATTTTGGCT CCCCTTATTT GTTCGAGCAC

505 GTTCCACCCT TTACGTATTT TAAGACGCAT CCAAAGAATC TGGTATACGC GTTATTAGGC

565 ATCAATGTTG CCGTATTTGG ACTATGGCAG CTACCCAAAT GCTGGAGGTT TCTACAGAAG

625 TACATGTTGC TGCAAAAGGA TTACGTA ACT AGCAAAATTT CGATAATCGG AAGTGC GTTT

685 TCACATCAAG AATTCTGGCA CTTAGGTATG AACATGCTAG CGTTGTGGTC CTTTGGTACT

745 TCACTCGCAA CAATGTTGGG AGCATCCAAT TTTTCTCCT TATATATGAA TAGTGCCATT

805 GCAGGTTCTT TGTTTTCGTT ATGGTATCCA AACTGGCAC GCCTAGCCAT TGTCGGACCT

865 AGCTTGGGTG CCAGTGGAGC GCTATTTGGG GTTTTAGGAT GTTTTTCATA TCTATTCCCA

925 CACGCTAAAA TTTTGTGTT TGTTTTCCCA GTCCAGGTG GGGCTTGGGT AGCATTCTTG

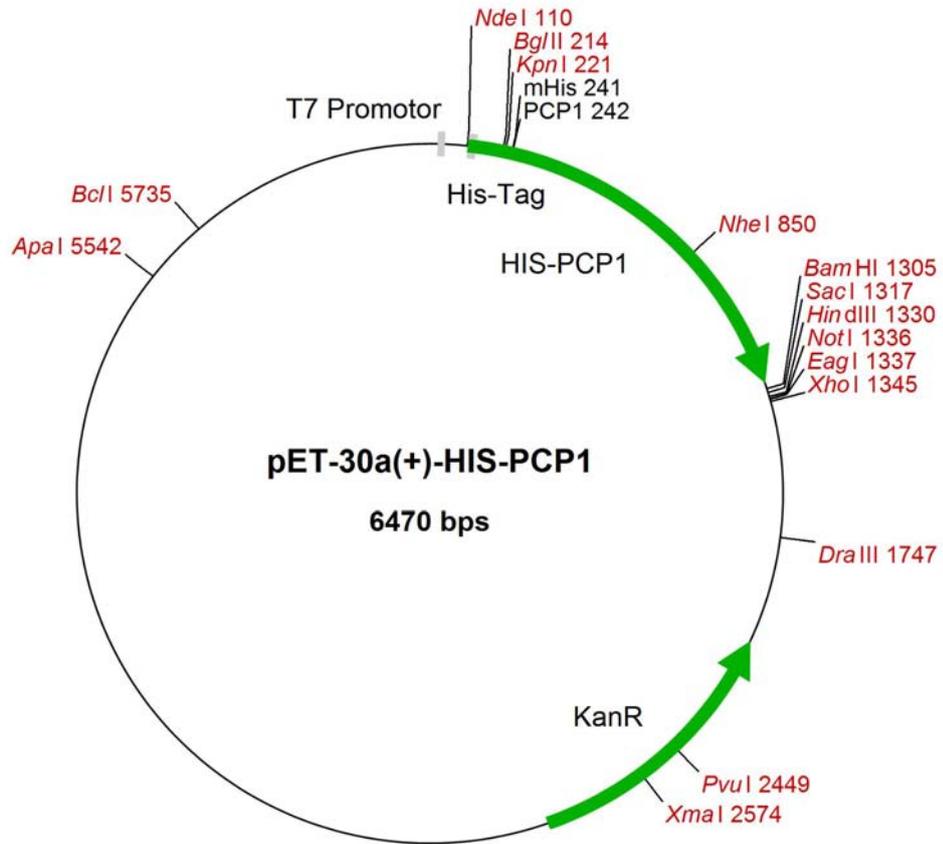
985 GCTTCAGTGG CATGGAATGC AGCTGGTTGT GCTTTAAGAT GGGGGTCATT TGATTACGCT

1045 GCGCATTTAG GTGGCTCTAT GATGGGGGTC TTGTACGGAT GGTATATAAG TAAAGCTGTA

1105 GAGAAACAAA GGCAGCGTCG CCTTCAGGCT GCTGGTAGGT GTTTTTAATC ACTTAAAAGT

1165 CGACTCTAGA GGATCCGAAT TCGAGCTCCG TCGACAAGCT TGCGGCCGCA CTCGAG

Das Konstrukt pET-30a(+)-HIS-PCP1 (Plasmidkarte)



Das Konstrukt pET-30a(+)-*HIS-PCP1* (Sequenz)

**T7-Promotor >**

25 TAATACGACT CACTATAGGG GAATTGTGAG CGGATAACAA TTCCCCTCTA GAAATAATTT

**HIS-Tag**

85 TGTTTAACTT TAAGAAGGAG ATATACATAT GCACCATCAT CATCATCATT CTTCTGGTCT

145 GGTGCCACGC GGTCTGGTA TGAAAGAAAC CGCTGCTGCT AAATTCGAAC GCCAGCACAT

**PCP1 >**

**< mHis** ATG TCAGGTGTAA GCTCTGT

CTGCTGCT GCTGTTT

205 GGACAGCCCA GATCTGGGTA CCGACGACGA CGACAAGATG TCAGGTGTAA GCTCTGTTAT

265 GCTCGGTCTT CGACCTGCTA CAAGAATTTT TTTCCGCAGT AATATTTCCG TTTACCTTC

325 GAGGACTTTT GTATCATATA TTGGAAGATC CCAGAGCACG TCGATACTCA AAAATGCTCC

385 CAACTTAGAG GACAATGTCA CAAATCTTCA GAAAATTATA CCGAAACGGT TCTTTTCTCA

445 AACATCAATT TTGAAATCAA GGTGGAAGCC TATATTTCAAT GAAGAACTA CTAATCGATA

505 CGTACGTTTG AACAGGTTTC AGCAGTACCA GCAGCAGAGA AGCGGCGGCA ATCCTCTGGG

565 CTCTATGACT ATTTTGGGGC TCTCTTTAAT GGCAGGAATA TATTTTGGCT CCCCTTATTT

625 GTTTCGAGCAC GTTCCACCCT TTACGTATTT TAAGACGCAT CCAAAGAATC TGGTATACGC

685 GTTATTAGGC ATCAATGTTG CCGTATTTGG ACTATGGCAG CTACCCAAAT GCTGGAGGTT

745 TCTACAGAAG TACATGTTGC TGCAAAAGGA TTACGTA ACT AGCAAAATTT CGATAATCGG

805 AAGTGCCTTT TCACATCAAG AATTCTGGCA CTTAGGTATG AACATGCTAG CGTTGTGGTC

865 CTTTGGTACT TCACTCGCAA CAATGTTGGG AGCATCCAAT TTTTCTCCT TATATATGAA

925 TAGTGCCATT GCAGGTCTT TGTTCGTT ATGGTATCCA AACTGGCAC GCCTAGCCAT

985 TGTCGGACCT AGCTTGGGTG CCAGTGGAGC GCTATTTGGG GTTTTAGGAT GTTTTTCATA

1045 TCTATTCCCA CACGCTAAAA TTTTGCTGTT TGTTCCTCCA GTCCAGGTG GGGCTTGGGT

1105 AGCATTCTTG GCTTCAGTGG CATGGAATGC AGCTGGTGT GCTTTAAGAT GGGGTCATT

1165 TGATTACGCT GCGCATTTAG GTGGCTCTAT GATGGGGGTC TTGTACGGAT GGTATATAAG

1225 TAAAGCTGTA GAGAAACAAA GGCAGCGTCG CCTTCAGGCT GCTGGTAGGT GTTTTAATC

1285 ACTTAAAAGT CGACTCTAGA GGATCCGAAT TCGAGCTCCG TCGACAAGCT TGCGGCCGCA

1345 CTCGAG

## *Danksagung*

*Diese vielen Seiten umfassende Promotionsschrift hätte ich nicht ohne Hilfe erstellen können. Deswegen möchte ich mich an dieser Stelle bei den Menschen bedanken, die mich während dieser Zeit auf unterschiedlichste Weise unterstützt haben.*

*Danke an (alphabetische Reihenfolge):*

*Sabrina Jürgs, Katrin Krumpe, Helene Lange, Thomas Langer, René Lorbiecke, Sabine Lüthje, Mihaela Márton, Nicole Mielke, Hans-Peter Mühlbach, Nicole Pietschmann, Elke Pratje, Hermann Schmidt, Stefan Scholten, Barbara Schumacher, Michael Stohn, Ulrike Stohn, Christina Timmermann, Nayuf Valdez, Mathias Weber*

*... und natürlich danke ich auch allen anderen, die mich in dieser Zeit begleitet, inspiriert und motiviert haben und die ich an dieser Stelle nicht namentlich erwähnt habe.*