

**Untersuchungen zur Rolle von Mdj1p
aus *Saccharomyces cerevisiae* bei der
mitochondrialen Biogenese**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
(mathematisch-naturwissenschaftlicher Bereich)
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Tanja Lisse

aus

Sandersdorf

2001

urn:nbn:de:gbv:3-000003779

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000003779>]

Gutachterin und Gutachter:

1. Prof. Dr. N. Pfanner

2. Dr. habil. S. Rospert

3. Dr. habil. E. Schwarz

verteidigt am 07. 03. 2002

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
1.	Mitochondrien - Energielieferanten der eukaryontischen Zelle	1
2.	Die mitochondriale DNA-Replikation	5
2.1.	Transkriptionsabhängige mtDNA-Replikation	5
2.2.	Alternative Replikationsmechanismen in Hefe	6
3.	Hsp70-Systeme und DNA-Replikation	7
3.1.	Das Hsp70-System - ein Chaperonsystem	7
3.2.	Beteiligung von Hsp70-Systemen an DNA-Replikationsprozessen	10
4.	DnaJ und homologe Proteine	11
4.1.	Die J-Domäne	12
4.2.	Mdj1p - ein mitochondriales DnaJ-Protein in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
5.	Zielsetzung dieser Arbeit	15
II.	Materialien und Methoden	16
1.	Material	16
1.1.	Chemikalien	16
1.2.	Mikroorganismen	18
1.2.1.	<i>Escherichia coli</i>	18
1.2.2.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
1.3.	Primer und Plasmide	19
1.3.1.	Primer	19
1.3.2.	Plasmide	20

1.4.	Puffer und Lösungen	22
1.5.	Enzyme und Proteine	24
1.6.	Nährmedien und Platten.....	24
1.7.	Geräte	25
1.8.	Standards und Kits.....	26
2.	Methoden	27
2.1.	Kultivierung von Mikroorganismen.....	27
2.1.1.	Kultivierung von <i>Escherichia coli</i>	27
2.1.2.	Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	27
2.2.	Molekularbiologische Techniken.....	28
2.2.1.	Ethanol-fällung	28
2.2.2.	Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i>	28
2.2.3.	Isolierung von DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	29
2.2.4.	Bestimmung der DNA-Konzentration.....	30
2.2.5.	Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen.....	30
2.2.6.	Modifikation von DNA mit Klenow-Fragment	30
2.2.7.	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	30
2.2.8.	Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.2.9.	Agarose-Gelelektrophorese.....	31
2.2.10.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	32
2.2.11.	Ortsspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA	32
2.2.12.	Sequenzierung von Plasmid-DNA	32
2.2.13.	Southern-Blot	32
2.2.14.	Isolierung von RNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
2.2.15.	Northern-Blot.....	34
2.2.16.	Transformation von Mikroorganismen mit rekombinanter DNA.....	34
2.3.	Methoden der Zellbiologie	35

2.3.1.	Isolierung von Mitochondrien aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	35
2.3.2.	Synthese mitochondrialer Vorläuferproteine <i>in vitro</i>	36
2.3.3.	Import von <i>in vitro</i> synthetisierten Vorläuferproteinen in Mitochondrien	36
2.3.4.	Markierung von mitochondrialen Translationsprodukten <i>in vivo</i>	37
2.3.5.	DAPI-Färbung	37
2.3.6.	Tetrazolium-Färbung	38
2.4.	Proteinchemische Methoden	38
2.4.1.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	38
2.4.2.	Coomassie-Färbung.....	39
2.4.3.	Western-Blot	39
2.4.4.	Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrocellulose-Membranen	40
2.4.5.	Autoradiographie.....	40
2.4.6.	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford.....	40
III.	Ergebnisse und Diskussion	41
1.	Suche nach Suppressoren in konditionalen <i>MDJ1</i>-Mutanten	41
2.	Komplementation von Mdj1p durch homologe DnaJ-Proteine	43
2.1.	Klonierung der DNAJ-Gene für den mitochondrialen Import	45
2.2.	Mitochondrialer Import von Mdj1p	46
2.3.	Konstruktion eines Vektors für die Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	47
2.4.	Klonierung der DNAJ-Gene für die Expression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	51
2.5.	Konstruktion der Komplementationsmutanten	51
2.6.	Expression und mitochondrialer Import homologer DnaJ-Proteine in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	54
2.7.	Komplementation von Mdj1p durch homologe DnaJ-Proteine	57
2.8.	Komplementation von Mdj1p durch N-terminale Fragmente von Mdj1p und DnaJ	59

2.9.	Temperatursensitive <i>MDJ1</i> -Mutanten mit N-terminalem Fragment von Mdj1p.....	63
2.10.	Temperatursensitive <i>MDJ1</i> -Mutanten mit Sis1p	64
2.11.	Der Einfluß des Farnesylierungsmotivs auf die Funktionalität von Ydj1p	66
3.	Respiratorische Aktivität der Komplementationsmutanten	70
4.	Untersuchung der mitochondrialen DNA in den Komplementationsmutanten	72
4.1.	Anfärbung der mitochondrialen DNA mit DAPI	72
4.2.	Transformation von YTL3MSScj1 und YTL3MSSis1 mit einem <i>MDJ1</i> -Allel	76
4.3.	Analyse der mitochondrialen DNA im Southern-Blott.....	77
5.	Synthese mitochondrial kodierter Proteine in den Komplementationsmutanten	80
5.1.	Mitochondriale Transkription in den Komplementationsmutanten	80
5.2.	Mitochondriale Translation in den Komplementationsmutanten.....	84
IV.	Zusammenfassung und Ausblick.....	91
V.	Literaturverzeichnis	93

Abkürzungen

Ac	Acetat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ADP	Adenosindiphosphat
(d)ATP	(desoxy-) Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CD	Circulardichroismus
cpm	Impulse pro Minute
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
(d)CTP	(desoxy-) Cytidintriphosphat
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	Dithiotreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
G/F-Linker	glycin-/phenylalaninreicher Bereich in DnaJ-Proteinen
(d)GTP	(desoxy-) Guanosintriphosphat
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HSP	Hitzeschockprotein
IMAC	immobilisierte Metallaffinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl- β -D-galactopyranosid
MES	2-Morpholino-1-ethansulfonsäure
MOPS	3-Morpholino-1-propansulfonsäure

NTA	Nitrilotriessigsäure
N-terminales Fragment	Proteinfragment von DnaJ-Proteinen, das die J-Domäne und den G/F-Linker umfaßt
NMR	Kernmagnetische Resonanz
OD_λ	Optische Dichte bei der Wellenlänge λ
p.a.	pro analysi
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
PMSF	Phenylmethyl-Sulfonylfluorid
POD	Meerrettich-Peroxidase
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
Su9	Untereinheit 9 der F_0 -ATPase aus <i>Neurospora crassa</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
ts	temperatursensitiv
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tri(hydroxymethyl)-aminomethan
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
(d)TTP	(desoxy-) Thymidintriphosphat
v	Volumen
w	Gewicht
WT	Wildtyp

I. Einleitung

1. Mitochondrien - Energielieferanten der eukaryontischen Zelle

Die zelluläre Atmung findet bei Eukaryonten in den Mitochondrien statt. In diesen Organellen, die bis zu 20% des gesamten Zellvolumens ausfüllen können, wird die Energie liefernde Oxidation von Nährstoffen mit der Energie verbrauchenden Synthese von ATP gekoppelt.

Die Ähnlichkeit der Mitochondrien mit „modernen“ aerob lebenden Bakterien bildet die Basis für die allgemein anerkannte Endosymbiontentheorie, nach der Mitochondrien und aerob lebende Eubakterien gemeinsame Vorfahren aufweisen (Margulis, 1975). Diese Theorie besagt, daß eukaryontische, anaerob lebende Zellen aerob lebende Eubakterien rekrutierten und sich somit deren Fähigkeit zunutze machten, Energie in Form von ATP durch einen aeroben Stoffwechsel zu erzeugen. Im Gegenzug profitierten die Bakterien von den Produkten des eukaryontischen Stoffwechsels. Auf diese Weise eröffnete sich dieser symbiontischen Einheit eine weitaus unabhängigere Lebensweise unter sowohl aeroben als auch anaeroben Bedingungen.

Ein eigener Proteinsyntheseapparat und ein eigenes Genom zeugen am deutlichsten von dem prokaryontischen Ursprung der Mitochondrien. In den derzeit lebenden eukaryontischen Organismen läßt sich eine große Vielfalt mitochondrialer Genome, sowohl hinsichtlich ihrer Größe als auch der Anzahl der kodierten Gene, beobachten. Mit fast 70 kb und 97 kodierten Genen besitzt das mitochondriale Genom des tierischen Einzellers *Reclinomonas americana* die umfassendste bislang bekannte genomische Information (Lang et al., 1997). Das humane mitochondriale Genom mit 16 kb kodiert dagegen neben zwei ribosomalen Untereinheiten und 22 tRNAs nur 13 Proteine, die ausschließlich der Atmungskette zugehörig sind (Schmitt und Clayton, 1993). Ebenfalls zwei ribosomale Untereinheiten, 24 tRNAs, eine RNA-Komponente der Ribonuklease P sowie acht Proteine der Atmungskette und ein ribosomal assoziiertes Protein werden durch das 86 kb große Genom von *S. cerevisiae* kodiert (Foury et al., 1998).

Die genetische Information der laut Endosymbiontentheorie aufgenommenen Eubakterien wurde im Laufe der Evolution bis auf ein Minimum reduziert. Für diese Reduktion des

Genoms der ehemals eigenständigen Eubakterien wird ein umfangreicher Transfer von Genen in den Nukleus der Eukaryonten verantwortlich gemacht, der damit eine wechselseitige Abhängigkeit von Wirt und Endosymbiont besiegelte. Als Konsequenz ist der größte Teil der mitochondrialen Proteine in den heute existierenden eukaryontischen Zellen durch die nukleäre DNA kodiert. Die überwiegende Mehrzahl der mitochondrialen Proteine gelangt somit erst nach der Synthese im Zytosol an ihren eigentlichen Bestimmungsort - die Mitochondrien (Schatz und Dobberstein, 1996; Neupert, 1997). Neben den kernkodierten Komponenten der Atmungskette betrifft dies ebenso die Enzyme des Harnstoffzyklus, des Zitratzyklus und der Fettsäureoxidation sowie Proteine, die zur DNA-Replikation, Transkription und Translation also für die mitochondriale Biogenese benötigt werden.

Obwohl inzwischen ein Großteil der an der mitochondrialen Biogenese beteiligten Komponenten identifiziert werden konnte, sind viele mechanistische Details bis heute nur unzureichend aufgeklärt. Dabei gewinnen die offenstehenden Fragen in letzter Zeit immer mehr an Bedeutung. So wird verstärkt die Rolle der Mitochondrien beim Alterungsprozeß diskutiert (Rustin et al., 2000). Grundlage für diese Diskussion war die Beobachtung, daß sich die Aktivität der Cytochromoxidase c mit zunehmendem Alter verringert (Hayashi et al., 1994). Desweiteren wurde eine Akkumulation von Mutationen im mitochondrialen Genom während des Alterungsprozesses beobachtet (Wallace, 1992; Cortopassi und Wong, 1999). Inzwischen konnte nachgewiesen werden, daß deren primäre Ursache rezessive Mutationen der nukleären DNA darstellen (Isobe et al., 1998). Als Folge solcher rezessiver Mutationen gerät das Verhältnis zwischen nukleär und mitochondrial kodierten Proteinkomponenten, die gemeinsam die Atmungskette konstituieren, aus dem Gleichgewicht, und es kommt zu einer Anhäufung freier Radikale (Lee und Wei, 1997). Die mitochondriale DNA, die in der mitochondrialen Matrix in enger Nachbarschaft zu den membranassoziierten Atmungskettenkomponenten lokalisiert ist, unterliegt dadurch einer erhöhten Mutationsanfälligkeit. Dieses erhöhte Mutations-Risiko wird noch dadurch verstärkt, daß die mitochondriale DNA nicht in dem Maße wie die nukleäre DNA durch Histone geschützt ist und nur ein begrenztes Spektrum an DNA-Reparaturmechanismen in den Mitochondrien zur Verfügung steht (Croteau et al., 1999; Marcelino und Thilly, 1999; Sawyer und Van Houten, 1999).

Neben dem Alterungsprozeß werden auch verschiedene Krankheiten mit mitochondrialen Fehlfunktionen in Verbindung gebracht, deren Auswirkungen äußerst vielschichtig sind. Multisystemdefekte, einschließlich degenerativer Veränderungen von Muskel- und zentralem Nervensystem bis hin zum Verlust des Seh- bzw. Hörvermögens, sind bekannt (Schapira und Cock, 1999). In vielen Fällen wird auf zellulärer Ebene eine Beeinträchtigung der

oxidativen Phosphorylierung diagnostiziert (Schapira und Cock, 1999). Wegen der besonderen Regulation mitochondrialer Prozesse durch zwei Genome gestaltet sich die Suche nach den auslösenden Faktoren jedoch äußerst komplex. Neben Mutationen von kernkodierten mitochondrialen Enzymen, die z.B. bei dem Krankheitsbild der Friedreichs-Ataxie oder des Down-Syndroms eine Rolle spielen, können auch die kernkodierten Komponenten des mitochondrialen Imports mitochondriale Fehlfunktionen auslösen (Druzhyzna et al., 1998; Koehler et al., 1999; Lodi et al., 1999). Einige folgenschwere Krankheiten werden aber auch durch Mutationen des mitochondrialen Genoms selbst verursacht (Howell, 1999). Einen Überblick über die bisher auf dem humanen mitochondrialen Genom identifizierten krankheitsauslösenden Mutationen bietet die Abbildung 1.

Noch deutlicher zeigt sich die enge Verflechtung von mitochondrialen und zytosolischen Prozessen bei der Huntington-Krankheit. Im Zusammenhang mit Huntington wurde ein sekundärer Effekt auf die oxidative Phosphorylierung durch Mutation des vom Kern kodierten nicht-mitochondrialen Proteins Huntingtin beschrieben (Gu et al., 1996; Martindale et al., 1998; Sawa et al., 1999).

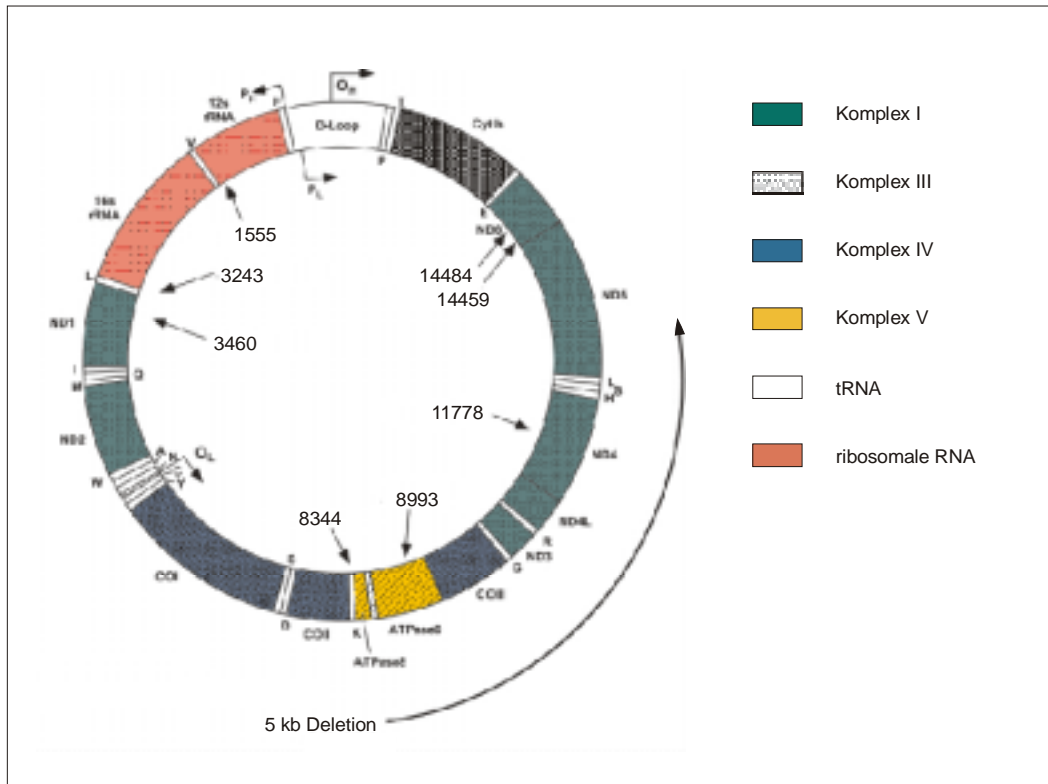


Abbildung 1: Humanes mitochondriales Genom. Bisher identifizierte Mutationen und Deletionen, die mitochondriale Krankheiten verursachen, sind durch Pfeile markiert. (<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>).

Neuere wissenschaftliche Untersuchungen fokussieren in zunehmendem Maße auf die Rolle der Mitochondrien in der Signalkaskade, die zur Apoptose führt (Papa und Skulachev, 1997; Siesjo et al., 1999; Halestrap et al., 2000). Aus bisherigen Untersuchungen ist bekannt, daß apoptogene Faktoren wie Cytochrom c und AIF (*apoptosis inducing factor*) aus den Mitochondrien in einem frühen Stadium der Apoptose freigesetzt werden (Green und Reed, 1998; Skulachev, 1998; Martinou et al., 2000). Ein Wechselspiel zwischen pro- und antiapoptotischen Vertretern der Bcl-2-Familie steuert die Ausbildung von Translokationsporen, über die mitochondriale Proteine in das Zytosol gelangen (Crompton, 1999; Eskes et al., 2000; Tsujimoto und Shimizu, 2000; Adams und Cory, 2001). Einmal im Zytosol, bewirkt Cytochrom c die Oligomerisierung von Apaf-1, das als eine Art Adaptermolekül fungiert. Durch diese Oligomerisierung können an Apaf-1 gebundene Procaspase-9-Moleküle durch gegenseitige Autoprozessierung aktive Caspase-9 freisetzen, die dann weitere Caspasen¹ aktivieren (Papa und Skulachev, 1997; Bossy-Wetzels und Green, 1999; Siesjo et al., 1999). Das Voranschreiten der Apoptose läßt sich unter anderem an einer dramatisch veränderten Zellmorphologie und der Fragmentierung der genomischen DNA nachweisen.

Auch die kontrovers geführten Diskussionen, ob neurodegenerative Erkrankungen, wie Alzheimer und Parkinson, mitochondrial verursachte Krankheiten sind, werden im Zusammenhang mit apoptotischen Prozessen betrachtet (Bonilla et al., 1999; Ito et al., 1999; Meier-Ruge und Bertoni-Freddari, 1999). So wurde bei diesen beiden Erkrankungen in einer Vielzahl von Fällen eine verringerte respiratorische Aktivität im betroffenen Hirngewebe diagnostiziert (Wallace, 1992). Das vermehrte Auftreten mitochondrialer Mutationen im Alter in Kombination mit spezifischen Defekten in Atmungskettenkomponenten, die in rezessiven nukleären Mutationen begründet sind, könnten durch synergistische Effekte das späte Einsetzen der Krankheitssymptome verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen erklären. An dieser Stelle soll auf die Internetseite <http://www.gen.emory.edu/mitomap.html> verwiesen werden, auf der die neuesten wissenschaftlichen Erkenntnisse über das humane mitochondriale Genom veröffentlicht werden.

¹ Caspasen sind Cystein-abhängige Aspartat-gerichtete Serinproteasen, die als inaktive Proformen in der Zelle existieren, bis sie durch andere Proteine aktiviert werden.

2. Die mitochondriale DNA-Replikation

Ein Prozess, der die mitochondriale Funktionalität maßgeblich beeinflusst, besteht in der Erhaltung eines funktionellen mitochondrialen Genoms. Insbesondere die Vervielfältigung der Erbinformation der Mitochondrien, also die mitochondriale DNA-Replikation, ist für die Weitergabe funktioneller Mitochondrien an neue Zellgenerationen entscheidend.

2.1. Transkriptionsabhängige mtDNA-Replikation

Am besten ist die Replikation mitochondrialer DNA für das humane System beschrieben. Die Replikation der ringförmigen doppelsträngigen DNA in humanen Mitochondrien wird von einem Transkriptionsereignis eingeleitet (Clayton, 1991; Lee und Clayton, 1998). Die Replikation des cytidinreichen L-Stranges (*light strand*) erfolgt zeitlich versetzt zur Replikation des guanosinreichen H-Stranges (*heavy strand*). Ausgehend von einem vor dem Replikationsursprung des H-Stranges lokalisierten Promoter, werden RNA-Transkripte von der mitochondrialen RNA-Polymerase synthetisiert. Diese Transkripte dienen entweder der Expression mitochondrialer Gene oder werden durch die RNase MRP derart prozessiert, daß sie als Primer für die mitochondriale DNA-Polymerase fungieren können. Die Identifizierung von RNA-DNA-Hybriden unterstützt diesen Mechanismus (Xu und Clayton, 1996). Die Replikation des L-Stranges wird dagegen erst dann mit Hilfe einer DNA-Primase initiiert, wenn im Verlauf der Replikation des H-Stranges der Replikationsursprung des L-Stranges in einzelsträngiger Form vorliegt (Clayton, 1991).

Es gibt zahlreiche Hinweise dafür, daß dieser Mechanismus in hohem Maße speziesübergreifend konserviert ist. Vergleicht man z.B. Mitochondrien von Vertebraten mit denen aus der Bäckerhefe *S. cerevisiae*, so findet man alle sequenzhomologen Proteine der Replikationsmaschinerie, die für den oben beschriebenen Replikationsmechanismus benötigt werden (Schmitt und Clayton, 1993). Ebenso weist die mitochondriale DNA in Hefe typische G/C-Motive in der ansonsten A/T-reichen Basensequenz auf, die den stark konservierten Sequenzen im Replikationsursprung der Vertebraten entsprechen (de Zamaroczy et al., 1984). Im Gegensatz zu Vertebraten, die nur einen aktiven Replikationsursprung in ihrem mitochondrialen Genom aufweisen, beobachtet man in dem ca. fünfmal größeren mitochondrialen Genom der Hefe acht homologe Sequenzen, von denen drei durch ihre Nachbarschaft zu Promotoren eine transkriptionsabhängige Replikation ermöglichen (Foury et al., 1998). Hinzu kommt, daß auch in Hefe stabile RNA-DNA-Hybride identifiziert werden

konnten, deren 5'-DNA-Enden, wie in Vertebraten, innerhalb der als Replikationsstart postulierten Sequenzbereiche kartieren (Xu und Clayton, 1995; Graves et al., 1998).

2.2. Alternative Replikationsmechanismen in Hefe

Neben einer durch Transkription eingeleiteten DNA-Replikation werden für *S. cerevisiae* auch andere Replikationsmechanismen vorgeschlagen. Ausschlaggebend hierfür war die Beobachtung, daß in Hefe mitochondriale Genome, unabhängig von der Anwesenheit der als Replikationsursprünge identifizierten Sequenzbereiche bzw. einer transkribierenden RNA-Polymerase, repliziert werden. Zum Beispiel werden mitochondriale Genome, die ausschließlich aus A/T-Basenpaarungen bestanden, also keine der für Replikationsursprünge typischen G/C-Motive aufweisen, über mehrere Generationen stabil repliziert (Fangman und Dujon, 1984). Noch bemerkenswerter ist, daß spezielle als hypersuppressiv² bezeichnete mitochondriale Genome, die ausschließlich tandemartig aneinandergereihte Replikationsursprünge enthalten, in Abwesenheit der mitochondrialen RNA-Polymerase repliziert werden. Erstaunlicherweise bleibt dabei sogar ihre Hypersuppressivität - also die bevorzugte Weitergabe ihrer mitochondrialen DNA an nachkommende Zellgenerationen - erhalten (Fangman et al., 1990; Lorimer et al., 1995). Diese offensichtlich ohne Transkription replizierten Genome sind jedoch nicht-funktionelle sogenannte [rho⁻]-Genome, die keine respiratorische Aktivität vermitteln können. Dennoch werden sie stabil über Generationen hinweg repliziert. Diese Tatsache impliziert, daß neben der durch Transkription initiierten DNA-Replikation in Hefe noch andere Replikationsmechanismen existieren.

Als Alternative wird z.B. die Initiation der DNA-Synthese durch eine DNA-Primase diskutiert, bei der die Replikation beider Stränge in beide Richtungen innerhalb der als Replikationsursprung identifizierten Region initiiert wird (Lorimer et al., 1995). So könnte zum Beispiel die DNA-Primase durch sequenzspezifische Komponenten, wie dem Transkriptionsfaktor Mtf1p (sc-mtTFB) und dem DNA-bindenden Protein Abf2p (sc-mtTFA),

² Suppressivität ist ein Merkmal von mitochondrialen [rho⁻]-Genomen und ist ein Ausdruck dafür, ob nach einer Kreuzung von haploiden Zellen mit unterschiedlichen mitochondrialen Genomen Zygoten auftreten, die vorwiegend eines der beiden parentalen mitochondrialen Genome aufweisen. Ist die Suppressivität eines [rho⁻]-Genoms so hoch, daß fast alle Zygoten dieses spezifische [rho⁻]-Genom tragen, spricht man von Hypersuppressivität.

zu dem Initiationskomplex am jeweiligen DNA-Strang dirigiert werden (Graves et al., 1998). Dieser RNA-Polymerase unabhängige Transkriptionsmechanismus würde aber noch nicht die Replikation eines allein aus A/T-Basenpaaren bestehenden mitochondrialen Genomes erklären (Fangman und Dujon, 1984).

Möglicherweise spielen auch Mechanismen eine Rolle, die analog der Replikation von ARS-Bereichen (*autosomal replicative sequences*) auf der nukleären DNA in Hefe verlaufen. ARS-ähnliche Sequenzen, lassen sich in enger Nachbarschaft zu den meisten Replikationsursprüngen finden (Graves et al., 1998).

Ferner könnten Rekombinationsintermediate das auslösende Ereignis für die Replikation darstellen (MacAlpine et al., 1998). Schließlich werden auch Mechanismen, wie *rolling circle* oder eine diskontinuierliche Replikation diskutiert, die sogar linearisierte DNA-Spezies mit in Betracht ziehen (Nosek et al., 1998).

Angesichts dieser Vielfalt an potentiell alternativen Replikationsmechanismen neben der durch die RNA-Polymerase vermittelten Initiation soll hier jedoch klar herausgestellt werden, daß auch in Hefe stets nur dann funktionelle - also Respiration vermittelnde - mitochondriale Genome vererbt werden, wenn sowohl die mitochondriale RNA-Polymerase als auch ein kompletter Replikationsursprung vorhanden sind. Trotzdem sind genaue Erkenntnisse über alternative und möglicherweise konkurrierende Replikationsmechanismen eine wichtige Voraussetzung für das Verständnis der Funktion der Mitochondrien im Lebenszyklus der Zelle. Sollten transkriptionsunabhängige Replikationsmechanismen existieren, wäre es interessant, Komponenten zu identifizieren, die an solchen Prozessen beteiligt sind. Vorstellbar wäre zum Beispiel eine Funktion von Chaperonen wie dem Hsp70-System analog zur DNA-Replikation von Bakteriophagen (vgl. I.3.2).

3. Hsp70-Systeme und DNA-Replikation

3.1. Das Hsp70-System - ein Chaperonsystem

Hsp70-Systeme spielen bei den unterschiedlichsten zellulären Prozessen eine wichtige Rolle. Komponenten des Hsp70-Systems konnten bisher in allen untersuchten prokaryontischen und eukaryontischen Zellen in verschiedenen Zellkompartimenten identifiziert werden. Wegen der erhöhten Expression der Hsp70-Proteine unter Hitzestress

werden diese auch als Hitzeschockproteine (Hsp) klassifiziert, obwohl inzwischen auch konstitutiv exprimierte homologe Proteine (Hsc) bekannt sind. Als Chaperone sind Hsp70-Systeme an einer Vielzahl von Assemblierungs- und Disassemblierungsprozessen beteiligt, die maßgeblich den Proteinmetabolismus bestimmen. Sowohl bei der Proteinsynthese, der Faltung und Translokation von Proteinen als auch beim Abbau von Polypeptiden sind Mitglieder des Hsp70-Systems involviert (Bukau und Horwich, 1998). Dabei ist das hochkonservierte Hsp70-Protein die zentrale Komponente in den ATP-verbrauchenden Prozessen. Die Aktivität und Substratspezifität von Hsp70-Proteinen wird durch Cochaperone reguliert (Nagata et al., 1998; Pierpaoli et al., 1998; Kelley, 1999; Mayer et al., 2000). Dem Hsp70-Protein aus *E. coli*, DnaK, assistieren zum Beispiel die beiden Cochaperone, DnaJ und GrpE. Dabei vermittelt DnaJ die Bindung von Substratproteinen an DnaK, während GrpE als Nukleotidaustauschfaktor fungiert. Gemeinsam stimulieren sie die ansonsten sehr schwache ATPase-Aktivität von DnaK um mindestens das Hundertfache (Liberek et al., 1991; Langer et al., 1992; McCarty et al., 1995; Packschies et al., 1997; Buchberger et al., 1999).

Im Gegensatz zu den beiden Cochaperonen DnaJ und GrpE ist die Aminosäuresequenz der Hsp70-Proteine speziesübergreifend mit ca. 50% Sequenzidentität sehr stark konserviert (Webster et al., 1994). Die Homologie der Nukleotidaustausch-Faktoren ist auf wenige kurze Sequenzmotive beschränkt, so daß eine Identifizierung funktionsverwandter Proteine auf Basis von Aminosäure Sequenzvergleichen kaum möglich ist (Bollinger et al., 1994; Laloraya et al., 1994; Höhfeld und Jentsch, 1997; Naylor et al., 1998). Homologe des Cochaperons DnaJ zeichnen sich in erster Linie durch das Vorhandensein der ca. 70 Aminosäurereste umfassenden sogenannten J-Domäne aus (Caplan et al., 1993; Cyr et al., 1997; Kelley, 1998).

Das Hsp70-System arbeitet in einem ATP-abhängigen Zyklus, welcher am intensivsten für das aus DnaK, DnaJ und GrpE bestehende Chaperon-System von *E. coli* untersucht wurde (Hartl, 1996; Rassow et al., 1997; Pierpaoli et al., 1998).

Im Verlauf dieses Zyklus tritt DnaK in einer ATP- und in einer ADP-gebundenen Form auf. Das jeweils gebundene Nukleotid bestimmt die Konformationen von DnaK und dadurch die Stärke der Bindungsaffinität zwischen DnaK und Substrat³. In der ATP-gebundenen Form weist die Peptid-Bindungstasche von DnaK eine relativ geringe Affinität zum Substrat auf.

³ Als Substrate werden hier Proteine bzw. Polypeptide bezeichnet, die ausgedehnte hydrophobe Bereiche an ihrer Oberfläche exponieren.

Erst nach der durch DnaJ und das Substrat selbst stimulierten ATP-Hydrolyse vollzieht sich eine Konformationsänderung, in deren Folge sich die Affinität von DnaK zum Substrat erhöht. Der anschließende Austausch von ADP gegen ATP, bewirkt die Rückkehr zu einer Konformation mit geringer Substrataffinität. Das schwach gebundene Substrat hat die Möglichkeit, sich aus der Wechselwirkung mit DnaK zu lösen oder erneut diesen Zyklus zu durchlaufen (Pierpaoli et al., 1998).

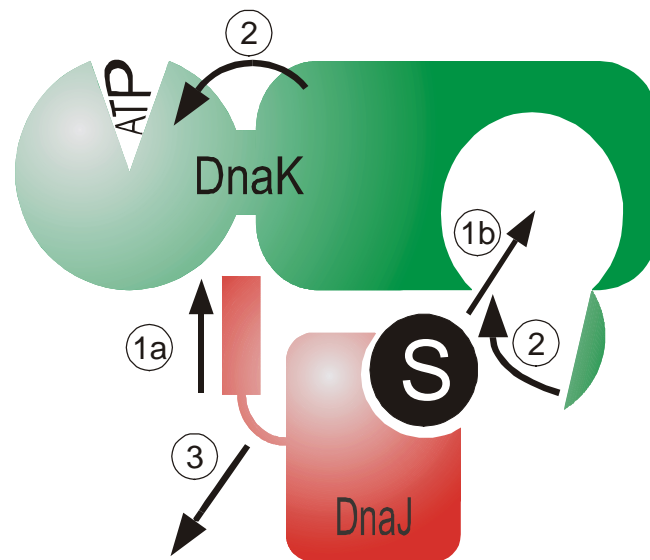


Abbildung 2: Modell für die Regulation von DnaK durch DnaJ nach Laufen (Laufen et al., 1999). ① DnaJ interagiert mittels seiner J-Domäne mit der ATPase- und der Peptidbindungsdomäne von DnaK (a) und präsentiert der Peptidbindungstasche von DnaK das Substratprotein S (b). Die Reihenfolge der beiden Schritte a und b ist bislang noch unklar. ② Die stimulierte ATP-Hydrolyse verläuft parallel mit dem Schließen der Peptidbindungstasche von DnaK. ③ Schließlich dissoziiert DnaJ von dem DnaK/ADP/Substrat-Komplex ab. Der durch GrpE stimulierte Austausch von ADP gegen ATP, die Öffnung der Peptidbindungstasche und die anschließende Freisetzung des Substrats regeneriert DnaK und ermöglicht so die regulierte reversible Substratbindung und -freisetzung.

Alle Hsp70-abhängigen Assemblierungs- und Disassemblierungsprozesse basieren auf diesem zyklischen Wechsel zwischen hoch- und niedrigaffiner Bindung der Hsp70-Proteine an das entsprechende Substrat. Die dazu erforderliche „Kommunikation“ zwischen der ATPase- und der Peptidbindungsdomäne wird durch die jeweiligen Vertreter der DnaJ-Proteinfamilie vermittelt (vgl. Abbildung 2) (Gässler et al., 1998; Suh et al., 1998; Davis et al., 1999; Laufen et al., 1999;).

3.2. Beteiligung von Hsp70-Systemen an DNA-Replikationsprozessen

Neben der Funktion des Hsp70-Systems als Faltungshelfer für aggregationsanfällige, denaturierte oder neu synthetisierte Proteine, also Substrate, die sich alle durch nicht native Strukturen auszeichnen, gibt es auch einige zelluläre Prozesse, bei denen native Proteine als Substrate für Hsp70 fungieren. So ist beispielsweise bekannt, daß σ^{32} , RepA und λ P in der nativen Konformation Substrate für Hsp70 darstellen.

Die Komponenten des Hsp70-Systems aus *E. coli*, DnaK, DnaJ und GrpE wurden anfänglich nur als essentielle Wirtsfaktoren für die DNA-Replikation des Bakteriophagen λ aufgrund ihrer Wechselwirkung mit λ P beschrieben (Saito und Uchida, 1978; Saito et al., 1978; Yochem et al., 1978). Dabei besteht die Funktion des Hsp70-Systems darin, das Phagenprotein λ P vom preprimosomalen Komplex abzulösen, nachdem dieses seine Aufgabe, die Helikase DnaB zu dem Replikationsursprung $ori\lambda$ zu transportieren, erfüllt hat. Ohne das Hsp70-System würde DnaB durch λ P blockiert bleiben. Erst die partielle Disassemblierung durch DnaK ermöglicht die Initiation der Replikation (Alfano und McMacken, 1989; Zylicz et al., 1989; Zylicz et al., 1998). Ein anderer Mechanismus wurde bei Viren, wie SV40 oder Polyomaviren, beobachtet. Hier besitzen bereits viruseigene Proteine ein wichtiges Strukturmerkmal der DnaJ-Proteine. Die N-Termini der großen Tumorantigene dieser Viren wurden als J-Domänen identifiziert, die analog zur J-Domäne im DnaJ von *E. coli* gemeinsam mit einem wirtseigenen Hsp70-Protein bei der Replikation der viralen DNA agieren (Kelley und Landry, 1994; Campbell et al., 1997). Ein weiteres Beispiel für eine Beteiligung von Hsp70-Systemen an der DNA-Replikation wurde für Papillomavirus-11 beschrieben. Auch hier sind nur zwei viruseigenen Proteine, E1 und E2, an der Replikation der viralen DNA beteiligt, alle anderen für die DNA-Replikation benötigten Proteine, darunter ein Hsp70-System, werden vom Wirt genutzt. Die Aktivität der Helikase E1 wird durch das humane Hsp70-System stimuliert (Liu et al., 1998). Im Unterschied dazu ist bei der Replikation von Plasmid P1 in *E. coli* nicht die Replikation an sich, sondern die Bildung des Initiationskomplexes vom Hsp70-System abhängig. RepA-Dimere müssen in die monomeren Untereinheiten disassembliert werden, welche erst dann mit hoher Affinität an den Replikationsursprung $oriP1$ binden und die Bildung des Initiationskomplexes ermöglichen (Wickner et al., 1990; Wickner et al., 1992; Chatteraj et al., 1996). Über einen ähnlichen Mechanismus könnte die Replikation der chromosomalen DNA von *E. coli* ausgehend von dem Replikationsursprung $oriC$ verlaufen. Auch hier bildet möglicherweise eine

chaperonvermittelte Disassemblierung von nicht-funktionellen Oligomeren des Initiationsfaktors DnaA die Voraussetzung für die Initiation der Replikation (Sakakibara, 1988).

Chaperone der Hsp70-Familie sind außerdem an DNA-Reparaturmechanismen beteiligt, die für die Erhaltung eines Genomes ebenfalls von großer Bedeutung sind (Zou et al., 1998).

4. DnaJ und homologe Proteine

Die Funktionalität von Hsp70-Proteinen wird von Cochaperonen stimuliert und modelliert. Die Vertreter der Familie der J-Proteine beeinflussen sowohl die ATP-Hydrolyse als auch die Substratbindung von Hsp70. Dabei spielt die J-Domäne als gemeinsames Strukturmerkmal eine zentrale Rolle (Cyr, 1997; Rassow et al., 1997; Bukau und Horwich, 1998). Während alle Vertreter dieser Proteinfamilie die ca. 70 Aminosäuren umfassende J-Domäne aufweisen, werden sie anhand zusätzlicher Strukturmerkmale in drei Klassen unterteilt.

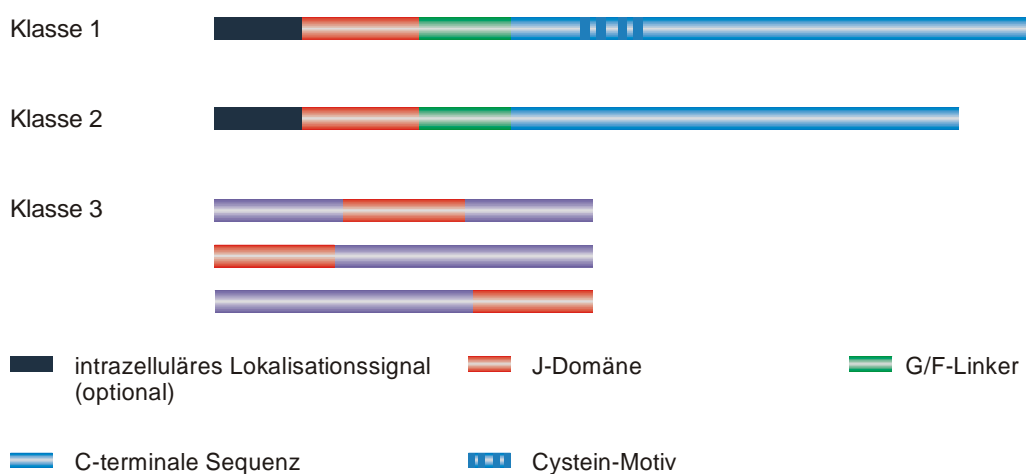


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Sequenzmerkmale der drei Klassen an DnaJ-Proteinen.

Proteine mit einer N-terminalen J-Domäne, gefolgt von einem glycin-/phenylalaninreichen Bereich (G/F-Linker), der als Linker zu einem Cystein-Motiv im C-terminalen Abschnitt fungiert, werden häufig als "DnaJ-Proteine" schlechthin bezeichnet und gehören der ersten Klasse an. Der prominenteste und am besten charakterisierte Vertreter der DnaJ-Proteine ist DnaJ aus *E. coli*. Für dieses DnaJ-Protein konnte gezeigt werden, daß das Cystein-Motiv, welches aus repetitiven cysteinreichen Sequenzen besteht, für die Koordination von zwei Zn^{2+} -Ionen verantwortlich ist (Banecki et al., 1996; Szabo et al., 1996). Im Unterschied zu den „echten“ DnaJ-Proteinen fehlt den Vertretern der zweiten Klasse dieses

zinkfingerähnliche Cystein-Motiv. In einer dritten Klasse werden Proteine zusammengefaßt, die ausschließlich eine J-Domäne aufweisen, die zudem nicht zwingend am N-Terminus dieser Proteine lokalisiert sein muß. Meistens zeichnen sich diese Proteine durch zusätzliche Sequenzmerkmale, wie z.B. Transmembrandomänen aus, die deren spezifische Lokalisation bestimmen (Kelley, 1998).

Wegen der Hitzeinduzierbarkeit vieler Vertreter dieser Proteinfamilie und einem Molekulargewicht von annähernd 40 kD werden sie häufig auch als Hsp40-Proteine klassifiziert.

Strukturelle Daten sind inzwischen für das N-terminale Fragment bzw. das Cystein-Motiv als isolierte Domänen nicht jedoch für das gesamte Protein veröffentlicht (Szyperski et al., 1994; Hill et al., 1995; Pellecchia et al., 1996; Martinez-Yamout et al., 2000).

4.1. Die J-Domäne

Die allen DnaJ-Proteinen gemeinsame J-Domäne, bildet die unabdingbare Voraussetzung für die Funktion dieser Proteine als Cochaperone für Hsp70. Die N-terminalen 108 Aminosäuren von DnaJ, die neben der J-Domäne den G/F-Linker enthalten, sind z.B. ausreichend für die Stimulierung der ATPase-Aktivität von DnaK (Wall et al., 1994). Mit bis zu 60% Sequenzidentität weist die J-Domäne mit Abstand die größte Homologie zu anderen Proteinen der DnaJ-Familie auf. Absolut konserviert sind dabei die drei aufeinanderfolgenden Aminosäuren Histidin, Prolin und Aspartat an den Aminosäurepositionen 32-34. Durch ¹H-NMR-Studien an N-terminalen Fragmenten von DnaJ wurde eine kompakte durch α -Helices dominierte Struktur bestimmt (Szyperski et al., 1994; Hill et al., 1995; Pellecchia et al., 1996). Zwei der vier α -Helices, Helix II und Helix III, sind antiparallel angeordnet und durch den sogenannten HPD-*loop* verbunden, der die konservierten Aminosäuren Histidin (H), Prolin (P) und Aspartat (D) enthält (Abbildung 4). Zusammen mit Helix I umschließen Helix II und Helix III einen hydrophoben Kern. Einige Aminosäuren an der Oberfläche von Helix II und III sind gemeinsam mit dem HPD-*loop* für die Interaktion mit dem jeweiligen Hsp70-Protein verantwortlich. Während der HPD-*loop* dabei absolut essentiell für die funktionelle Wechselwirkung mit Hsp70 ist, bestimmen die Aminosäuren an der Oberfläche der beiden Helices II und III wahrscheinlich die Spezifität zu einem bestimmten Hsp70-Molekül (Schlenstedt et al., 1995; Greene et al., 1998).

Die für ¹H-NMR Studien verwendeten N-terminalen Fragmente von DnaJ, umfaßten neben der J-Domäne auch Teile des G/F-Linkers. Für die Strukturaufklärung ist die Flexibilität

dieses Bereiches jedoch zu hoch. Überraschenderweise scheint aber die Länge des Linkers sowohl die Struktur der J-Domäne als auch deren Funktion als Cochaperon wesentlich zu beeinflussen (Huang et al., 1999; Yan und Craig, 1999).

Anders als für die J-Domäne und den G/F-Linker, ist über die Funktion des C-Terminus bisher wenig bekannt. Es wird vermutet, daß der C-terminale Teil der DnaJ-Proteine die Substratspezifität bestimmt. Lediglich für das Cystein-Motiv wurde eine Rolle bei der Bindung an das Peptidrückgrad entfalteter Proteine postuliert (Banecki et al., 1996; Karzai und McMacken, 1996; Szabo et al., 1996).

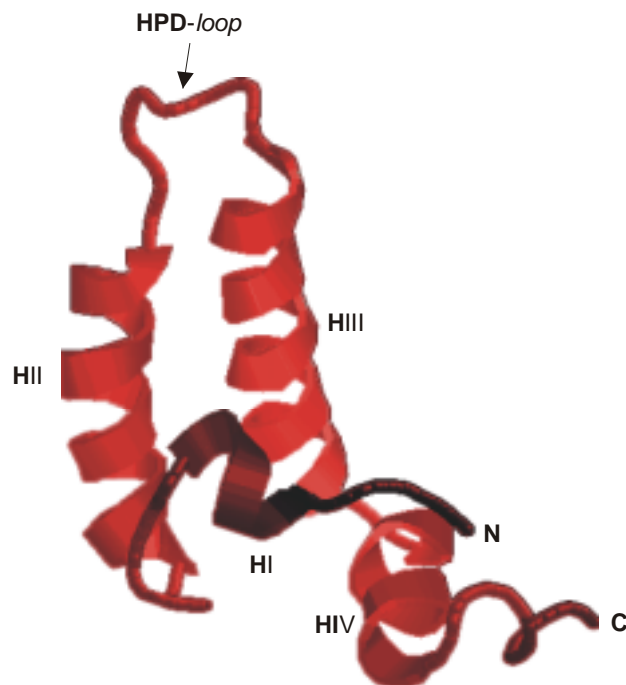


Abbildung 4: Struktur der J-Domäne von DnaJ. N- und C-Terminus, die vier Helices und der HPD-loop sind gekennzeichnet (Pellecchia et al., 1996).

4.2. Mdj1p - ein mitochondriales DnaJ-Protein in *Saccharomyces cerevisiae*

Nach der vollständigen Sequenzierung des Genoms von *S. cerevisiae*, sind 18 DnaJ-homologe Proteine und 14 Hsp70-Homologe in diesem Organismus bekannt (Ziegelhoffer et al., 1996; Cyr, 1997). Jedes Kompartiment der Hefezelle ist dabei mit einem eigenen Satz an Hsp70-Systemen ausgestattet. Möglicherweise besetzt jedes Hsp70-System eine spezifische funktionelle Nische (Silver und Way, 1993).

So sind in Mitochondrien inzwischen drei Hsp70-Homologe (Ssc1p, Ssq1p und Ecm10) bekannt (Craig et al., 1989; Schilke et al., 1996; Rassow et al., 1997; Baumann et al., 2000). Ebenfalls drei Proteine mit einer J-Domäne konnten bisher in Mitochondrien identifiziert werden (Rowley et al., 1994; Westermann und Neupert, 1997; Strain et al. 1998; Voisine et al., 2001).

Als erstes mitochondriales DnaJ-Protein wurde Mdj1p in *S. cerevisiae* entdeckt (Rowley et al., 1994). Wie DnaJ aus *E. coli*, zu dem Mdj1p eine Aminosäure-Identität von 32% aufweist, wird *MDJ1* sowohl konstitutiv als auch hitzeinduziert exprimiert. Mdj1p besitzt die gleiche Domänenstruktur, wie *E. coli* DnaJ und zählt daher zu den „echten“ DnaJ-Proteinen. Zusammen mit Ssc1p (mt-Hsp70) und Mge1p (mt-GrpE) konstituiert Mdj1p ein Hsp70-System, daß innerhalb der mitochondrialen Matrix von *S. cerevisiae* eine ähnliche Rolle übernimmt wie das bakterielle Hsp70-System, bestehend aus DnaK, DnaJ und GrpE, im Zytosol von *E. coli* (Deloche et al., 1997a; Deloche et al., 1997b; Savel'ev et al., 1998; Kubo et al., 1999). Ebenso wie in *E. coli* ist dieses Hsp70-System an der Proteinfaltung beteiligt und verhindert die Aggregation hitzesensitiver Proteine (Rowley et al., 1994; Prip-Buus et al., 1996; Westermann et al., 1996). Dabei sind sowohl mitochondrial synthetisierte als auch importierte Proteine Substrate dieses Chaperonsystems (Kang et al., 1990; Herrmann et al., 1994; Rowley et al., 1994; Westermann et al., 1996). Während jedoch das mitochondriale Hsp70 (Ssc1p) und das mitochondriale GrpE (Mge1p) zusätzlich eine essentielle Funktion beim mitochondrialen Proteinimport erfüllen, ist Mdj1p an diesem Prozeß nicht beteiligt (Kang et al., 1990; Rowley et al., 1994; Horst et al., 1997).

Bei der Untersuchung einer Mutante, in der *MDJ1* deletiert war, wurde neben der Temperatursensitivität bei 37°C ein Wachstumsdefekt auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen festgestellt (Rowley et al., 1994). Als Ursache für die Unfähigkeit dieser Nullmutante, auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen zu wachsen, wurde der Verlust des mitochondrialen Genoms vermutet. Bisher konnte jedoch nicht gezeigt werden, warum die Deletion von *MDJ1* den Verlust des mitochondrialen Genoms zur Folge hat.

5. Zielsetzung dieser Arbeit

Anlaß für diese Arbeit war die Beobachtung, daß Mitochondrien in Abwesenheit von Mdj1p kein mitochondriales Genom aufweisen. Nachdem für die Komponenten des bakteriellen Hsp70-Systems in *E. coli* eine essentielle Funktion bei der Replikation der λ -Phagen-DNA beschrieben ist, sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob - in Analogie zur Rolle von DnaJ bei der Replikation der λ -Phagen-DNA in *E. coli* - Mdj1p an der Replikation der mitochondrialen DNA in *S. cerevisiae* beteiligt ist. Zwei verschiedene Szenarien sind vorstellbar: 1. Mdj1p spielt eine direkte Rolle bei der DNA-Replikation, indem es die Aktivität oder Funktionalität spezifischer an der DNA-Replikation beteiligter Faktoren reguliert oder 2. Mdj1p spielt eine indirekte Rolle bei der Vererbung der mitochondrialen DNA, indem es z.B. die Faltung einer oder mehrerer an der DNA-Replikation oder -Segregation beteiligten Komponenten fördert.

Durch die Isolierung von Suppressoren konditionaler *MDJ1*-Mutanten sollte versucht werden, potentielle Mdj1p-abhängige Faktoren zu identifizieren. Zu Beginn dieser Arbeit standen dafür vier verschiedene Hefestämme zur Verfügung, die aufgrund von Mutationen im *MDJ1*-Allel nur bei 24°C nicht jedoch bei 37°C zu respiratorischem Wachstum in der Lage waren (Westermann et al., 1996).

Weiterhin sollte untersucht werden, ob nicht-mitochondriale DnaJ-Proteine Mdj1p funktionell ersetzen können. Mit diesem Versuchsansatz könnten Aussagen über die funktionelle Spezifität von DnaJ-Proteinen gewonnen werden.

II. Materialien und Methoden

1. Material

1.1. Chemikalien

Acrylamid	Sigma (St. Louis, USA)
Adenin	Fluka (Buchs, CH)
Agar-Agar	Roth (Karlsruhe)
Agarose	ICN (Costa Mesa, USA)
Aminosäure-Kit	Sigma (St. Louis, USA)
APS	Roth (Karlsruhe)
Ampicillin	Sigma (St. Louis, USA)
Bacto [®] Peptone	Difco (Detroit, USA)
Bacto [®] Tryptone	Difco (Detroit, USA)
Bacto [®] Yeast Extract	Difco (Detroit, USA)
Bisbenzimid	Sigma (St. Louis, USA)
Brilliant Blue R	Sigma (St. Louis, USA)
Cäsiumchlorid	Sigma (St. Louis, USA)
Chloramphenicol	Fluka (Buchs, CH)
CTAB	ICN (Costa Mesa, USA)
Cycloheximid	ICN (Costa Mesa, USA)
DAPI	Sigma (St. Louis, USA)
DEPC	Sigma (St. Louis, USA)
DMSO	Sigma (St. Louis, USA)
DTT	AppliChem (Darmstadt)
EDTA	AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Sigma (St. Louis, USA)
Ficoll-400	Sigma (St. Louis, USA)
Formaldehyd	Fluka (Buchs, CH)
Formamid	Sigma (St. Louis, USA)
Harnstoff	Roth (Karlsruhe)
HEPES	AppliChem (Darmstadt)

L-Histidin	Fluka (Buchs, CH)
Imidazol	Fluka (Buchs, CH)
IPTG	AppliChem (Darmstadt)
Kanamycin	Fluka (Buchs, CH)
Lachs-Spermien-DNA	Sigma (St. Louis, USA)
L-Leucin	Fluka (Buchs, CH)
Magermilchpulver „Glücksklee“	Nestlé (Frankfurt)
L-Methionin	Sigma (St. Louis, USA)
N,N'-Methylenbisacrylamid	GibcoBRL (Eggenstein)
MES	Roth (Karlsruhe)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
Nickelsulfat	Fluka (Buchs, CH)
PEG	Fluka (Buchs, CH)
p-Phenylendiamin	Sigma (St. Louis, USA)
PMSF	Sigma (St. Louis, USA)
Polyvinylpyrrolidon	ICN (Costa Mesa, USA)
PonceauS	Fluka (Buchs, CH)
Raffinose	SERVA (Heidelberg)
Rotiphorese® Gel 30	Roth (Karlsruhe)
SDS	ICN (Costa Mesa, USA)
Sorbitol	Sigma (St. Louis, USA)
Sequagel™ XR	BIOzym (Hess. Oldendorf)
TCA	Sigma (St. Louis, USA)
TEMED	Roth (Karlsruhe)
Triphenyl-tetrazoliumchlorid	Sigma (St. Louis, USA)
Tris	Sigma (St. Louis, USA)
Triton X-100	Biometra (Göttingen)
Trypsin-Inhibitor aus Sojabohnen	Sigma (St. Louis, USA)
Tryptophan	Fluka (Buchs, CH)
Tween-20	Fluka (Buchs, CH)
Uracil	Fluka (Buchs, CH)
Xylencyanol	Roth (Karlsruhe)

Gängige Laborchemikalien sind nicht aufgeführt. Soweit nicht anders beschrieben, wurden alle Chemikalien mit dem Reinheitsgrad p.a. verwendet und bei den Firmen Roth (Karlsruhe) bzw. Sigma (St. Louis, USA) bezogen. Die verwendeten Radiochemikalien wurden von der Firma Pharmacia Amersham (Freiburg) bezogen.

1.2. Mikroorganismen

1.2.1. *Escherichia coli*

Tabelle 1: In dieser Arbeit verwendete *E. coli* - Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-blue	<i>recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac⁻, F'[proAB, lac^fZΔM15, Tn10, (tet^r)]</i>	Bullock, 1987

1.2.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Tabelle 2: In dieser Arbeit verwendete *S. cerevisiae* - Stämme

Stamm	Genotyp	Referenz
D237-10B	Wildtyp	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen
YBW16	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pBWM11 [<i>MDJ1, URA3, 2μ</i>]	Westermann et al., 1996
mdj1-4	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pMDJ315-4 [<i>mdj1-4, LEU2, CEN</i>]	Westermann et al., 1996
mdj1-5	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pMDJ315-5 [<i>mdj1-5 LEU2, CEN</i>]	Westermann et al., 1996
mdj1-6	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pMDJ315-6 [<i>mdj1-6, LEU2, CEN</i>]	Westermann et al., 1996
mdj1-7	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pBWM13-7 [<i>mdj1-7, TRP1, CEN</i>]	Westermann et al., 1996
YTL0	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i>	diese Arbeit
YTL1	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pMDJ315 [<i>MDJ1, LEU2, CEN</i>]	diese Arbeit
YTL3MMMDJ1	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMMMDJ1 [<i>MDJ1, URA3, 2μ</i>]	diese Arbeit
YTL3MSMDJ1	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSMDJ1 [<i>MDJ1, URA3, 2μ</i>]	diese Arbeit

YTL3MSDNAJ	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSDNAJ [DNAJ, URA3, 2μ]	diese Arbeit
YTL3MSSCJ1	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSSCJ1 [SCJ1, URA3, 2μ]	diese Arbeit
YTL3MSSIS1	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSSIS1 [SIS1, URA3, 2μ]	diese Arbeit
YTL3MSXDJ1	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSXDJ1 [XDJ1, URA3, 2μ]	diese Arbeit
YTL3MSYDJ1	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSYDJ1 [YDJ1, URA3, 2μ]	diese Arbeit
YTL3MSYDJ1 _S	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSYDJ1 _S [YDJC406S, URA3, 2μ]	diese Arbeit
YTL3MSM189	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSM189 [MDJ189, URA3, 2μ]	diese Arbeit
YTL3MSD108	<i>MATa, ade2, trp1, leu2, can1, his3, ura3, mdj1::HIS3</i> mit pYESMSD108 [DNAJ108, URA3, 2μ]	diese Arbeit

1.3. Primer und Plasmide

1.3.1. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer (Tabelle 3) wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) bezogen. Alle Primer waren HPSF-gereinigt. Sequenzierprimer waren an ihrem 5'-Ende mit dem Farbstoff IRD-41 modifiziert.

Tabelle 3: In dieser Arbeit verwendete Primer

<i>Mutageneseprimer:</i>	
bamf	(5'-CTG GGC CGT TAG TGC GAT CCG CCC GCT CC-3')
bamr	(5'-GGA GCG GGC GGA TCG CAC TAA CGG CCC AG-3')
189f	(5'-CGG TGG CGC AAG CAG ATA GTA ATC TAT GTT CAG AC-3')
189r	(5'-GTC TGA ACA TAG ATT ACT ATC TGC TTG CGC CAC CG-3')
108f	(5'-GGC GGA CGT GGT CGT TAA TAG GCG GCG CGC GGT GCT G-3')
108r	(5'-CAG CAC CGC GCG CCG CCT ATT AAC GAC CAC GTC CGC C-3')
ydjscf	(5'-CGA AGG TGT TCA ATG CGC ATC TCA ATG ATG AGC-3')
ydjscr	(5'-GCT CAT CAT TGA GAT GCG CAT TGA ACA CCT TCG-3')

PCR-Primer:

dnajf	(5'-CGC GGA TCC ATG GCT AAG CAA GAT-3')
dnajr	(5'-CGA ATT CCT ATT AGC GGG TCA GGT C-3')
mdjf	(5'-GAA GAT CTA ACG AAG CAT TCA AG-3')
mdjr	(5'-GCG AGC TCT ATT AAT TTT TTT TGT CAC C-3')
scjf	(5'-CGC GGA TCC CTA ATT TTG GCG CAG-3')
scjr	(5'-GCG AGC TCT ACT ACA ACT CAT CTT TG-3')
sisf	(5'-CGC GGA TCC ATG GTC AAG GAG ACA-3')
sisr	(5'-GCG AGC TCT ATT AAA AAT TTT CAT C-3')
xdjf	(5'-CGC GGA TCC ATG AGT GGC AGT GAT-3')
xdjr	(5'-GCG AGC TCA TCA TTG GAT ACA GCA G-3')
ydjf	(5'-CGC GGA TCC ATG GTT AAA GAA AC-3')
ydjrr	(5'-GCT CAT CAT TGA GAT GCG CAT TGA ACA CCT TCG-3')
regf	(5'-CGA ATA TTC CCG GGC TAC CTG CGT CAG ACA TTG-3')
regr	(5'-GCC ATA AGC TTG TTA TGT TTA GAG TAT GAT ATA GG-3')

Sequenzierprimer:

SP6-IRD	(5'-CGA TTT AGG TGA CAC TAT AG-3')
TLT7-IRD	(5'-CGA AAT TAA TAC GAC TCA C-3')

1.3.2. Plasmide

Neben den in dieser Arbeit konstruierten Plasmiden, die in Tabelle 4 aufgeführt sind, wurden folgende kommerziell erhältliche Vektoren verwendet: pGEM3 (Promega, Madison, USA) und pYES2.0 (Invitrogen, Groningen, NL).

Tabelle 4: In dieser Arbeit verwendete Plasmide

Plasmid	Klonierung	Referenz
pBWM24	1.3 kb- <i>EcoRI/BamHI</i> -Fragment mit <i>ori5</i> -Sequenz in pGEM4	Benedikt Westermann
pFF1003	<i>EcoRI</i> -Fragment mit <i>ori2</i> -Sequenz in pSK(+)	Francois Foury
pFF404	<i>EcoRI</i> -Fragment mit <i>ori3</i> -Sequenz in pSK(+)	Francois Foury
pFF590	<i>EcoRI</i> -Fragment mit <i>ori5</i> -Sequenz in pSK(+)	Francois Foury
pFF868	<i>EcoRI</i> -Fragment mit <i>COXI</i> -Sequenz in pSK(+)	Francois Foury
pFF932	<i>EcoRI</i> -Fragment mit <i>COXII</i> -Sequenz in pSK(+)	Francois Foury

pGEMSu9	<i>HindIII/BamHI</i> -Insert mit der kodierenden Sequenz für die Aminosäuren 1-69 der F ₀ -ATPase von <i>Neurospora crassa</i> in pGEM3	Benedikt Westermann
pGEMSu9MDJ1	PCR-Produkt von <i>MDJ1</i> amplifiziert mit den Primern mdjf/mdjr, kloniert in den mit <i>BamHI/SacI</i> geschnittenen Vektor pGEM3Su9	diese Arbeit
pGEMSu9DNAJ	PCR-Produkt von <i>DNAJ</i> amplifiziert mit den Primern dnajf/dnajr, kloniert in den mit <i>BamHI/EcoRI</i> geschnittenen Vektor pGEM3Su9	diese Arbeit
pGEMSu9SCJ1	PCR-Produkt von <i>SCJ1</i> amplifiziert mit den Primern scjf/scjr, kloniert in den mit <i>BamHI/SacI</i> geschnittenen Vektor pGEM3Su9	diese Arbeit
pGEMSu9SIS1	PCR-Produkt von <i>SIS1</i> amplifiziert mit den Primern sisf/sisr, kloniert in den mit <i>BamHI/SacI</i> geschnittenen Vektor pGEM3Su9	diese Arbeit
pGEMSu9XDJ1	PCR-Produkt von <i>XDJ1</i> amplifiziert mit den Primern xdjf/xdjr, kloniert in den mit <i>BamHI/SacI</i> geschnittenen Vektor pGEM3Su9	diese Arbeit
pGEMSu9YDJ1	PCR-Produkt von <i>YDJ1</i> amplifiziert mit den Primern ydjf/ydjr, kloniert in den mit <i>BamHI/SacI</i> geschnittenen Vektor pGEM3Su9	diese Arbeit
pMDJ1	<i>HindIII/SacI</i> -Insert mit <i>MDJ1</i> einschließlich der endogenen mitochondrialen Importsequenz in pGEM3	Rowley et al., 1994
pMDJ315	<i>HindIII/SacI</i> -Insert mit <i>MDJ1</i> einschließlich der regulatorischen Sequenzen in pRS315	Rowley et al., 1994
pMge(FY)	<i>NdeI/BamHI</i> -Insert mit <i>MGE1</i> in pET11a	Tanja Lisse, unveröffentlicht
	<i>HindIII/SacI</i> -Insert mit <i>MDJ1</i> einschließlich der regulatorischen Sequenzen aus pMDJ315 in pRS426	Westermann et al., 1996
pYESM	PCR-Produkt mit den regulatorischen Sequenzen von <i>MDJ1</i> amplifiziert mit den Primern regf/regr, kloniert in den mit <i>SspI/HindIII</i> geschnittenen Vektor pYES2.0	diese Arbeit (vgl. Abbildung 8)
pYESMS	<i>HindIII/SacI</i> -Insert mit der kodierenden Sequenz für Aminosäuren 1-69 von F ₀ -ATPase von <i>Neurospora crassa</i> aus pGEMSu9 in pYESM	diese Arbeit (vgl. Abbildung 9)
pYESMMMDJ1	<i>HindIII/SacI</i> -Insert aus pMDJ1 in pYESMS	diese Arbeit
pYESMSMDJ1	<i>HindIII/SacI</i> -Insert aus pGEMSu9MDJ1 in pYESMS	diese Arbeit
pYESMSDNAJ	<i>BamHI/EcoRI</i> -Insert aus pGEMSu9DNAJ in pYESMS	diese Arbeit

pYESMSSCJ1	<i>HindIII/SacI</i> -Insert aus pGEMSu9SCJ1 in pYESMS	diese Arbeit
pYESMSIS1	<i>BamHI/EcoRI</i> -Insert aus pGEMSu9SIS1 in pYESMS	diese Arbeit
pYESMSXDJ1	<i>BamHI/EcoRI</i> -Insert aus pGEMSu9XDJ1 in pYESMS	diese Arbeit
pYESMSYDJ1	<i>BamHI/EcoRI</i> -Insert aus pGEMSu9YDJ1 in pYESMS	diese Arbeit
pYESMSYDJ1 _s	Mutagenese von pYESMSYDJ1 mit ydjscf/ydjscr	diese Arbeit
pYESMSM189	Mutagenese von pYESMSMDJ1 mit den Primern 189f/189r	diese Arbeit
pYESMSD108	Mutagenese von pYESMSDNAJ mit den Primern 108f/108r	diese Arbeit

1.4. Puffer und Lösungen

Puffer und Lösungen sind in der Tabelle 5 aufgeführt und tragen einen Verweis auf das Kapitel im Methodenteil, in dem sie erstmals erwähnt werden.

Tabelle 5: Puffer und Lösungen

Für Elektrophoresen (vgl. II.2.2.9. und II.2.4.1.)	
TAE-Puffer	40 mM Tris/HAc, 1 mM EDTA, pH 8.0
10 x DNA-Auftragspuffer	50% (v/v) Glycerin, 0.25% Xylencyanol, 0.25% Bromphenolblau
FA-Puffer	20 mM MOPS, 250 mM Formaldehyd, 5 mM NaAc, 1 mM EDTA, pH 7.0
5 x RNA Auftragspuffer	20% (v/v) Glycerin, 30% (v/v) Formamid, 2.6% Formaldehyd, 80 mM MOPS, 20 mM NaAc, 10 mM EDTA, 0.25% Bromphenolblau, pH 8.0
TBE-Puffer	89 mM Tris-Base, 89 mM Borat, 2 mM EDTA, pH 7.8
4 x Trenngelpuffer	3 M Tris/HCl, pH 8.8, 4 g/l SDS
4 x Sammelgelpuffer	0.5 M Tris/HCl, pH 6.8, 4 g/l SDS
5 x SDS-Probenpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 8.0, 12% SDS, 40% (v/v) Glycerin, 0.6% Bromphenolblau, 5% β -Mercaptoethanol
Elektrodenpuffer	50 mM Tris-Base, 190 mM Glycin, 1 g/l SDS
Für Western-Blot (vgl. II.2.4.3. und II.2.4.4.)	
Transfer-Puffer	20 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol, 0.05% SDS
Ponceau-Färbelösung	0.2% PonceauS in 3% TCA
PBS	50 mM Natriumphosphat, 300 mM NaCl, pH 8.0
Blockier-Lösung	3% Magermilchpulver in PBS, 0.02% Tween-20

Für die Molekularbiologie (vgl. II.2.2.)

STET-Puffer	50 mM Tris/HCl, 8% Sucrose, 0.1% Triton X-100, 50 mM EDTA, pH 8.0
Lysepuffer I	2% Triton X-100, 1% SDS, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0
Lysepuffer II	50 mM Tris/HCl, 50 mM EDTA, 1% SDS, pH 8.0
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0
AE-Puffer	50 mM NAc, 10 mM EDTA, pH 5.3
Klenow-Puffer	20 mM Tris/HCl, 7 mM MgCl ₂ , pH 8.0

Für Southern- und Northern-Blot (vgl. II.2.2.13. und II.2.2.15.)

20 x SSC	3 M NaCl, 0.3 M Natriumcitrat
50 x Denhardt-Lösung	1% Ficoll, 10% Polyvinylpyrrolidon, 1% BSA
Hybridisierungslösung	5 x SSC, 5 x Denhardt's-Lösung, 100 µg/ml Lachs-Sperma-DNA

Für Arbeiten mit Mitochondrien (vgl. II.2.3.1. und II.2.3.3.)

Tris-DTT-Lösung	100 mM Tris/H ₂ SO ₄ , 10 mM DTT, pH 9.4
Puffer A	1.2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7.4
Puffer B	0.6 M Sorbitol, 20 mM MES/KOH, pH 6.0
Puffer C	0.6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7.4
Importpuffer	220 mM Saccharose, 3% BSA, 10 mM MOPS/KOH, 80 mM KCl, 25 mM KH ₂ PO ₄ , 5 mM MgAc ₂ , 5 mM DTT, 5 mM NADH, 3.3 mM ATP, 1 mM MnCl ₂ , pH 7.4
SMKCl	250 mM Saccharose, 10 mM MOPS/KOH, 80 mM KCl, pH 7.2
SEM	250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH, pH 7.2

Für Färbemethoden (vgl. II.2.3.5. und II.2.3.6.)

Puffer P	40 mM Kaliumphosphat, 0.5 mM MgCl ₂ , pH 6.5
Puffer F	40 mM Kaliumphosphat, 0.5 mM MgCl ₂ , 4% Formaldehyd, pH 6.5
Puffer PS	40 mM Kaliumphosphat, 0.5 mM MgCl ₂ , 1.2 M Sorbitol, pH 6.5
TTC-Agar	67 mM Natriumphosphat, 1.5% Agar, 0.1% TTC, pH 7.0

1.5. Enzyme und Proteine

Restriktionsenzyme wurden von der Firma Roche (Penzberg) oder New England Biolabs (Frankfurt/Main) bezogen und den Angaben der Hersteller folgend eingesetzt.

Tabelle 6: Enzyme und Proteine

Produkt	Hersteller
Anti-Kaninchen-Antikörper- POD-Konjugat	Sigma (St. Luis, USA)
BSA Fraktion V (fettsäurefrei)	Roche (Penzberg)
DNase	Roche (Penzberg)
Lysozym	Roche (Penzberg)
Klenow	Roche (Penzberg)
RNase	Roche (Penzberg)
Trypsin	Roche (Penzberg)

1.6. Nährmedien und Platten

Tabelle 7: Nährmedien

Für die Kultivierung von <i>E. coli</i> :	
LB	0.5% Bacto Yeast Extract, 1% Bacto Tryptone, 0.5% NaCl, pH 7.5
SOC	0.5% Bacto Yeast Extract, 2% Bacto Tryptone, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgSO ₄ , 10 mM MgCl ₂ , pH 7.5
Für die Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> :	
YP	1% Bacto Yeast Extract , 2% Bacto Pepton
YPD	YP mit 2% Glucose
YPG	YP mit 3% Glycerin
YNB	0.17% Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren, 0.5% Ammoniumsulfat
Laktat-Medium	0.3% Bacto Yeast Extract, 0.1% KH ₂ P0 ₄ , 0.1% NH ₄ Cl, 0.05% CaCl ₂ ·2H ₂ O, 0.05% NaCl, 0.06% MgSO ₄ ·H ₂ O, 3 mg/l FeCl ₃ , 2% (v/v) Milchsäure, pH 5.5

Medien wurden 20 min bei 121°C im Autoklaven sterilisiert. Für feste Nährböden wurde den entsprechenden Medien vor dem Autoklavieren 1.5% Agar zugesetzt. Zur Kultivierung der Mikroorganismen unter selektiven Bedingungen wurden die Medien mit den entsprechenden Nährstoffzusätzen und Antibiotika versetzt (Tabelle 8).

Tabelle 8: Antibiotika und Medienzusätze

Antibiotika und Medienzusätze	Stammlösung	Verwendung der Stammlösung	
		pro Platte (ca. 30 ml)	pro 1 l Medium
Ampicillin	100 mg/ml	30 µl	1 ml
Kanamycin	25 mg/ml	30 µl	1 ml
Adeninsulfat	2 mg/ml	200 µl	10 ml
Uracil	2 mg/ml	200 µl	10 ml
L-Leucin	10 mg/ml	100 µl	3 ml
L-Histidin HCl	10 mg/ml	100 µl	2 ml
L-Tryptophan	10 mg/ml	100 µl	2 ml

1.7. Geräte

Im Folgenden sind nur solche Geräte aufgeführt, deren Erwähnung im Rahmen dieser Arbeit wichtig erschien.

Tabelle 9: Geräte

Gerät	Typ	Hersteller
DNA-Sequenzierer	LI-COR 4000	MWG Biotech (Ebersberg)
Spektrophotometer	DU 7400	Beckmann (München)
Scintillationszähler	Tri-Carb-R	Packard (Meriden, USA)
Ultrazentrifuge	Optima XL-A	Beckmann (München)
Elektroporator	Gene Pulser® II	BioRad (München)
Fluoreszenzmikroskop	Axiovert 100S	Carl Zeiss (Göttingen)

1.8. Standards und Kits

Tabelle 10: Verwendete Standards und Kits

Kit	Verwendungszweck	Hersteller
SequiTherm EXCEL™ II	DNA-Sequenzierung	Biozym (Hessisch Oldendorf)
QIAquick® DNA Kit	Reinigung von DNA-Fragmenten	QIAGEN (Hilden)
QIAfilter® Plasmid Midi Kit	Plasmidpräparation	QIAGEN (Hilden)
QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit	ortsspezifische Mutagenese	Stratagene (Heidelberg)
<i>Nick Translation System</i>	Markierung von DNA-Sonden	GibcoBRL (Gaithersburg, USA)
Megaprime™	Markierung von DNA-Sonden	Amersham Pharmacia (Freiburg)
RiboMAX™	<i>in vitro</i> Transkription	Promega (Madison, USA)
Kaninchen Retikulozyten Lysat System	<i>in vitro</i> Translation	Promega (Madison, USA)
1 kb DNA-Ladder	Agarose-Gelelektrophorese	GibcoBRL (Gaithersburg, USA)
100 bp DNA-Ladder	Agarose-Gelelektrophorese	GibcoBRL (Gaithersburg, USA)
10 kD Protein Ladder	SDS-PAGE	GibcoBRL (Gaithersburg, USA)
Color Marker Wide Range	SDS-PAGE	Sigma (St.Louis, USA)
ECL™	Detektion von Antikörper-POD-Konjugaten	Amersham Pharmacia (Freiburg)

2. Methoden

2.1. Kultivierung von Mikroorganismen

2.1.1. Kultivierung von *Escherichia coli*

Bakterienstämme wurden auf festen Nährböden bei 4°C bis zu vier Wochen gelagert. Zur dauerhaften Konservierung wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 250 µl Glycerin versetzt und bei -70°C aufbewahrt. Einzelkolonien wurden durch Verdünnungsausstriche der Bakterien auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Zur Anzucht der Bakterien in Flüssigkultur wurde das Nähr-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und unter Schütteln (170 rpm) bei 37°C inkubiert. Plasmidtragende Stämme wurden in Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum kultiviert. Das Bakterienwachstum in Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt.

2.1.2. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Kultivierung von Hefestämmen erfolgte wie beschrieben (Rose et al., 1990; Guthrie und Fink, 1991). Dem Standard-Medium YP wurde je nach Verwendung 2% Glucose, 3% (v/v) Glycerin oder 3% Galactose zugesetzt. Zur Selektion auf Auxotrophie-Marker wurde Minimalmedium verwendet, daß den Selektionsbedingungen entsprechend supplementiert war. Je nach Anwendung waren in dem Minimalmedium als Kohlenstoffquelle 3% Glucose oder 3% Galactose enthalten. Für die Isolierung von Mitochondrien wurden die Zellen in Laktat-Medium (Guthrie und Fink, 1991) kultiviert. Wenn nicht anders erwähnt, erfolgte die Kultivierung bei 24°C, Flüssigkulturen wurden bei 170 rpm geschüttelt. Das Wachstum der Hefen in Flüssigkulturen wurde durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm verfolgt. Die Hefestämme wurden maximal zwei Monate auf Agar-Platten bei 4°C gelagert. Zur dauerhaften Konservierung wurde 1 ml einer Übernachtskultur mit 250 µl Glycerin versetzt und bei -70°C aufbewahrt.

2.2. Molekularbiologische Techniken

2.2.1. Ethanolfällung

Zur Fällung von DNA aus wässrigen Lösungen wurde die Probe mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat pH 4.8 und 2.5 Volumen Ethanol versetzt. Die Präzipitation kleiner DNA-Fragmente (< 500 bp) wurde durch eine 30-minütige Inkubation bei -20°C erreicht. Anschließend wurde die DNA durch Zentrifugation (15 min, 14'000×g, RT) sedimentiert.

2.2.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Plasmidisolierung I (Quick-Prep)

Zur schnellen Analyse von rekombinanten Plasmiden wurden 100 µl einer Übernachtskultur mit 50 µl eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) und 15 µl 10 × DNA-Auftragspuffer versetzt, 10 sec gevortext und 2 min bei 12'000×g zentrifugiert. Von der wässrigen Phase wurden 25 µl zur Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen.

Plasmidisolierung I (CTAB-Prep)

Bakterienzellen aus 1.5 ml Übernachtskultur wurden in 200 µl STET-Puffer resuspendiert und mit 1 µl RNaseA (10 mg/ml) versetzt. Durch Zugabe von 20 µl Lysozym (10 mg/ml) wurden die Zellen 5 min bei RT lysiert. Zelltrümmer und genomische DNA wurden durch einen Hitzeschritt (45 sec, 95°C) und anschließender Zentrifugation (5 min, 12'000×g, RT) abgetrennt. Aus dem Überstand wurden die Nukleinsäuren nach Zugabe von 8 µl CTAB (50 mg/ml) und Zentrifugation (5 min, 12'000×g, RT) präzipitiert. Das Pellet wurde unter Hochsalzbedingungen in 300 µl 1.2 M NaCl resuspendiert bevor die Plasmid-DNA mit Ethanol gefällt, 70% (v/v) Ethanol gewaschen, an der Luft getrocknet und in 50 µl Wasser aufgenommen wurde. Mit dieser Methode wurden 1 bis 5 µg Plasmid-DNA gewonnen, die sowohl zur Spaltung mit Restriktionsendonukleasen als auch zur Transformation eingesetzt wurden.

Plasmidisolierung III (Midi-Prep, QIAGEN)

Um größere Mengen Plasmid-DNA hoher Reinheit zu gewinnen, wurde die DNA unter Verwendung des QIAfilter® Plasmid Midi Kits nach den Angaben des Herstellers isoliert. Die mit dieser Methode isolierte DNA wurde für die DNA-Sequenzierung und Klonierungen verwendet.

2.2.3. Isolierung von DNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Isolierung von Gesamtzell-DNA

Aus 10 ml einer Übernachtskultur wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4'000×g, RT) geerntet und in 0.5 ml Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 µl Lysepuffer I in einem 1.5 ml Zentrifugenröhrchen resuspendiert. In Anwesenheit von 200 µl eines Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Gemisches (24:25:1) und 300 mg Glaskugeln (0.45 mm Durchmesser) wurden die Zellen 3 min in einer Schlagmühle bei 70% Schüttelfrequenz aufgeschlossen. Anschließend wurde nach Zugabe von 200 µl TE-Puffer durch Zentrifugation (5 min, 12'000×g, RT) die Phasentrennung erreicht. Aus der wässrigen Phase wurde die DNA durch Zugabe von Ethanol präzipitiert und das Pellet in 400 µl TE-Puffer resuspendiert. Anschließend wurde mit 3 µl RNaseA (10 mg/ml) 5 min bei 37°C inkubiert und abermals mittels Ethanol gefällt. Die so erhaltene DNA wurde in TE-Puffer aufgenommen und für PCR- und Southern-Blot-Analysen eingesetzt.

Isolierung von mitochondrialer DNA

Aus 500 ml einer Übernachtskultur wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4'000×g, RT) geerntet und in 40 ml 100 mM NaCl gewaschen. Das Zellpellet wurde in 20 ml 1M Sorbitol aufgenommen und mit 2.5 mg/g Zellfeuchtgewicht Zymolyase 20T 1 h bei 30°C inkubiert. Die entstandenen Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (3 min, 3'000×g, RT) und in 50 ml Lysepuffer II 30 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurden 25 ml 5 M Kaliumacetat zugesetzt. Diese Suspension wurde 30 min auf Eis inkubiert, bevor durch Zentrifugation (10 min, 9'000×g, 4°C) die Zelltrümmer abgetrennt wurden. Nach Zugabe von 75 ml Isopropanol und erneuter Zentrifugation (30 min, 15'000×g, 4°C) wurde die DNA präzipitiert und das Pellet in 5 ml TE-Puffer aufgenommen. Pro 1 ml DNA-Lösung wurden 1.16 g Cäsiumchlorid und 24 µl Bisbenzimid (10 mg/ml) zugegeben. Diese Mischung wurde in Quick-Seal®-Zentrifugenbecher überführt und 16 h bei 20°C zentrifugiert (60'000 rpm, Ti70 Rotor, RT). Durch Anregung mit UV-Licht konnte die mit Bisbenzimid angefärbte DNA sichtbar gemacht werden. Da die mitochondriale DNA einen höheren A/T-Gehalt als genomische DNA aufweist, reichert sie sich im CsCl-Gradienten in der oberen der beiden sichtbaren Banden an. Nach Abtrennung dieser Bande wurde das Bisbenzimid durch fünfmalige Extraktion mit jeweils einem Volumen CsCl-gesättigtem Isopropanol entfernt und die DNA durch zweimalige Ethanol fällung isoliert. Die so erhaltene DNA wurde zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 200 µl Wasser resuspendiert.

2.2.4. Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration von DNA-Proben wurde entweder anhand von mittels Ethidiumbromid angefärbten Agarosegelen abgeschätzt oder durch Messung der Absorption bei 260 nm spektroskopisch bestimmt. Eine OD_{260} von 1.0 in einer 1 cm-Küvette entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 33 µg/ml einzelsträngiger DNA.

2.2.5. Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen wurden gemäß den Angaben der Hersteller in den entsprechenden mitgelieferten Puffern verwendet. In einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden pro 1 µg Plasmid-DNA 1 bis 3 U Enzym eingesetzt und der Reaktionsansatz 1 h bei entsprechender Temperatur inkubiert. Genomische DNA und PCR-Produkte wurden 14 h verdaut.

2.2.6. Modifikation von DNA mit Klenow-Fragment

Das Auffüllen von überhängenden DNA-Enden wurde durch Behandlung mit Klenow-Fragment erreicht. Je nachdem, ob die 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität oder die 3'-5'-Exonukleaseaktivität genutzt werden sollte, wurden 1 - 5 µg DNA mit bzw. ohne Desoxyribonukleotide (je 25 µM dATP, dCTP, dGTP und dTTP) in 20 µl Klenow-Puffer 30 min bei 37°C inkubiert.

2.2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die hier eingesetzte *Pfu*-DNA-Polymerase ist eine thermostabile DNA-abhängige DNA-Polymerase, die neben der 5'-3'-DNA-Polymeraseaktivität eine 3'-5'-Exonukleaseaktivität besitzt und somit in der Lage ist, fehlerhaft eingebaute Nukleotide zu korrigieren. Mit der *Pfu*-DNA-Polymerase können deshalb auch sehr lange DNA-Fragmente (bis zu 20 kb) nahezu fehlerfrei amplifiziert werden. Reaktionen wurden nach dem vom Hersteller vorgeschlagenen Protokoll angesetzt. In einem Reaktionsvolumen von 100 µl waren je 0.2 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP, je 250 ng von beiden Primern, 10 ng Plasmid-DNA aus *E. coli* bzw. 100 ng genomische DNA aus *S. cerevisiae*, 10 µl 10 x Reaktionspuffer und 5 U *Pfu*-DNA-

Polymerase enthalten. Der Reaktionsansatz wurde mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet. Die Reaktionsbedingungen, unter denen die DNA-Amplifikation durchgeführt wurde, sind in Tabelle 11 aufgeführt.

Tabelle 11: Reaktionsbedingungen bei der Polymerase-Kettenreaktion

Segment	Anzahl der Zyklen	Reaktionsschritt	Zeit	Temperatur
I	1	Denaturierung	45 sec	96°C
II	30	Denaturierung	45 sec	94°C
		Primer-Anlagerung	45 sec	35°C – 55°C
		Synthese	2 min/kb	72°C
III	1	Endsynthese	10 min	72°C

2.2.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationsreaktionen wurden mit 30 fmol Plasmid-DNA, 90 fmol Fragment-DNA und 1 U T4-DNA-Ligase in dem vom Hersteller mitgelieferten Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl angesetzt. Die Inkubationstemperatur betrug 16°C, die Dauer der Reaktion ca. 16 h. Für die Transformation von *E. coli*-Zellen wurden 2 µl des Ligationsansatzes eingesetzt.

2.2.9. Agarose-Gelelektrophorese

Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Molekülen

Für die elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten mittels horizontaler Gelelektrophorese wurden die Proben mit 1/10 Volumen 10 x DNA-Auftragspuffer versetzt und bei konstanter Spannung von 8 mV/cm in 0.8%igen bis 2%igen Agarosegelen aufgetrennt. Agarosegele wurden mit TAE-Puffer hergestellt, der gleichzeitig als Laufpuffer verwendet wurde. Um die DNA unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurden die Gele 15 min in Ethidiumbromid-Lösung (1 µg/ml) gefärbt.

Elektrophoretische Auftrennung von RNA-Molekülen

RNA-Moleküle wurden unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Dazu wurden Gele mit 1.2% Agarose in Puffer FA hergestellt, die 1 µg/ml Ethidiumbromid enthielten. Die RNA wurde mit 1/5 ihres Volumen 5 x RNA-Auftragspuffer versetzt und 5 min auf 65°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 8 mV/cm in Puffer FA.

2.2.10. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel ausgeschnitten und unter Verwendung von QIAquick® aufgereinigt.

2.2.11. Ortsspezifische Mutagenese von Plasmid-DNA

Zur ortsspezifischen Mutagenese von Plasmid-DNA wurde entweder QuikChange™ - den Angaben des Herstellers folgend - verwendet oder nach der Methode von Picard verfahren (Picard et al., 1994). Die Sequenzen der Mutageneseprimer wurden so entworfen, daß nach Möglichkeit die Mutationen durch Restriktionsanalyse identifiziert werden konnten.

2.2.12. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Die Sequenzierung von Plasmid-DNA erfolgte nach der Kettenabbruchmethode (Sanger et al., 1977). Fluoreszenzmarkierte Abbruchfragmente wurden mittels *cycle sequencing* unter Verwendung des SequiTherm EXCEL™ II – Kits in Anwesenheit von Didesoxynukleotiden und 5'-fluoreszenzmarkierten Sequenzierprimern erhalten. Die Detektion der DNA-Fragmente erfolgte mit Hilfe eines halbautomatischen DNA-Sequenzierers.

2.2.13. Southern-Blot

Für den Verdau durch Restriktionsendonukleasen (vgl. II.2.2.5) wurden 5 bis 10 µg genomische Hefe-DNA oder 50 ng Plasmid-DNA eingesetzt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden durch Elektrophorese in einem Agarosegel aufgetrennt (vgl. II.2.2.9). Das

Agarosegel wurde 15 min in 250 mM HCl depurinisiert, 20 min in 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH denaturiert und abschließend 30 min in 1.5 M NaCl, 1 M Tris/HCl, pH 7.5 neutralisiert. Die DNA wurde 90 min mit einem Vakuum-Blotter auf eine Nylon-Membran übertragen. Als Transferpuffer wurde 10 x SSC verwendet. Die Membran wurde getrocknet und beidseitig jeweils 2 min mit UV-Licht bestrahlt, um die DNA kovalent an die Membran zu koppeln.

Die Synthese der Hybridisierungs-Sonden erfolgte je nach Länge der Sonde entweder mit Megaprime™ oder mit dem *Nick Translation System* nach Vorschrift der Hersteller. Die Sonden wurden durch den Einbau von [α -³²P]dATP radioaktiv markiert. Nach Abtrennung nicht-inkorporierter Nukleotide aus dem Reaktionsansatz mit Hilfe von QIAquick® wurde die spezifische Aktivität der Sonde im Szintillationszähler ermittelt.

Die Hybridisierung der radioaktiv markierten Sonden an die membrangebundene DNA erfolgte in einem Hybridisierungssofen. Dazu wurde die Membran in einer Hybridisierflasche mit 0.2 ml/cm² Hybridisierungslösung 1 h bei 65°C vorinkubiert. Währenddessen wurde die Sonde 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Für die Hybridisierung wurde die Sonde zu der vorinkubierten Hybridisierungslösung gegeben, so daß 1 ml 2.5 x 10⁶ cpm enthielt. Nach 12 h wurde die Membran bei 65°C jeweils 15 min einmal in 1 x SSC/0.1% SDS und zweimal in 0.5 x SSC/0.1% SDS gewaschen und dann für die Autoradiographie eingesetzt.

2.2.14. Isolierung von RNA aus *Saccharomyces cerevisiae*

Zellen aus 10 ml einer Übernachtskultur wurden durch Zentrifugation (10 min, 4'000×g, RT) geerntet, in 400 µl Puffer AE resuspendiert, mit 40 µl 10% SDS versetzt und 10 sec gevortext. Nach Zugabe von 500 µl in Puffer AE äquilibriertem Phenol wurde erneut 10 sec gevortext und 4 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde die Suspension in einer Trockeneis/Ethanol-Mischung abgekühlt, bis Phenolkristalle sichtbar wurden. Die wässrige Phase wurde nach Zentrifugation (2 min, 12'000×g, RT) abgetrennt und mit Phenol/Chloroform (1:1) 5 min bei RT extrahiert. Zu der wässrigen Phase wurden 40 µl 3 M Natriumacetat pH 5.3 gegeben und die RNA durch Zugabe von 1 ml Ethanol und Zentrifugation (30 min, 12'000×g, RT) präzipitiert. Das RNA-Pellet wurde mit 1 ml 80% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl Wasser aufgenommen.

2.2.15. Northern-Blot

Gesamtzell-RNA aus Hefe wurde in einem denaturierenden Agarosegel (vgl. II.2.2.9) aufgetrennt und mit einem Vakuumblotter auf eine Nylon-Membran übertragen. Die Membran wurde getrocknet und beidseitig jeweils 2 min mit UV-Licht bestrahlt, um die RNA kovalent an die Membran zu koppeln. Die Synthese der Sonde und die Hybridisierung der Membran erfolgte wie unter 2.2.13 beschrieben.

2.2.16. Transformation von Mikroorganismen mit rekombinanter DNA

Transformation von E. coli mit Plasmid-DNA

E. coli Stämme wurden mit Hilfe eines Elektroporators transformiert. Zur Vorbereitung der Zellen für die Elektroporation wurden 400 ml LB-Medium mit einer Übernachtskultur des entsprechenden Stammes angeimpft. Die Bakterienkultur wurde bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0.4 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation (10 min, 4'000×g, 4°C) geerntet. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Nacheinander wurden die Zellen in 400 ml, 200 ml und 40 ml 10% (v/v) Glycerin gewaschen und letztlich in 400 µl 10% (v/v) Glycerin aufgenommen. Die Zellen wurden zu je 40 µl aliquotiert und bis zu ihrer Verwendung bei -70°C gelagert.

Für die Elektroporation wurden 40 µl elektrokompetente Bakterienzellen mit 1 bis 10 ng Plasmid-DNA in einer eisgekühlten Transformationsküvette (0.2 mm) bei 2.5 kV, 25 µF und 200 Ω gepulst. Die Zellen wurden in 1 ml SOC-Medium aufgenommen und 30 min bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen zur Selektion auf einer LB-Platte mit den entsprechenden Antibiotika ausplattiert und bei 37°C 16 h inkubiert.

Transformation von Saccharomyces cerevisiae

Hefezellen wurden mit Hilfe eines Elektroporations-Instruments transformiert. Zur Vorbereitung von Hefezellen für die Elektroporation wurden 400 ml SD-Medium von einer Vorkultur des entsprechenden Stammes angeimpft und die Zellen bei 24°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1.4 kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4'000×g, 4°C) geerntet. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Zellen wurden zweimal in 400 ml sterilem Wasser und einmal in 40 ml 1 M Sorbitol gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 400 µl 1 M Sorbitol aufgenommen. Zu 40 µl dieser

Zellsuspension wurden 100 bis 200 ng Plasmid-DNA gegeben, die in einer eisgekühlten Transformationsküvette (0.2 mm) bei 1.5 kV, 25 μ F und 200 Ω gepulst wurden. Die Zellen wurden in 1 ml 1 M Sorbitol aufgenommen, sofort auf einer SD-Platte mit den entsprechenden Nährstoffen zur Selektion ausplattiert und bei 24°C vier Tage inkubiert.

2.3. Methoden der Zellbiologie

2.3.1. Isolierung von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae* erfolgte im Wesentlichen wie beschrieben (Daum et al., 1982). Die Anzucht der Zellen des Hefestammes D273-10B erfolgte in Laktat-Medium bei 30°C. Die Anzucht von plasmidhaltigen Zellen unter Selektionsdruck erfolgte in YNB-Medium mit 3% Glucose und 1% Casaminosäuren bei 24°C. Die Zellen wurden bei einer OD₆₀₀ von 1.0 bis 1.5 durch Zentrifugation (5 min, 2'000 \times g, RT) geerntet, in Wasser gewaschen und das Zellfeuchtgewicht bestimmt. Alle folgenden Mengenangaben sind auf 1 g Zellfeuchtgewicht bezogen. Das Zellpellet wurde in 10 ml Tris-DTT-Lösung resuspendiert und 15 min bei 30°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 2'000 \times g, RT) wurden die Zellen in 10 ml Puffer A gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in 2 ml Puffer A mit 1.25 mg/ml Zymolyase 20T resuspendiert und bei 30°C ca. 45 min inkubiert. Die Zymolyase-Behandlung war ausreichend, wenn bei Zugabe von 20 μ l Zellsuspension in 1 ml Wasser eine klare Lösung beobachtet werden konnte. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis und mit vorgekühlten Geräten durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden abzentrifugiert (5 min, 4'000 \times g, 2°C), zweimal in 10 ml Puffer A gewaschen und in 5 ml Puffer B resuspendiert. Durch 15 Stöße in einem Dounce-Homogenisator wurden die Sphäroplasten aufgebrochen. Anschließend wurde die erhaltene Suspension zentrifugiert (5 min, 1'500 \times g, 2°C), der Überstand abgetrennt und auf Eis gelagert. Das Pellet wurde wie oben beschrieben erneut resuspendiert, homogenisiert und die erhaltene Suspension zentrifugiert. Beide Überstände wurden vereinigt und die Mitochondrien durch Zentrifugation (10 min, 12'000 \times g, 2°C) gesammelt. Das Pellet wurde in 0.5 ml Puffer C resuspendiert, die Proteinkonzentration bestimmt (vgl II.2.4.6) und mit 10 mg/ml fettsäurefreiem BSA versetzt. Die Mitochondrien wurden zu je 20 μ l aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.2. Synthese mitochondrialer Vorläuferproteine *in vitro*

In vitro Transkription

Für die *in vitro* Transkription wurde RiboMAX™ nach Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden Plasmide der pGEM-Reihe verwendet, die die kodierende Sequenz für das entsprechende Vorstufenprotein unter der Kontrolle eines SP6-Promotors enthielten. Die Plasmid-DNA wurde in linearisierter Form eingesetzt. In 20 µl Reaktionspuffer waren je 20 mM von ATP, CTP, GTP und UTP, 1 µg der linearisierten DNA und 2 µl SP6-Enzym-Mix enthalten. Dieser Ansatz wurde 4 h bei 37°C inkubiert und anschließend mit 40 U RNasin versetzt.

In vitro Translation

Für die Synthese von radioaktiv markierten Vorläuferproteinen wurde Kaninchen Retikulozyten Lysat der Firma Promega verwendet. In einem Gesamtvolumen von 25 µl wurden 5 µl Transkriptionsansatz (vgl. *in vitro* Transkription), 2 µl Aminosäure-Mix (2 mg/ml von jeder Aminosäure außer Methionin), 2 µl ³⁵S-Methionin (10 mCi/ml) und 10 µl Kaninchen Retikulozyten Lysat vermischt. Der Ansatz wurde 2 h bei 30°C inkubiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

2.3.3. Import von *in vitro* synthetisierten Vorläuferproteinen in Mitochondrien

Für ein Import-Experiment, bei dem der Import von *in vitro* synthetisierten Vorläuferproteinen in Mitochondrien beobachtet werden sollte, wurden parallel zwei Reaktionen angesetzt, wobei zu einer der beiden Reaktionen 2 µM Valinomycin gegeben wurde. In einem Reaktionsansatz von 120 µl wurden 60 µl 2 x Import-Puffer mit 100 µg Mitochondrien vermischt. Nach 5 min Vorinkubation bei 25°C wurden 1 bis 10 µl ³⁵S-markiertes Protein (vgl. II.2.3.2) zugesetzt und der gesamte Reaktionsansatz 20 min bei 25°C inkubiert. Nach Zugabe von 400 µl eiskaltem SMKCl-Puffer wurde der Reaktionsansatz halbiert. Eine Hälfte wurde mit 5 µl Trypsin (50 mg/ml) versetzt, die andere Hälfte blieb unbehandelt. Nach 20 min Inkubation auf Eis wurden alle Proben mit 25 µl Trypsin-Inhibitor aus Soyabohnen (10 mg/ml) versetzt, zentrifugiert (15 min, 12'000×g, 4°C), das Pellet zweimal mit 300 µl SEM-Puffer gewaschen und in 25 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen.

2.3.4. Markierung von mitochondrialen Translationsprodukten *in vivo*

Zur Visualisierung von mitochondrial translatierten Proteine wurde nach dem Protokoll von Douglas und Butow verfahren (Douglas und Butow et al., 1976). Eine Vorkultur in Minimalmedium mit 2% Galactose und 1% Casaminosäuren wurde in 10 ml Minimalmedium mit 2% Galactose (ohne Casaminosäuren) bis zu einer OD_{600} von 0.1 verdünnt und 12 h bei 24°C unter Schütteln kultiviert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (10 min, 4'000×g, RT) geerntet, mit Wasser gewaschen und die OD_{600} auf 2.0 eingestellt. 250 µl dieser Suspension wurden in Anwesenheit von 5 µl Cycloheximid (7.5 mg/ml) 1 min bei 24°C oder 37°C vorinkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz mit 8 µl eines Aminosäure-Mix (2 mg/ml von jeder Aminosäure außer Methionin) und 2 µl ^{35}S -Methionin (10 mCi/ml) versetzt und 15 min bei 24°C oder 37°C unter Schütteln inkubiert. Nach weiteren 10 min Inkubation in Anwesenheit von 10 µl Stop-Mix (12 mg/ml Chloramphenicol, 0.1 M L-Methionin) wurden die Zellen durch Zugabe von 50 µl 2 M NaOH, die 1% (v/v) β -Mercaptoethanol enthielt, 10 min auf Eis lysiert. Anschließend wurden 220 µl 72% TCA zugesetzt und nach 30 min Inkubation auf Eis die Proteine durch Zentrifugation (30 min, 12'000×g, 4°C) abgetrennt. Das Pellet wurde mit 250 µl eiskaltem 80% (v/v) Aceton und anschließend mit 250 µl reinem Aceton gewaschen, getrocknet und in 25 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Auftrennung der Proteine erfolgte in einem 16%igen SDS-Polyacrylamidgel (vgl. II.2.4.1) unter Verwendung einer Acrylamidlösung mit einem Verhältnis von Acrylamid zu Bisacrylamid von 150:1.

2.3.5. DAPI-Färbung

Die Anfärbung von DNA in Hefezellen mit DAPI erfolgte nach der Vorschrift von Azpiroz und Butow (Azpiroz und Butow et al., 1993). Zellen aus 1 ml Kulturvolumen wurden bei einer OD_{600} von 1.0 durch Zentrifugation (10 min, 4'000×g, RT) geerntet und 1 h bei 30°C in 750 µl Puffer F fixiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit je 500 µl Puffer P und einmal in 500 µl Puffer PS gewaschen. Zur Umwandlung in Sphäroplasten wurden die Zellen in 500 µl Puffer PS mit 2 mg/ml Zymolyase 20T aufgenommen und 30 min bei 30°C inkubiert. Die Sphäroplasten wurden dreimal in Puffer PS gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde überschüssiger Puffer abgegossen und das Pellet in der verbleibenden Flüssigkeit resuspendiert. 10 µl dieser Suspension wurden auf einen Objektträger aufgetragen, nach 10 bis 15 sec wurde überschüssige Flüssigkeit abgesaugt und die anhaftenden Zellen einmal mit PBS gewaschen. Die Anfärbung erfolgte durch 5-minütige Inkubation mit 1 µg/ml DAPI in

Puffer P. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit je 20 µl PBS und einmal mit 20 µl Puffer P gewaschen, getrocknet und nach Überschichtung mit 4 µl 0.1% p-Phenylendiamin in 90% (v/v) Glycerin mit einem Deckgläschen versiegelt. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

2.3.6. Tetrazolium-Färbung

Für die Anfärbung respiratorisch aktiver Hefezellen mit TTC wurden Zellen in YNB-Medium mit 3% Glucose und 1% Casaminsäuren 16 h vorkultiviert. Eine Kultur mit einer OD_{600} von 1.0 wurde 1 : 100'000 verdünnt. Von dieser Verdünnung wurden 100 µl auf einer YPD-Platte ausplattiert, auf der nach drei Tagen Inkubation bei 24°C Einzelkolonien sichtbar wurden. Auf diese Weise wurden YPD-Platten mit ca. 200 Einzelkolonien erhalten, die mit 20 ml TTC-Agar, der vorher auf 42°C temperiert wurde, überschichtet wurden. Nach 2 bis 3 h konnten respiratorisch aktive Zellen an ihrer roten Färbung erkannt und quantifiziert werden (Ogur et al., 1957).

2.4. Proteinchemische Methoden

2.4.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach (Laemmli, 1970) angewendet. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Elektrophoresekammern. Sammelgele enthielten immer 5% Acrylamid. Für Trenngele wurde je nach Anwendung 10% bis 18% Acrylamid eingesetzt. In Tabelle 12 sind Vorschriften für ein 5%iges Sammelgel und ein 15%iges Trenngel aufgeführt. Proteinproben wurden mit 1/5 ihres Volumens 5 x SDS-Probenpuffer versetzt und wenn nicht anders beschrieben 5 min bei 95°C inkubiert.

Tabelle 12: Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

10 ml Sammelgel (5%)	
Rotiphorese® Gel 30	1.7 ml
Sammelgelpuffer	2.5 ml
Wasser	5.8 ml
TEMED	20 µl
10% APS	50 µl
30 ml Trenngel (15%)	
Rotiphorese® Gel 30	15 ml
Trenngelpuffer	7.5 ml
Wasser	7.5 ml
TEMED	20 µl
10% APS	150 µl

2.4.2. Coomassie-Färbung

SDS-Polyacrylamid-Gele wurden zur Visualisierung der Proteine mit Coomassie-Färbelösung (30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0.1% Coomassie-Briliant-Blue R 250) 30 min unter leichtem Schwenken gefärbt. Anschließend wurde ungebundener Farbstoff mit Entfärbelösung (30% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Essigsäure) ausgewaschen.

2.4.3. Western-Blot

Die durch SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennte Proteine wurden wie von Towbin beschrieben auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen (Towbin et al., 1979). Nitrocellulose-Membran, Gel und Filterpapier wurden in Transfer-Puffer getränkt und als Stapel aus drei Lagen Filterpapier, Nitrocellulose-Membran, Gel und drei weiteren Lagen Filterpapier blasenfrei zwischen die beiden Elektroden einer *Semi-Dry-Blotting* Apparatur gelegt. Der Transfer der Proteine auf die Nitrocellulose-Membran erfolgte mit 0.8 mA/cm^2 innerhalb von 2 h. Die Membran wurde nach Anfärbung mit PonceauS-Färbelösung zur Immunodekoration oder Autoradiographie eingesetzt.

2.4.4. Immunologischer Nachweis immobilisierter Proteine auf Nitrocellulose-Membranen

Nitrocellulose-Membranen mit immobilisierten Proteinen (vgl II.2.4.3) wurden 30 min mit Blockier-Lösung abgesättigt. Die Immundekoration einzelner Proteine erfolgte durch eine 90-minütige Inkubation mit spezifischen Antisera, die 1:500 bis 1:2000 in Blockier-Lösung verdünnt waren. Anschließend wurde die Membran dreimal 10 min mit Blockier-Lösung gewaschen und 60 min mit sekundärem Antikörper (Anti-Kaninchen-Peroxidasekonjugat) in Blockier-Lösung 1:2000 verdünnt, inkubiert. Nach erneutem Waschen in Blockier-Lösung erfolgte der Nachweis der Proteine durch Chemilumineszenz mit ECL™.

2.4.5. Autoradiographie

Getrocknete Nitrocellulose-Membranen mit radioaktiv markierten Proteinen (vgl II.2.4.3) wurden zur Exposition direkt auf Röntgenfilmen (Kodak BioMax MR) exponiert. Nylonmembranen aus Southern-Blot- und Northern-Blot-Experimenten wurden feucht, in Folie eingeschlagen, auf Röntgenfilmen (Kodak BioMax MS) exponiert.

2.4.6. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Eine schnelle Methode zur Quantifizierung der Proteinkonzentration einer Probe ist die Methode nach Bradford (Bradford, 1976). Dazu wurden 20 µl einer Proteinlösung mit 980 µl Färbereagenz der Firma BioRad vermischt und nach 2 min die Absorption bei 595 nm bestimmt. Mit Hilfe einer Eichkurve, die mit BSA in einem Konzentrationsbereich von 0.1 mg/ml bis 1 mg/ml aufgenommen wurde, erfolgte die Abschätzung der Proteinkonzentration.

III. Ergebnisse und Diskussion

1. Suche nach Suppressoren in konditionalen *MDJ1*-Mutanten

Bei der Vervielfältigung und Vererbung von Genomen treten in allen Organismen spontan Mutationsereignisse auf, die eine entscheidende Grundlage der Evolution darstellen. Spontane Mutationen sind vor allem bei Mikroorganismen mit kurzen Generationszeiten, wie z.B. Bakterien oder Hefen, gut zu beobachten. Diese Mutationen spielen eine entscheidende Rolle bei der Adaptation von Organismen an veränderte Umweltbedingungen und können in genetischen Versuchsansätzen gezielt genutzt werden. Ein durch eine Mutationen verursachter Phänotyp lässt häufig eine erste Hypothese über die Funktion des von der Mutation betroffenen Genproduktes zu.

Da sich jedoch hinter einem bestimmten phänotypischen Erscheinungsbild einer Mutante komplexe biochemische Prozesse verbergen, lassen sich daraus oft keine endgültigen Aussagen über die detaillierte Funktion eines betrachteten Genproduktes treffen. Einen etwas genaueren Einblick erlaubt ein experimenteller Ansatz, bei dem bekannte Mutationen in einem Allel A durch das Auftreten neuer Mutationen in einem zweiten Allel kompensiert werden. Durch die Identifizierung dieser als Suppressoren bezeichneten Mutationen werden Hinweise über Wechselwirkungen und Funktionsbeziehungen zwischen dem Suppressorallel und dem betrachteten Allel A erhalten.

In der hier vorliegenden Arbeit sollte dieser Versuchsansatz genutzt werden, um die Rolle des mitochondrialen DnaJ-Proteins, Mdj1p, bei der Vermittlung respiratorischer Aktivität und bei der Aufrechterhaltung eines funktionellen mitochondrialen Genoms zu analysieren. Mögliche Suppressormutanten könnten Wechselwirkungspartner oder spezifische Substrate sein, deren genaue Charakterisierung Einblicke in die Funktion von Mdj1p geben sollte.

Aus früheren Arbeiten standen bereits vier konditionale *MDJ1*-Mutanten zur Verfügung, die einzelne charakterisierte Punktmutationen bzw. größere deletierte Bereiche innerhalb der N-terminalen J-Domäne, dem G/F-Linker, dem Cystein-Motiv oder innerhalb des weniger konservierten C-terminalen Bereiches von Mdj1p aufwiesen (vgl. Abbildung 5) (Westermann et al., 1996).

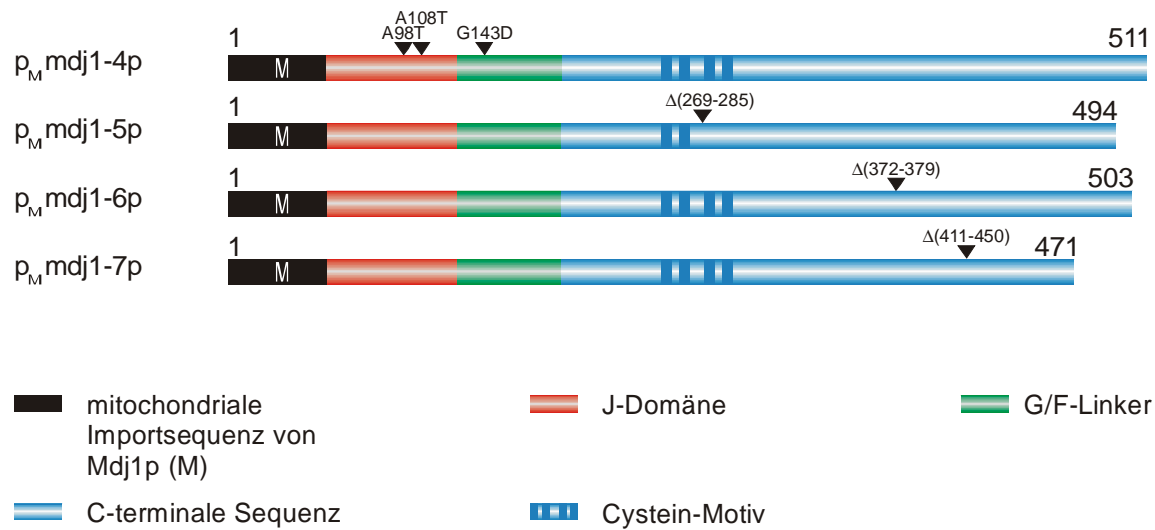


Abbildung 5: Schematische Darstellung temperatursensitiver *MDJ1*-Mutanten.

Die verschiedenen Mutanten zeichnen sich durch unterschiedlich stark ausgeprägte temperatursensitive Phänotypen aus, die in Anlehnung an Westermann et al., in Tabelle 13 beschrieben sind (Westermann et al., 1996). Alle Mutanten zeigen bei 24°C wildtypähnliches Wachstum. Dagegen geht bei 37°C, analog zur Deletionsmutante $\Delta mdj1$, die Fähigkeit, nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen zu verwerten, verloren.

Tabelle 13: Darstellung der Temperatursensitivität der *MDJ1*-Mutanten (+++ Wachstum vergleichbar mit WT, ++ Wachstum etwas schlechter als WT, + Wachstum sehr gering, - kein Wachstum) in Anlehnung an Westermann et al., 1996.

	YPD		YPG	
	24°C	37°C	24°C	37°C
MdjA ⁺ (WT)	+++	+++	+++	+++
$\Delta mdj1$	++	-	-	-
mdj1-4	+++	+	+++	-
mdj1-5	+++	++	++	-
mdj1-6	+++	++	++	-
mdj1-7	+++	++	++	-

Für die Suche nach Suppressormutanten wurden Einzelkolonien der temperatursensitiven *MDJ1*-Mutanten in 20 ml glucosehaltigem Medium (YPD) zwei Tage bei 37°C kultiviert. Unter diesen Bedingungen zeigen die temperatursensitiven Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zwar eine deutlich verringerte Wachstumsrate, ihre Fähigkeit zur Zellteilung und damit die Möglichkeit der Ausbildung einer Suppressormutation bleibt aber erhalten.

Nach zwei Tagen wurden die Zellen auf glycerinhaltigem Medium (YPG) ausplattiert und vier Tage lang bei 37°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen sind unveränderte temperatursensitive Mutanten nicht wachstumsfähig.

Unter den ausplattierten Zellen der Mutante *mdj1-5* wurde eine große Anzahl an atemungskompetenten Zellen bei 37°C auf glycerinhaltigem Medium beobachtet. Gemessen an der Gesamtzahl an ausplattierten Zellen wurde die Frequenz, mit der atemungskompetente Zellen in der Kultur auftraten, zu 1/500 bestimmt. Es ist sehr unwahrscheinlich, daß Suppressoren mit dieser hohen Frequenz auftreten. Bei der DNA-Replikation werden nur ca. 0.0033 spontane Mutationsereignisse pro Genom beobachtet (Drake, 1991). Für *S. cerevisiae* mit einem Genom von 1.38×10^7 bp bedeutet das, daß ein bestimmtes Basenpaar pro Replikationszyklus von 2.4×10^{-10} Mutationsereignissen betroffen ist. Demnach sollte die Rate, mit der Suppressoren auftreten, die eine Reversion zum Wildtyp-Phänotyp aufweisen, um mindestens zwei Größenordnungen geringer sein, als sie bei der Mutante *mdj1-5* beobachtet wurde. Die Identifizierung eines spezifischen Suppressorallels bei der beobachteten hohen Reversionsrate der *mdj1-5*-Mutante stellte sich als unmöglich heraus. Vermutlich war der Wachstumsdefekt der Mutante *mdj1-5* unter dem hier gewählten Selektionsdruck nicht restriktiv genug oder es wurde eine Stressantwort ausgelöst, die den temperatursensitiven Phänotyp der Mutanten partiell unterdrücken konnte.

Unter den plattierten Zellen der Mutanten *mdj1-4*, *mdj1-6* und *mdj1-7* wurden keine atemungskompetenten Zellen bei 37°C auf glycerinhaltigem Medium beobachtet. Unter den hier gewählten Bedingungen konnten mit den beschriebenen temperatursensitiven Mutanten keine Suppressoren erhalten werden. Dieser Versuchsansatz stellte sich somit als ungeeignet heraus.

2. Komplementation von Mdj1p durch homologe DnaJ-Proteine

Als alternativer Ansatz zur funktionellen Charakterisierung von Mdj1p wurde eine Komplementationsstudie durchgeführt. Ausgewählte nicht-mitochondriale DnaJ-Proteine wurden auf ihre Fähigkeit getestet, Mdj1p funktionell zu ersetzen (Abbildung 6).

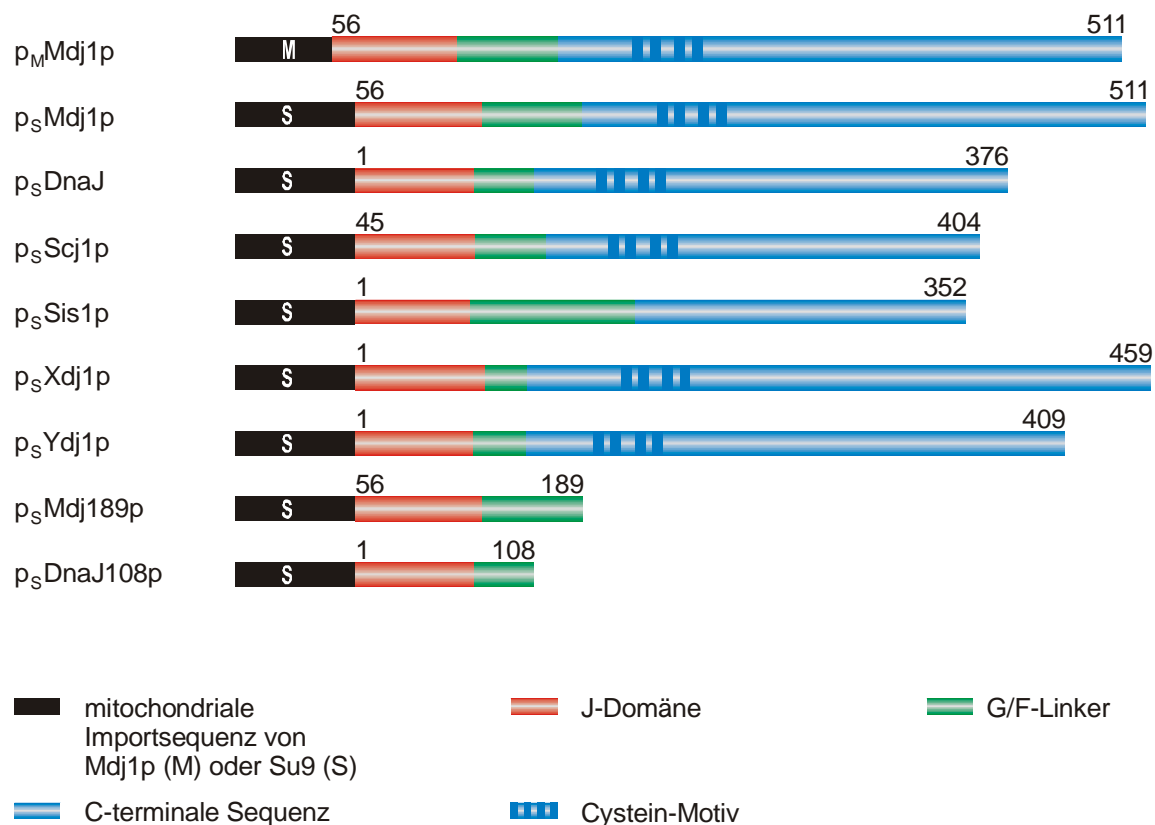


Abbildung 6: Schematische Darstellung der in der Komplementationsstudie eingesetzten DnaJ-Proteine (angegeben als Vorläuferproteine).

Es wurde insbesondere untersucht, ob andere DnaJ-Proteine das respiratorische Wachstum und den Erhalt der mitochondrialen DNA gewährleisten können. Auf diese Weise sollte untersucht werden, inwieweit Mdj1p zur Erfüllung seiner Funktion in den Mitochondrien spezialisiert ist bzw. sich von anderen homologen DnaJ-Proteinen unterscheidet.

Tabelle 14: Anteil an identischen Aminosäuren in verschiedenen DnaJ-Proteine im Vergleich zu Mdj1p.

	Identische Aminosäuren - gesamtes Protein -	Identische Aminosäuren - J-Domäne -
DnaJ	32%	51%
Scj1p	26%	47%
Sis1p	26%	47%
Xdj1p	26%	45%
Ydj1p	28%	54%

Diese Fragestellung ist vor allem vor dem Hintergrund interessant, daß bisher zwei weitere mitochondriale DnaJ-Proteine in *S. cerevisiae* bekannt sind, von denen jedoch keines in Abwesenheit von Mdj1p die Fähigkeit zu respiratorischem Wachstum vermitteln kann (Westermann und Neupert, 1997; Strain et al., 1998).

Für die Komplementationsstudie wurden zunächst fünf homologe Proteine ausgewählt. Neben DnaJ aus *E. coli*, das mit 33% die größte Homologie aufweist, wurden vier weitere DnaJ-Proteine aus *S. cerevisiae* verwendet (vgl. Tabelle 14). Dabei handelt es sich um (1) Scj1p, einem im Lumen des endoplasmatischen Retikulum lokalisierten DnaJ-Protein (Blumberg und Silver, 1991; Schlenstedt et al., 1995), (2) Sis1p, einem zytosolischen DnaJ-Protein, dem eine Rolle bei der Proteintranslation zugeschrieben wird (Luke et al., 1991; Zhong und Arndt, 1993), (3) Xdj1p, einem DnaJ-Protein mit bisher nicht bekannter Lokalisation und Funktion (Schwarz et al., 1994) und (4) Ydj1p, einem weiteren zytosolischen DnaJ-Protein, dessen Beteiligung an der Proteintranslokation und proteolytischen Prozessen im Zytosol beschrieben wurde (Caplan et al., 1992; Becker et al., 1996; Lee et al., 1996).

Mit Ausnahme von Sis1p weisen alle hier ausgewählten Proteine die für DnaJ-Proteine typische Domänenstruktur einschließlich der J-Domäne, des G/F-Linkers und des Cystein-Motives auf. Sis1p besitzt als einzige Ausnahme kein Cystein-Motiv (Abbildung 6). Für die Komplementationsstudie wurden Hefe-Mutanten erzeugt, in denen Mdj1p auf genetischer Ebene durch die homologen DnaJ-Proteine ersetzt wurde.

2.1. Klonierung der DNAJ-Gene für den mitochondrialen Import

Die Gene der verschiedenen DnaJ-Proteine wurden mittels PCR amplifiziert. Die verwendeten Primerpaare sind in Tabelle 3 aufgeführt. Als Matrize diente DNA aus dem Bakterienstamm XL1-blue für die Amplifikation von *DNAJ*, bzw. DNA aus dem Hefestamm D273-10B für die Amplifikation von *MDJ1*, *SCJ1*, *SIS1*, *XDJ1* und *YDJ1*. Die durch PCR erhaltenen DNA-Fragmente wurden über *Bam*HI/*Eco*RI bzw. *Bam*HI/*Sac*I zunächst in den Vektor pGEM3Su9 subkloniert und sequenziert. Die resultierenden Konstrukte konnten zur *in vitro* Expression der DnaJ-Proteine als Fusion mit den ersten 69 Aminosäuren der mitochondrialen Importsequenz der Untereinheit 9 der F_o-ATPase aus *Neurospora crassa* verwendet werden (vgl. III.2.2 und III.2.6).

2.2. Mitochondrialer Import von Mdj1p

Ein effizienter Import in die mitochondriale Matrix von *S. cerevisiae* wurde für eine Reihe heterologer Proteine beschrieben, die an die mitochondriale Importsequenz der Untereinheit 9 der F_0 -ATPase aus *Neurospora crassa* (Su9) fusioniert waren (Pfanner et al., 1987; Schwarz et al., 1993; Prip-Buus et al., 1996). Um vergleichbare Importbedingungen zu erreichen, wurden alle DnaJ-Proteine, die in der Komplementationsstudie getestet wurden, mittels dieser Importsequenz in die mitochondriale Matrix transportiert. Zunächst wurde die heterologe mitochondriale Importsequenz (Su9) am Beispiel von Mdj1p im Vergleich mit der endogenen Importsequenz getestet.

Proteine mit einer mitochondrialen Importsequenz werden von isolierten Mitochondrien aufgenommen. Eine entscheidende Voraussetzung für den Import in die mitochondriale Matrix ist jedoch die Energetisierung der inneren Membran – also das Vorhandensein des natürlichen Membranpotentials, $\Delta\Psi$ (Gasser et al., 1982; Schleyer et al., 1982; Eilers et al., 1987).

Zunächst wurde Mdj1p mit der endogenen bzw. der heterologen Importsequenz unter Verwendung der Konstrukte pMDJ1 bzw. pGEM3Su9MDJ1 (vgl. Tabelle 4) *in vitro* synthetisiert und durch Verwendung von ^{35}S -Methionin radioaktiv markiert. Radioaktiv markiertes Vorläuferprotein wurde in einem Reaktionsansatz mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Zur Visualisierung des mitochondrialen Imports wurde die Tatsache ausgenutzt, daß alle importierten Proteine durch die mitochondriale Membran vor proteolytischem Abbau geschützt sind. Je eine Hälfte eines Reaktionsansatzes wurde deshalb mit Trypsin behandelt, um nicht importierte Proteine proteolytisch zu verdauen. Die reisolierten Mitochondrien wurden lysiert und das Ergebnis der Importreaktion nach Auftrennung der mitochondrialen Extrakte mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie analysiert (vgl. Abbildung 7). Zur Kontrolle wurden alle Importreaktionen parallel für Mitochondrien mit und ohne Membranpotential ($\Delta\Psi$) analysiert.

In Anwesenheit eines Membranpotentials konnte nach Verdau mit Trypsin ein Signal importierter Proteine nachgewiesen werden (vgl. Bahnen 2 und 4 bzw. Bahnen 6 und 8). Die im Vergleich zum Vorläuferprotein höhere elektrophoretische Mobilität belegt außerdem die Prozessierung zu reifem Mdj1p (vgl. Bahnen 3 und 4 bzw. Bahnen 7 und 8). Der Vergleich der Bahnen 4 und 8 zeigt, daß der mitochondriale Import und die Prozessierung von Mdj1p unabhängig von der verwendeten Importsequenz erfolgt. Es ist deshalb davon auszugehen,

daß die heterologe mitochondriale Importsequenz, Su9, ebenso für den Import der anderen zu testenden DnaJ-Proteine geeignet ist.

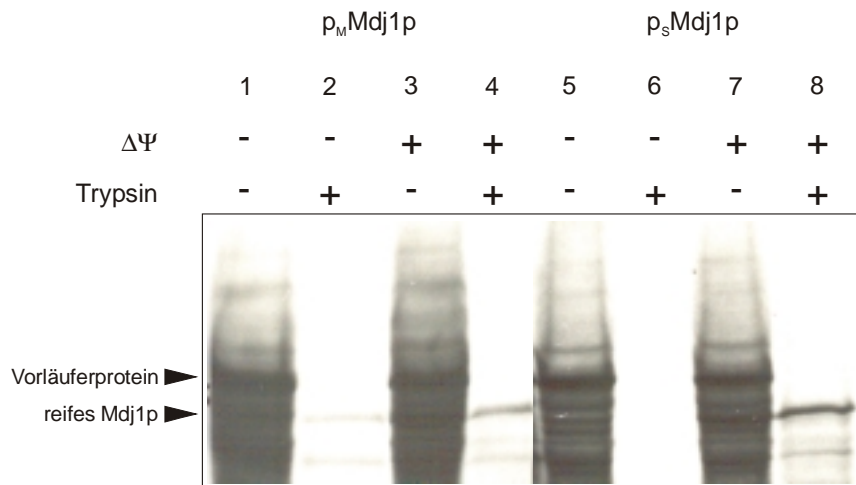


Abbildung 7: Import von Mdj1p in isolierte Mitochondrien. Aufgetragen sind mitochondriale Extrakte nach dem Import. Bahnen 1-4: Mdj1p mit der endogenen Importsequenz (p_M); Bahnen 5-8: Mdj1p mit der Importsequenz der Su9 der F₀-ATPase aus *N. crassa* (p_S). Vorläuferprotein wurde in den Bahnen 1, 2, 4 und 5 mit Mitochondrien ohne Membranpotential ($\Delta\Psi$:-) und in den Bahnen 3, 4, 7 und 8 mit Mitochondrien mit Membranpotential ($\Delta\Psi$:+) inkubiert. Extrakte von Mitochondrien, die nach dem Import mit Trypsin behandelt wurden, sind in den Bahnen 2, 4, 6 und 8 gezeigt.

2.3. Konstruktion eines Vektors für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Eine Voraussetzung für die Komplementationsstudien war, daß die *in vivo* Synthese der künstlichen DnaJ-Vorläuferproteine in gleicher Weise wie die Synthese von Mdj1p reguliert ist. Dazu wurde die regulatorische Sequenz von *MDJ1* mittels PCR mit den PCR-Primern regf und regr unter Verwendung von pMDJ315⁴ als Matrize synthetisiert und nach Verdau mit *Sma*I und *Hind*III in den mit *Ssp*I und *Hind*III geschnittenen kommerziell erhältlichen *E. coli*/*S. cerevisiae*-Shuttle-Vektor pYES2.0 kloniert (vgl. Abbildung 8).

⁴ In pMDJ315 wurde zuvor durch ortsspezifische Mutagenese mit den Mutageneseprimern bamf und bamr eine *Bam*HI-Schnittstelle innerhalb der regulatorischen Sequenz entfernt. Diese Mutagenese war notwendig, weil das Enzym *Bam*HI für spätere Klonierungsschritte verwendet werden sollte.

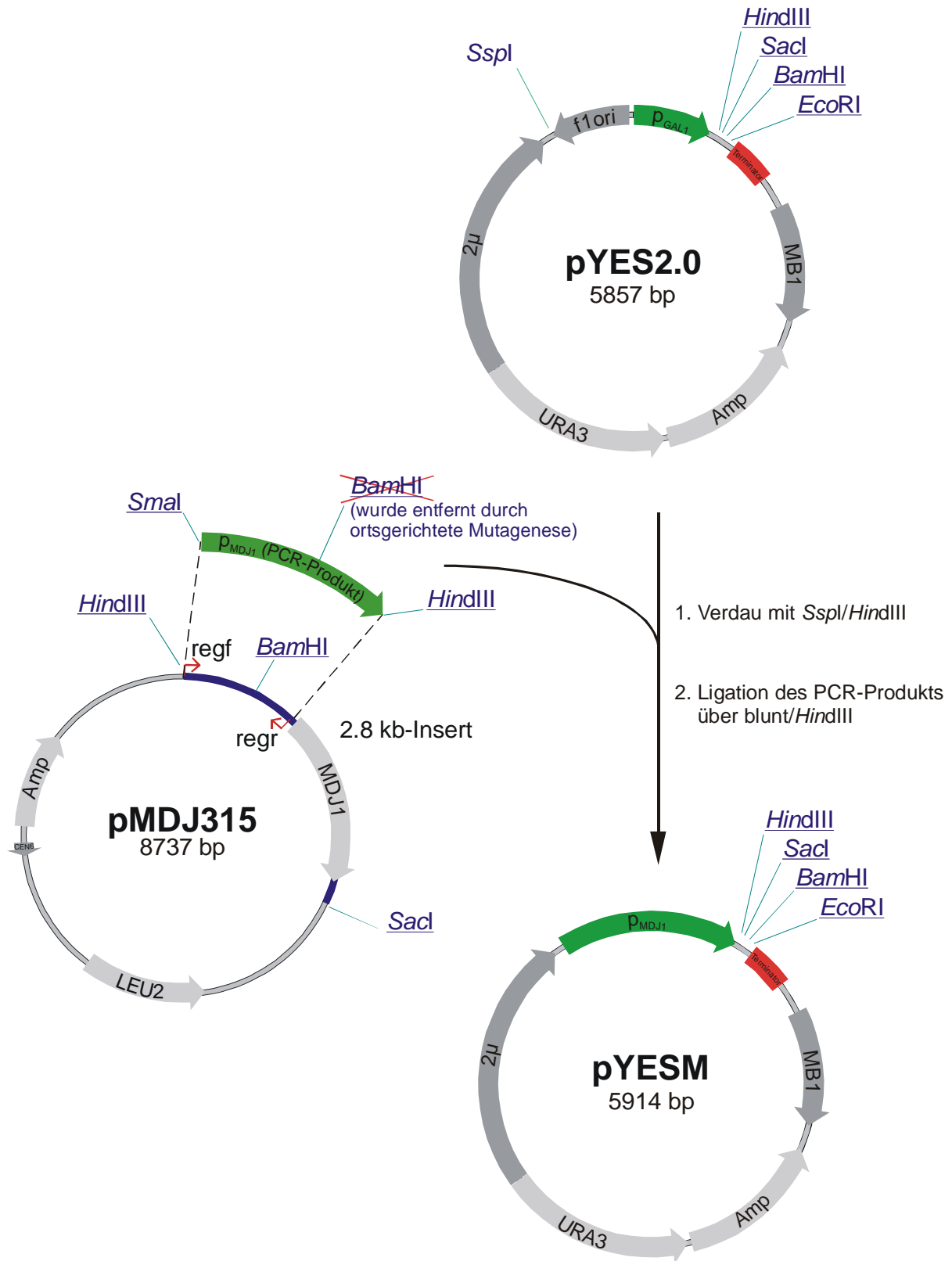


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Erzeugung von pYESM, einem *S. cerevisiae/E. coli* Shuttle-Vektor mit endogenem *MDJ1*-Promoter.

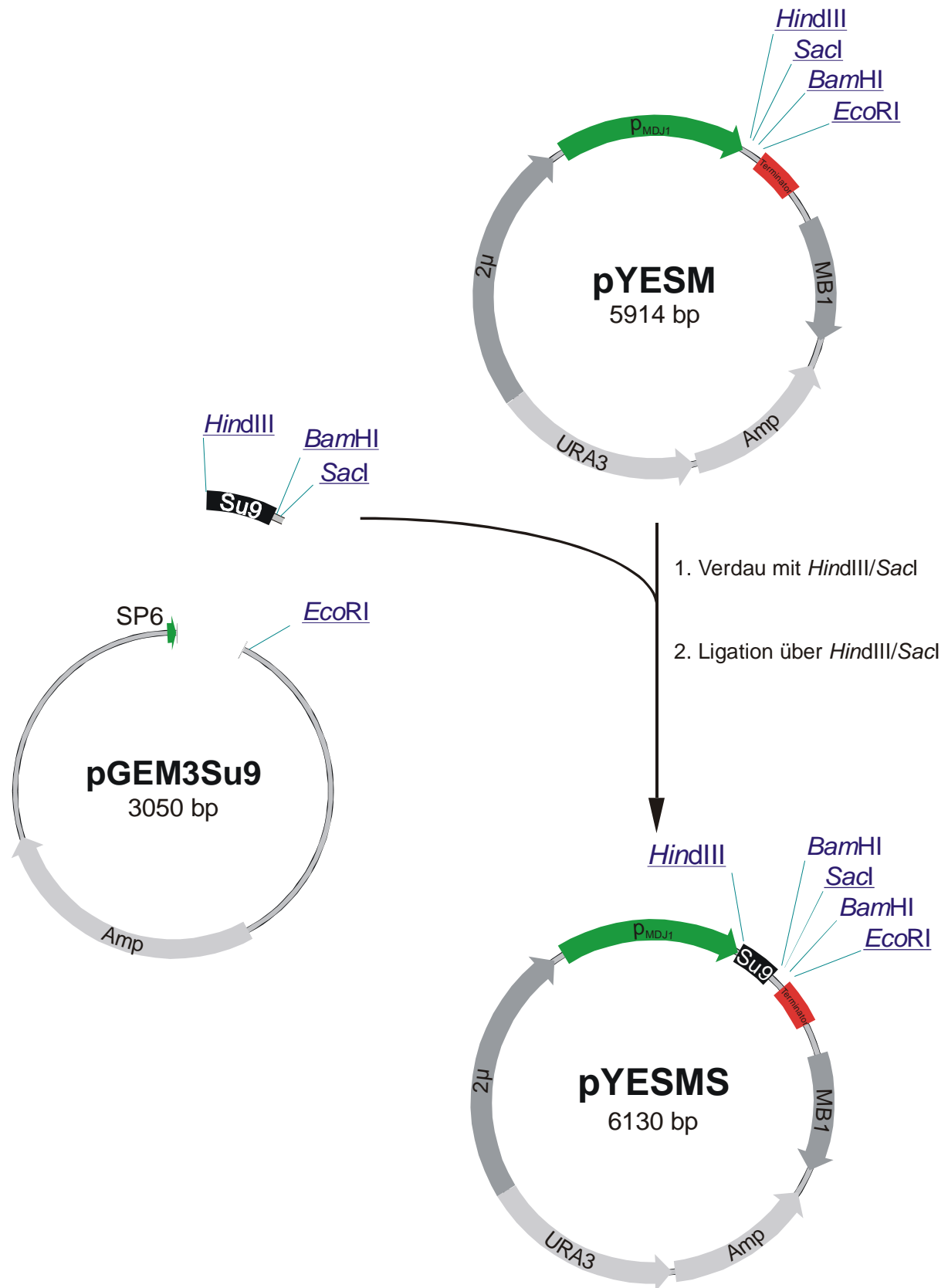


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Erzeugung des Plasmids pYESMS, das als Rezipient für die Gene der DnaJ-Homologen verwendet wurde.

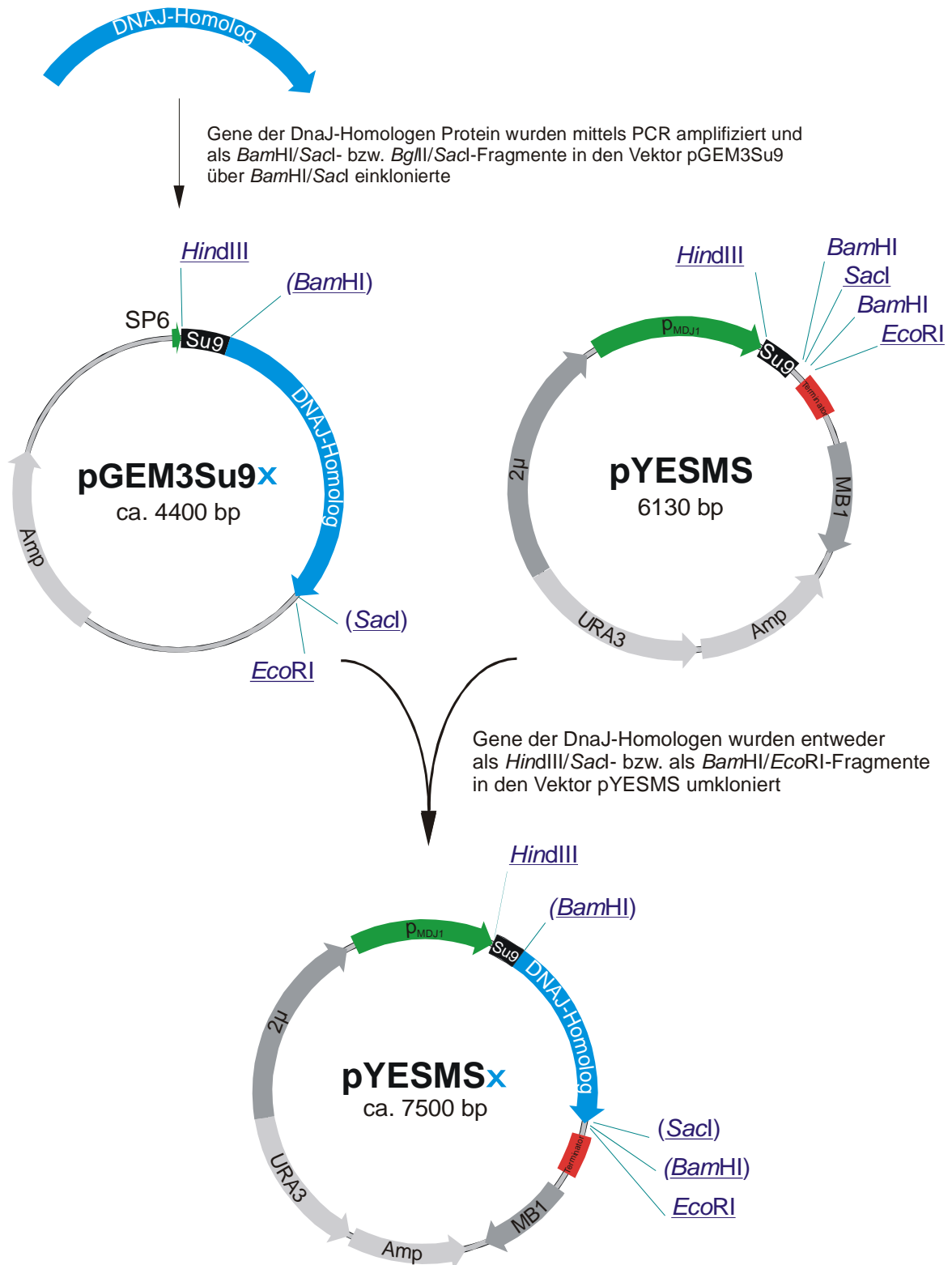


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Erzeugung der Plasmide, die zur Expression der DnaJ-Homologen in *S. cerevisiae* verwendet wurden.

Auf diese Weise wurde in dem ursprünglichen Vektor pYES2.0 der *GAL1*-Promotor und ein Teil des F1-Replikationsorigins durch ein DNA-Fragment ersetzt, das die gesamte regulatorische Sequenz von *MDJ1* enthielt. Schließlich wurde über *HindIII* und *SacI* die kodierende Sequenz der Su9 aus pGEM3Su9 subkloniert. Das resultierende Plasmid wurde mit pYESMS bezeichnet (vgl. Abbildung 9).

2.4. Klonierung der DNAJ-Gene für die Expression in *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Expression in *S. cerevisiae* wurden die Gene der DnaJ-Proteine aus den pGEM3Su9-Konstrukten (vgl. III.2.1) in den Vektor pYESMS (vgl. III.2.3) umkloniert. Abhängig von den Restriktionsschnittstellen innerhalb der Gensequenzen erfolgte deren Umklonierung mit *HindIII/SacI* bzw. mit *BamHI/EcoRI*, so daß Vektoren erhalten wurden, die eine Expressionskassette mit der Su9 und einem DnaJ-Gen unter der Kontrolle des *MDJ1*-Promotors enthielten (vgl. Abbildung 10). Weiterhin trugen alle Vektoren für die Amplifikation in *E. coli* den Replikationsorigin ColE1 und eine Ampicillin-Resistenz als Selektionsmarker sowie für die Amplifikation in *S. cerevisiae* den Replikationsorigin 2 μ und einen Uracil-Auxotrophiemarker. Eine Übersicht über die Nomenklatur der erstellten Konstrukte ist in Tabelle 15 dargestellt.

2.5. Konstruktion der Komplementationsmutanten

Die Komplementationsmutanten wurden durch *plasmid shuffling* erzeugt. Als Ausgangsstamm diente der haploide Hefestamm YBW16, der neben einem chromosomal deletierten *MDJ1*-Allel ein Wildtyp *MDJ1*-Gen auf dem Plasmid pBWM11 [*MDJ1*, *URA3*, 2 μ] trug (Westermann et al., 1996). Dieser Stamm ist [rho⁺], besitzt also ein intaktes mitochondriales Genom. Damit für die spätere Selektion der Komplementationsmutanten der Auxotrophiemarker *URA3* verwendet werden konnte, erfolgte die Einführung der Gene der heterologen DnaJ-Proteine in zwei Stufen. Zunächst wurde in einem ersten *plasmid shuffling* - Prozess der Vektor pBWM11 [*MDJ1*, *URA3*, 2 μ] durch pMDJ315 [*MDJ1*, *LEU2*, CEN] ersetzt. Der dabei erhaltene Hefestamm, YTL1, diente als Rezipient in einem weiteren *plasmid shuffling* - Prozess, bei dem pMDJ315 durch jeweils einen Vektor mit einem heterologen DNAJ-Gen ersetzt wurde. So wurden schließlich Stämme erhalten, die anstelle von *MDJ1* nunmehr eines der heterologen DNAJ-Gene exprimierten (vgl. Abbildung 11).

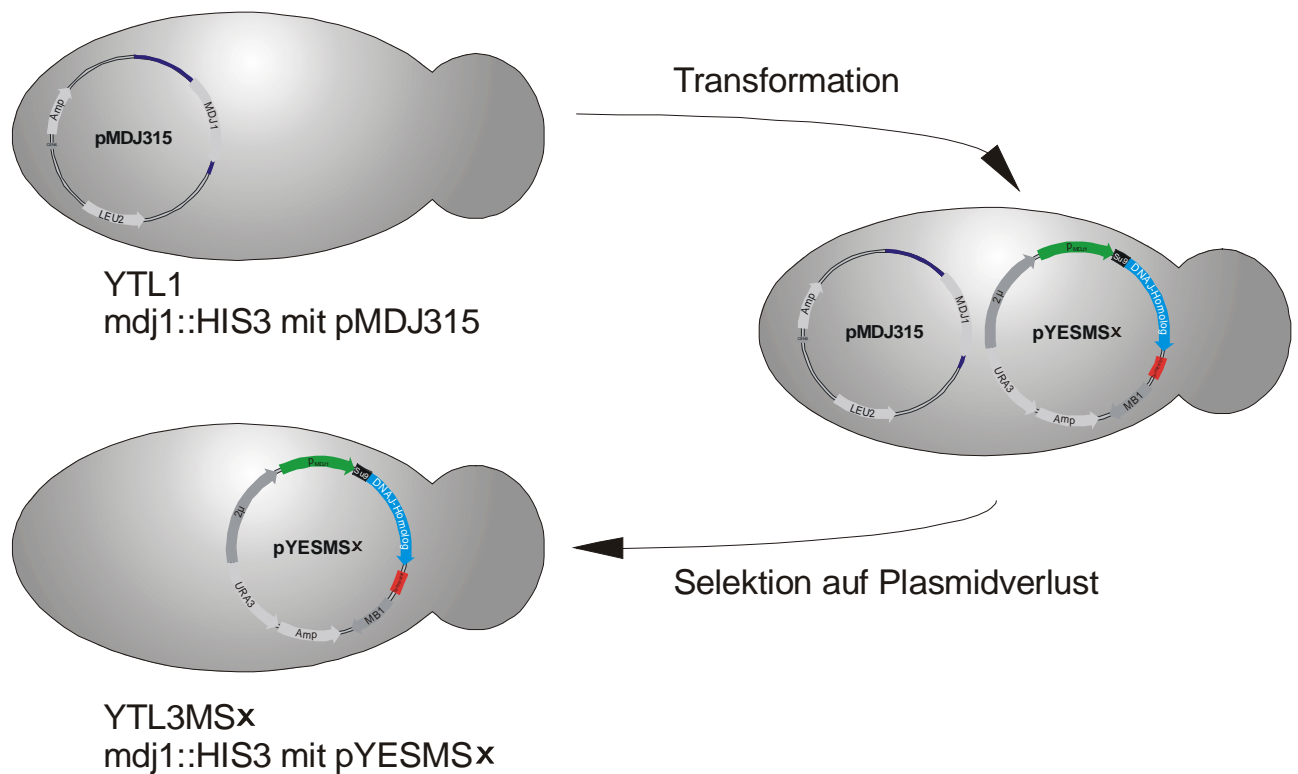


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Erzeugung der Komplementationsmutanten durch *plasmid shuffling*.

Tabelle 15: Nomenklatur der Komplementationsmutanten

Hefestamm	enthaltene Plasmid	exprimiertes Protein	Importsequenz von	
			WT-Mdj1p	Su9
YTL3MMMDJ1	pYESMMMDJ	Mdj1p	x	
YTL3MSMDJ1	pYESMSMDJ	Mdj1p		x
YTL3MSDNAJ	pYESMSDNAJ	DnaJ		x
YTL3MSSCJ1	pYESMSSCJ	Scj1p		x
YTL3MSSIS1	pYESMSSIS	Sis1p		x
YTL3MSXDJ1	pYESMSXDJ	Xdj1p		x
YTL3MSYDJ1	pYESMSYDJ	Ydj1p		x
YTL3MSYDJ1 _S	pYESMSYDJ _S	Ydj1C406S		x
YTL3MSM189	PYESMSM189	Mdj189p		x
YTL3MSD108	pYESMSD108	DnaJ108p		x

Durch diese Methode war garantiert, daß bis zu dem Zeitpunkt, da die entsprechenden DnaJ-Proteine in den Zellen synthetisiert werden konnten, ein funktionelles *MDJ1*-Allel vorhanden war, welches die fehlerfreie Propagierung eines intakten mitochondrialen Genoms vermittelte. Eine Übersicht über die erhaltenen Komplementation mutanten und deren Nomenklatur ist in Tabelle 15 aufgeführt.

Um die Stammkonstruktionen zu testen und die Funktionalität der ausgewählten Importsequenz *in vivo* zu bestätigen, wurden die Hefestämme YTL3MMMdj1 und YTL3MSMdj1 hinsichtlich ihres Wachstumsverhaltens im Vergleich zum Wildtyp mit chromosomalem *MDJ1* untersucht (vgl. Abbildung 12).

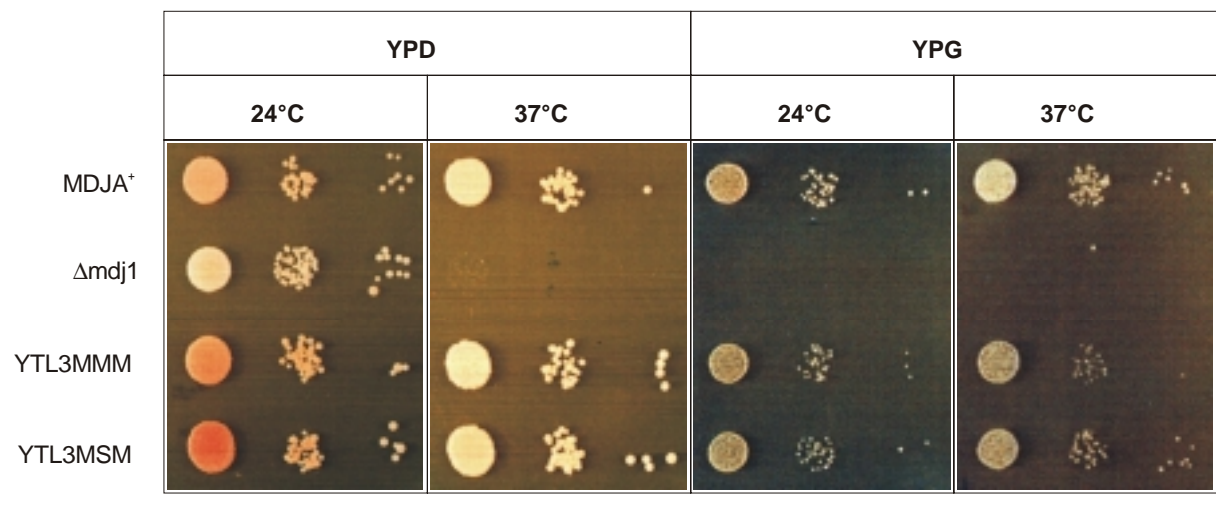


Abbildung 12: Phänomenologischer Vergleich von YTL3MMM und YTL3MSM mit MdjA⁺ und Δmdj1.

Es konnte gezeigt werden, daß die Zellen, die Mdj1p als Vorläuferprotein mit der endogenen (YTL3MMMdj1) bzw. der heterologen (YTL3MSMdj1) Importsequenz exprimierten, weder bei der Verwertung nicht-fermentierbarer Kohlenstoffe noch in ihrer Temperatursensitivität Unterschiede zum Wildtyp aufwiesen. Vielmehr entsprachen beide Stämme in ihrem phänomenologischen Erscheinungsbild dem Wildtyp mit chromosomalen *MDJ1*-Allel.

Auch die zur Entfernung der *Bam*HI-Schnittstelle eingeführte Mutation innerhalb der regulatorischen Sequenz hatte offensichtlich keine Auswirkungen auf die Expression von *MDJ1*. Es ist deshalb davon auszugehen, daß die erhaltenen Expressionskonstrukte auch für die Expression der heterologen DnaJ-Gene geeignet sind.

2.6. Expression und mitochondrialer Import homologer DnaJ-Proteine in *Saccharomyces cerevisiae*

Zum Nachweis der Expression, der mitochondrialen Lokalisierung und der korrekten Prozessierung der DnaJ-Proteine in den entsprechenden Komplementationsmutanten, wurden deren mitochondriale Extrakte zunächst immunologisch untersucht. Anschließend wurde der mitochondriale Import der künstlichen Vorläuferproteine in isolierte Mitochondrien überprüft.

Für die immunologische Untersuchung mitochondrialer Extrakte wurden Mitochondrien von den Hefestämmen der verschiedenen Komplementationsmutanten präpariert und mittels SDS-PAGE und anschließendem Western-Blot analysiert. Alle getesteten Proteine (Mdj1p, DnaJ, Scj1p und Ydj1p), konnten eindeutig in den präparierten Mitochondrien nachgewiesen werden (Abbildung 13).

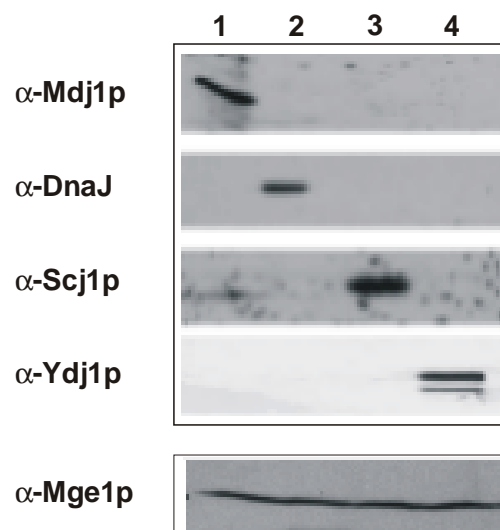


Abbildung 13: Immunologischer Nachweis der heterologen DnaJ-Proteine in Mitochondrien. Mitochondriale Extrakte aus YTL3MSMdj (Bahn 1), YTL3MSDnaJ (Bahn 2), YTL3MSScj (Bahn 3), YTL3MSYdj (Bahn 4) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit den angegebenen Antiseren dekoriert. Die Dekoration mit Antiserum gegen das mitochondriale GrpE-Homolog, Mge1p diente als Kontrolle.

Eine genauere Bestimmung der Konzentration in den Mitochondrien wurde jedoch nicht durchgeführt. Aus früheren Arbeiten war bekannt, daß bereits geringste Mengen an Mdj1p ausreichend sind, wildtypähnliches Wachstum zu vermitteln (Westermann, unveröffentlicht).

Die Molekulargewichte, die aus der elektrophoretischen Mobilität abgeleitet wurden, entsprachen für Mdj1p, DnaJ und Ydj1p den erwarteten Werten der prozessierten reifen Proteine. Nur für Scj1p, mit einem berechneten Molekulargewicht von ca. 39 kD, wurde eine elektrophoretische Mobilität ermittelt, die einem Polypeptid von ca. 43 kD entspricht. In der Bahn 1 in Abbildung 13 ist wegen einer geringen Verunreinigung der Mitochondrienpräparation mit endoplasmatischem Retikulum das korrekte Laufverhalten von Scj1p bei 39 kD erkennbar. Möglicherweise erfolgte die Abspaltung der mitochondrialen Importsequenz nach dem mitochondrialen Import nicht an der vorgesehenen Position, so daß in den Mitochondrien noch unprozessierte Vorläuferproteine vorliegen.

Außerdem konnte mit diesem Western-Blot interessanterweise für Ydj1p eine Doppelbande detektiert, die auf eine partielle Farnesylierung des mitochondrialen Ydj1p hindeutet (Caplan et al. 1992).

Da für Sis1p und Xdj1p keine spezifischen Antikörper zur Verfügung standen, konnte deren Anwesenheit in den mitochondrialen Extrakten der entsprechenden Komplementationsmutanten nicht überprüft werden. Um dennoch zumindest nachzuweisen, daß die künstlich erzeugten Vorläuferproteine in Mitochondrien importiert werden können, wurde der mitochondriale Import in isolierte Mitochondrien untersucht.

Dazu wurden radioaktiv markierte Vorläuferproteine der verschiedenen DnaJ-Proteine in Retikulozytenlysat unter Verwendung der pGEM3Su9-Konstrukte synthetisiert. Die Vorläuferproteine wurden mit isolierten Mitochondrien inkubiert und der mitochondriale Import wie unter II.2.2 beschrieben nach Verdau mit Trypsin mittels Autoradiographie analysiert (vgl. Abbildung 14). Dabei konnte gezeigt werden, daß DnaJ, Scj1p, Sis1p, Xdj1p und Ydj1p genauso wie Mdj1p in isolierte Mitochondrien importiert wurden. Wie erwartet, war der Import abhängig vom Membranpotential. Außerdem konnte die Prozessierung zum reifen DnaJ-Protein nach erfolgtem Import anhand des gegenüber dem eingesetzten Vorläuferprotein geringeren Molekulargewichts nachgewiesen werden.

Nur für Scj1p wurde - wie schon im Western-Blot - eine unvollständige Prozessierung beobachtet.

Nachdem der Import und die korrekte Prozessierung in isolierten Mitochondrien für die beiden DnaJ-Proteine Sis1p und Xdj1p, für die keine Antikörper für einen immunologischen Nachweis in den Mitochondrien der Komplementationsmutanten zur Verfügung standen, nachgewiesen werden konnte, wurde davon ausgegangen, daß auch *in vivo* die reifen DnaJ-Proteine in den Mitochondrien anwesend sind.

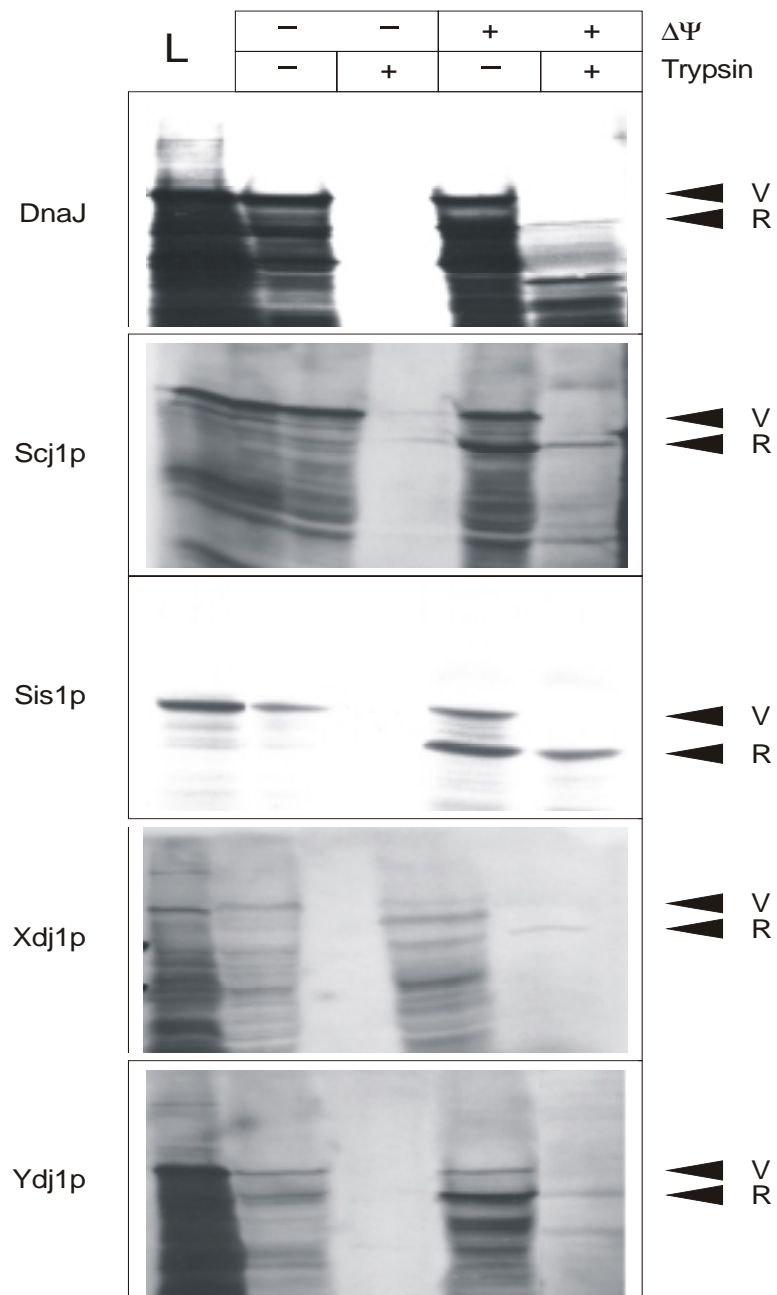


Abbildung 14: Import von DnaJ, Scj, Sis1p, Xdj1p und Ydj1p als Fusion mit Su9 in isolierte Mitochondrien. Aufgetragen sind Retikulozytenlysat (L) und die mitochondrialen Extrakte nach dem Import. Im Kopf der Abbildung wird durch „+/-“ die An- bzw. Abwesenheit des Membranpotentials ($\Delta\Psi$) während der Importreaktion bzw. die Behandlung mit Trypsin nach dem Import symbolisiert. Vorläuferprotein (V) und reifes Protein (R) sind durch Pfeile markiert.

2.7. Komplementation von Mdj1p durch homologe DnaJ-Proteine

Für die Analyse des Komplementationspotentials der verschiedenen DnaJ-Proteine wurde die Temperatursensitivität bei 37°C und das Wachstum der Mutanten auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen untersucht. Dazu wurden die Mutanten in Minimalmedium unter Bedingungen, die den Erhalt des Plasmids mit dem entsprechenden DnaJ-Gen garantierten, 16 h kultiviert. Alle Kulturen wurden anschließend auf eine OD₆₀₀ von 0.1 eingestellt und Verdünnungen dieser Kulturen auf Platten mit glucose- (YPD) und glycerinhaltigem Medium (YPG) ausgetüpfelt. Die Platten wurden bei 24°C (YPD-Platten drei Tage, YPG-Platten fünf Tage) und 37°C (YPD-Platten zwei Tage, YPG-Platten vier Tage) inkubiert. Das Wachstumsverhalten der Komplementationsmutanten ist in Abbildung 15 im Vergleich zum Wildtyp bzw. zur Deletionsmutate, $\Delta mdj1$, dargestellt.

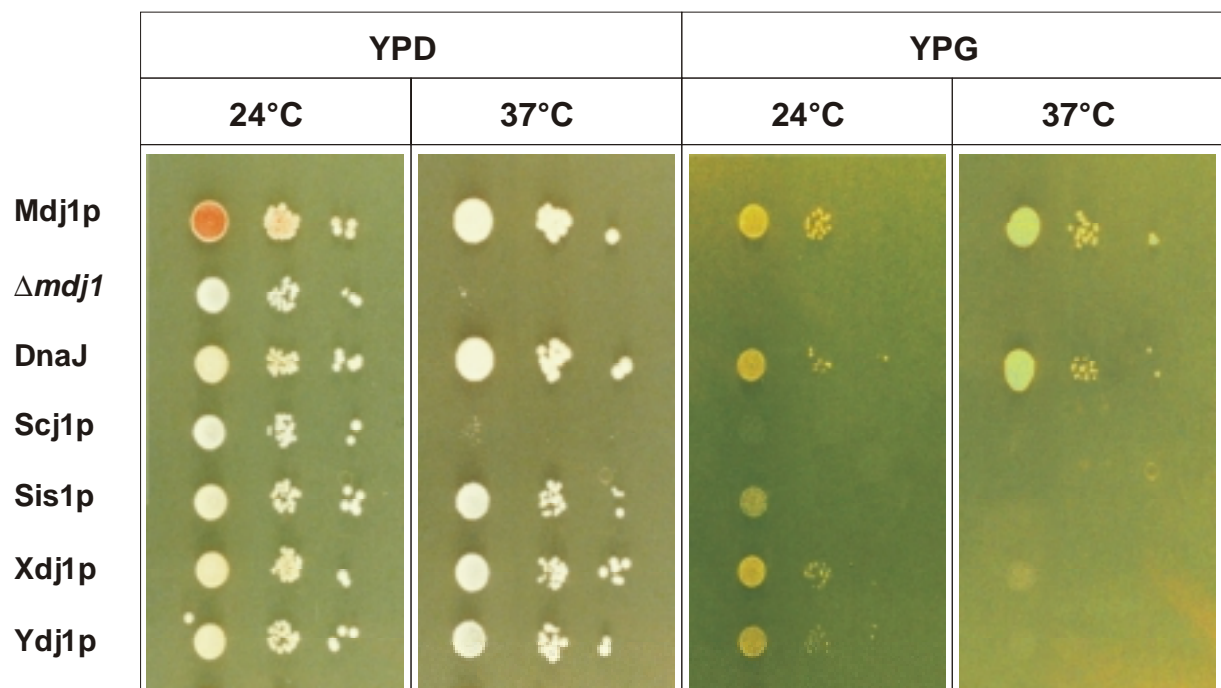


Abbildung 15: Vergleich des Wachstums der verschiedenen Komplementationsmutanten bei 24°C und 37°C auf fermentierbarer und nicht-fermentierbarer Kohlenstoffquelle. Verdünnungen der Hefekulturen, die anstelle von Mdj1p die links in der Abbildung angegebenen DnaJ-Proteine enthielten wurden auf glucose- (YPD) oder glycerinhaltigem Medium (YPG) ausgetüpfelt und bei 24°C bzw. 37°C inkubiert.

Δmdj1 war erwartungsgemäß ausschließlich bei 24°C auf glucosehaltigem Medium lebensfähig. Weder bei 37°C noch auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin bildete diese Mutante Kolonien. Dagegen vermittelte plasmidkodiertes Mdj1p unter allen getesteten Bedingungen ein mit dem Wildtyp vergleichbares Wachstum. Keine der Komplementationsmutanten, die anstelle von Mdj1p ein anderes DnaJ-Protein trug, verhielt sich wie die Deletionsmutante. Im Vergleich zum Wildtyp wiesen sie aber dennoch unterschiedlich stark ausgeprägte Einschränkungen in ihrem Wachstum auf.

Im Folgenden soll zunächst das Wachstum auf glycerinhaltigem Medium betrachtet werden. Nur DnaJ aus *E. coli* war in der Lage, auf YPG-Medium wildtypähnliches Wachstum zu vermitteln. Diese Fähigkeit war bei den anderen DnaJ-Proteinen deutlich geringer ausgeprägt. Während Zellen mit mitochondrialem Xdj1p und Ydj1p bei 24°C auf YPG wachsen konnten, trat bei 37°C eine deutliche Beeinträchtigung des Wachstums auf. Eine noch viel schlechtere Komplementation zeigten Zellen, die mitochondriales Scj1p oder Sis1p enthielten. Bei 24°C vermittelten Scj1p bzw. Sis1p kaum Wachstum auf Glycerin. Erst nach dem Überimpfen von Zellen dieser beider Komplementationsmutanten auf frisches YPG-Medium wurde ausgeschlossen, daß das Wachstum auf einen Restgehalts an Glucose im ausgebrachten Medium zurückzuführen war. Eine Ausbildung von Mikrokolonien konnte erst nach zehn Tagen Kultivierung bei 24°C beobachtet werden. Scj1p und Sis1p können also nur mit großen Einschränkungen respiratorisches Wachstum vermitteln.

Bei der Betrachtung des Wachstumsverhalten der Komplementationsmutanten hinsichtlich der Temperatursensitivität bei 37°C auf glucosehaltigem Medium, wurde dagegen ausschließlich bei der Mutante mit mitochondrialem Scj1p eine schlechte Komplementation beobachtet. DnaJ aus *E. coli* vermittelte auch hier die beste Komplementation. Zellen mit mitochondrialem Sis1p, Xdj1p und Ydj1p verhielten sich wildtypähnlich. Verglichen mit Zellen mit mitochondrialem DnaJ bzw. Mdj1p bildeten sie geringfügig kleinere Kolonien bei 37°C auf glucosehaltigem Medium aus.

Somit erwies sich DnaJ unter den getesteten DnaJ-Homologen - sowohl hinsichtlich der Komplementation der Temperatursensitivität als auch hinsichtlich der Vermittlung von respiratorischem Wachstum - am geeignetsten, Mdj1p zu ersetzen.

2.8. Komplementation von Mdj1p durch N-terminale Fragmente von Mdj1p und DnaJ

Die höchste Homologie weisen DnaJ-Proteine innerhalb der J-Domäne auf. Daher stellte sich die Frage, ob die J-Domäne für eine Komplementation von Mdj1p ausreichend ist. Aus Struktur-/Funktionsbeziehungen an *E. coli* DnaJ ist bekannt, daß ein N-terminales Fragment, bestehend aus der J-Domäne und dem G/F-Linker (Aminosäuren 2-108) partiell die Funktion von DnaJ übernehmen kann. So ist z.B. dieses N-terminale Fragment für die Stimulierung der ATPase-Aktivität von DnaK ausreichend (Wall et al., 1994). Obwohl durch ¹H-NMR-Strukturuntersuchungen für den G/F-Linker keine definierte Sekundärstruktur ermittelt werden konnte, scheint dessen Länge für die Struktur der J-Domäne und ihre Fähigkeit, DnaK zu stimulieren, von Bedeutung zu sein (Szabo et al., 1996; Huang et al., 1999). Deshalb wurde das Komplementationsvermögen des entsprechenden N-terminalen Fragmentes von Mdj1p, welches die J-Domäne und den gesamten G/F-reichen Bereich umfaßte, untersucht.

Unter Verwendung von ALIGN (<http://www2.igh.cnrs.fr/bin/align-guess.cgi>) wurde ein Sequenzvergleich zwischen Mdj1p und DnaJ durchgeführt (vgl. Abbildung 16).

DnaJ		MAKQ	4
pMdj1p	MAFQQGVLSRCSGVFRHHVGHSRHINNILYRHAIAFASIAPRIPKSSFHTSAIRN	NEAFK	60
DnaJ		DYYEILGVSKTAEEREIRKAYKRLAMKYHPDRNQDKEAEAKFKEIKEAYEVLTD SQKRA	63
pMdj1p		DPYDTLGLKKSATGAEIKKAYYKLAKKYHPDINK-EPDAEKKFHDLQNA YEILSDETKRQ	119
DnaJ		AYDQYGHAAFEQGGMGGGGFGG-----GADFSDI-----FG-----DVF GDIFGG	102
pMdj1p		QYDQFGPAAFGGGAAGGAGGGSGSPFGSQFHDFSGFTSAGGSPFGGINFEDLFGAAFGG	179
DnaJ		G-RGRQRAARG	112
pMdj1p		GGRGSGGASRS	190

Abbildung 16: Sequenzvergleich zwischen DnaJ aus *E. coli* und Mdj1p aus *S. cerevisiae* mit Hilfe von ALIGN. Aminosäurereste der J-Domäne sind rot und Aminosäuren des G/F-Linkers sind grün dargestellt. Ähnliche Aminosäuren sind durch einen Punkt und identische Aminosäuren durch einen Doppelpunkt gekennzeichnet. Aminosäurereste, die für das N-terminale Fragment von Mdj189p bzw. DnaJ108p verwendet wurden, sind fett gedruckt.

Das N-terminale Fragment mit der J-Domäne und dem G/F-reichen Bereich umfaßt die Aminosäuren 56 - 186 des Vorläuferproteins von Mdj1p. Zusätzlich zu dem N-terminalen Fragment von Mdj1p sollte auch das entsprechende Fragment - die ersten 108 Aminosäuren - von DnaJ auf sein Komplementationsvermögen untersucht werden.

Für die beiden Fragmente wurden die Expressionskonstrukte pYESMSM189 und pYESMSD108 hergestellt. Dazu wurden in die Plasmide pYESMSMDJ1 und pYESMSDNAJ mit den Primerpaaren 189f/189r bzw. 108f/108r (Tabelle 3) durch ortsspezifische Mutagenese je zwei Stopkodons nach der Aminosäureposition 189 bzw. 108 eingeführt. Die Wahl der Primer erlaubte ein schnelles *Screening* der nach Mutagenese erhaltenen Klone, da korrekte Klone durch Restriktionsverdau mit *Bsp*MI für pYESMSM189 bzw. mit *Hinc*II für pYESMSD108 anhand eines veränderten Schnittmusters identifiziert werden konnten.

Die Komplementationsmutanten wurden durch *plasmid shuffling* (vgl. III.2.4) erhalten und die Anwesenheit der verkürzten Proteine in den Mitochondrien durch Analyse der mitochondrialen Extrakte mittels Western-Blot nachgewiesen (Abbildung 17).

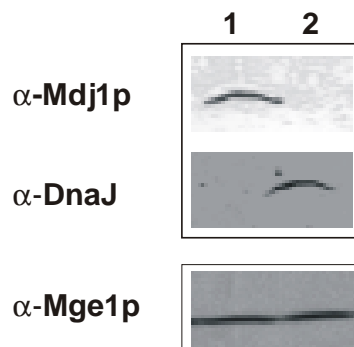


Abbildung 17: Immunologischer Nachweis der N-terminalen Fragmente von Mdj1p und DnaJ in Mitochondrien. Mitochondriale Extrakte aus YTL3MSM189 (Bahn 1), YTL3MSD108 (Bahn 2) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit den angegebenen Antisera dekoriert. Die Dekoration mit Antiserum gegen Mge1p diente als Kontrolle.

Für die Durchführung des Wachstumstests wurden die Zellen der beiden Stämme 16 h bei 24°C in Minimalmedium kultiviert, anschließend auf eine OD_{600} von 0.1 eingestellt und verschiedenen Verdünnungen dieser Kulturen auf glucose- (YPD) und glycerinhaltigem Medium (YPG) ausgetüpfelt (vgl. III.2.7). Anschließend wurden die Zellen bei 24°C bzw. 37°C inkubiert (vgl. Abbildung 18).

Auf glucosehaltigem Medium verhielt sich die Mutante mit dem N-terminalen Fragment von Mdj1p sowohl bei 24°C als auch bei 37°C ähnlich wie der Wildtyp. Interessanterweise wurde auch auf glycerinhaltigem Medium bei 24°C wildtypähnliches Wachstum beobachtet. Sogar bei 37°C wurden noch Kolonien ausgebildet, die aber im Vergleich zum Wildtyp deutlich kleiner und langsamer wuchsen. Die Mutante mit dem N-terminalen Fragment von DnaJ konnte zwar ebenfalls auf glucosehaltigem Medium sowohl bei 24°C als auch bei 37°C Wachstum vermitteln, allerdings waren die Kolonien bei 37°C deutlich kleiner als die Kolonien vom Wildtyp.

Auf glycerinhaltigem Medium war die Komplementationsfähigkeit des N-terminalen Fragmentes von DnaJ sowohl bei 24°C als auch bei 37°C, nur äußerst gering ausgeprägt. Das Wachstumsverhalten dieser Mutante war vergleichbar mit dem der Komplementationsmutanten mit mitochondrialem Scj1p und Sis1p.

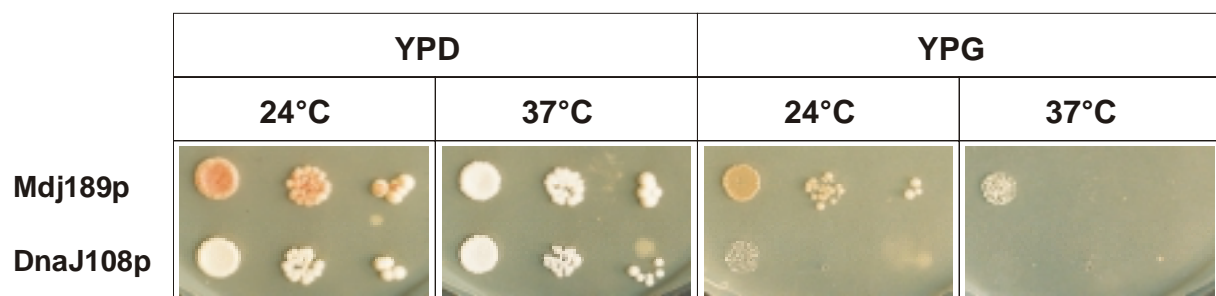


Abbildung 18: Vergleich des Wachstums der Komplementationsmutanten mit den N-terminalen Fragmenten von DnaJ bzw. Mdj1p anstelle von Mdj1p.

Das N-terminale Fragment bestehend aus der J-Domäne und dem G/F-Linker von Mdj1p ist demnach ausreichend, respiratorisches Wachstum bei 24°C zu vermitteln. Für eine vollständige Komplementation bei 37°C scheint allerdings das gesamte mitochondriale DnaJ-Protein erforderlich zu sein.

Weiterhin bestätigt dieses Experiment, daß die Anwesenheit des G/F-Linkers auch für die Funktionalität des N-terminalen Fragmentes von Mdj1p von ausschlaggebender Bedeutung ist. Ein N-terminales Fragment von Mdj1p, das zusätzlich zur J-Domäne nur 20 Aminosäuren, also nur etwa ein Drittel des G/F-reichen Bereiches enthielt, konnte Mdj1p nicht funktionell ersetzen (Westermann, persönliche Mitteilung). Auch für N-terminale Sis1p-Fragmente wurde eine Abhängigkeit der Funktionalität von der Länge des G/F-reichen Bereiches beobachtet (Yan und Craig, 1999). Neuere ¹H-NMR-Studien an N-terminalen

Fragmenten von DnaJ ergaben, daß die Aminosäuren des G/F-Linkers in den Fragmenten zwar keine räumlich definierte Struktur einnehmen, aber die Anordnung der Helices innerhalb der J-Domäne durch die Länge des G/F-Linkers beeinflusst wird. Interessanterweise wurde eine deutliche Veränderung der räumlichen Orientierung zwischen Helix IV und den anderen Helices in Abhängigkeit von der Länge des G/F-reichen Bereiches festgestellt (Huang et al., 1999; Yan und Craig, 1999). Demnach ist der G/F-reiche Bereich nicht nur ein Linker zwischen der J-Domäne und dem Rest des Proteins, sondern er bestimmt entscheidend die Struktur und die Funktionalität der J-Domäne.

Als einzige funktionelle Bedeutung des N-terminalen Fragments von DnaJ wurde bisher die Stimulierung der ATPase-Aktivität von DnaK diskutiert. Eine intrinsische Chaperonaktivität konnte dagegen immer nur für vollständiges DnaJ beobachtet werden. Daher wurde die Substratbindungseigenschaft dem C-terminalen Bereich des Proteins zugeschrieben. Da das N-terminale Fragment von Mdj1p zumindest bei 24°C das Wildtyp-Protein ersetzen kann, wurde postuliert, daß Mdj1p gemeinsam mit einem mitochondrialen Hsp70-Protein agiert (Lisse und Schwarz, 2000).

Neuere Untersuchungen weisen aber darauf hin, daß ein N-terminales Fragment von DnaJ unabhängig von Hsp70 Chaperoneffekte bewirkt. So konnte z.B. die Ausbeute an aktivem rekombinanten *tissue type plasminogen activator* (rPA) durch die periplasmatische Koexpression des N-terminalen Fragments von DnaJ ähnlich wie durch periplasmatische Koexpression des Gesamtproteins gesteigert werden (Schäffner, 2000). Diese Erhöhung der Ausbeute an aktivem rPA wurde auf eine verminderte Aggregation des rPA bei Koexpression des Chaperons zurückgeführt. Da im Periplasma von *E. coli* kein Hsp70-Protein existiert, wurde der beobachtete Chaperoneffekt dem N-terminalen Fragment *per se* zugeschrieben. Auch *in vitro* konnte durch Zugabe des N-terminalen Fragments von DnaJ zu Rückfaltungsansätzen die Aggregation von rPA, Rhodanese bzw. Proinsulin nahezu vollständig unterdrückt werden (Oehlmann, 2000). Diese Aggregationsunterdrückung *in vitro*, die bisher nur immer für das Gesamtprotein beobachtet werden konnte, verdeutlicht, daß das N-terminale Fragment von DnaJ über seiner Rolle als Stimulus für Hsp70 hinaus eine eigenständige funktionelle Bedeutung als Chaperon besitzt.

Es kann daher nicht mehr ausgeschlossen werden, daß auch mitochondriales DnaJ unabhängig von einem Hsp70-Partnerprotein agieren kann.

2.9. Temperatursensitive *MDJ1*-Mutanten mit N-terminalem Fragment von Mdj1p

Das N-terminale Fragment von Mdj1p und die ts-Mutante *mdj1-4* (vgl. Abbildung 5) verhalten sich auf glycerinhaltigem Medium sehr ähnlich. Beide können bei permissiver Temperatur, also bei 24°C, wildtypähnliches Wachstum auf glycerinhaltigem Medium vermitteln. Bei 37°C wurde dagegen kein Wachstum beobachtet. Unterschiedlich ist das Verhalten der beiden Mutanten auf glucosehaltigem Medium. Während das N-terminale Fragment das Wachstum auf glucosehaltigem Medium bei 37°C sehr effizient unterstützt, läßt sich bei der ts-Mutante *mdj1-4* bei dieser Temperatur ein deutlicher Wachstumsdefekt beobachten. Da die ts-Mutante *mdj1-4* (vgl. Abbildung 5) alle Mutationen innerhalb des N-terminalen Fragments aufweist, sollte untersucht werden, ob durch gleichzeitige Expression des N-terminalen Fragments und der ts-Mutante ein verbessertes Wachstum bei 37°C auf glycerin- bzw. glucosehaltigem Medium erreicht werden kann.

Elektrokompetente Zellen der ts-Mutanten wurden mit dem Plasmid pYESMSM189 transformiert, welches das N-terminale Fragment von Mdj1p kodiert. Die erhaltenen Transformanten wurden auf ihr Wachstumsverhalten getestet. Nach 16 h Kultivierung in Minimalmedium bei 24°C wurden die Zellen auf eine OD₆₀₀ von 0.1 eingestellt, verschiedene Verdünnungen dieser Kulturen auf glucose- (YPD) und glycerinhaltigem Medium (YPG) ausgetüpfelt und anschließend bei 24°C bzw. 37°C inkubiert.

Auf glucosehaltigem Medium (YPD) konnte das Wachstum der ts-Mutante bei 37°C tatsächlich durch die zusätzlicher Expression des N-terminalen Fragments von Mdj1p verbessert werden (Abbildung 19).

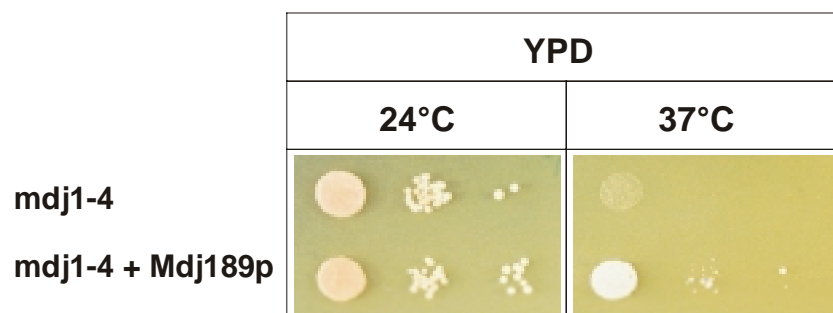


Abbildung 19: Vergleich des Wachstums der ts-Mutante *mdj1-4* mit und ohne zusätzliche Expression des N-terminalen Fragmentes von Mdj1p.

Auf glycerinhaltigem Medium wurde dagegen keine Veränderung des Wachstumsverhaltens der *ts*-Mutante *mdj1-4* durch eine zusätzliche Expression des N-terminalen Fragments festgestellt (nicht abgebildet).

Offenbar sind die beiden betrachteten Phänotypen - das Wachstum auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin und das Wachstum bei 37°C - unterschiedlich in ihren Anforderungen an das DnaJ-Protein. Während das intakte N-terminale Fragment die Temperatursensitivität auf fermentierbarem Medium unterdrücken kann, scheint für das Wachstum auf nicht-fermentierbarem Medium das vollständige DnaJ-Protein erforderlich zu sein.

So läßt sich auch erklären, daß die zusätzliche Expression des N-terminalen Fragments von *Mdj1p* in den *ts*-Mutanten *mdj1-5*, *mdj1-6* und *mdj1-7* keinerlei Einfluß auf das Wachstumsverhalten dieser Mutanten ausübte (nicht abgebildet). Diese drei *ts*-Mutanten besitzen alle ein intaktes N-terminales Fragment, alle Mutationen betreffen ausschließlich den C-terminalen Teil der Proteine (vgl. Abbildung 5).

Auf glucosehaltigem Medium bei 37°C ist das Wachstumsverhalten dieser *ts*-Mutanten vergleichbar zur Komplementationsmutante mit dem N-terminalen Fragment von *Mdj1p*. Eine weitere Verbesserung des Wachstums bei 37°C auf glucosehaltigem Medium konnte durch die zusätzliche Expression des N-terminalen Fragments von *Mdj1p* nicht beobachtet werden.

Auf glycerinhaltigem Medium konnte keine der getesteten *ts*-Mutanten durch die zusätzliche Expression des N-terminalen Fragments von *Mdj1p* einen Wachstumsvorteil gewinnen.

2.10. Temperatursensitive *MDJ1*-Mutanten mit *Sis1p*

Bei der Analyse der Komplementationsfähigkeit der verschiedenen DnaJ-Proteine stellte *Sis1p* einen Sonderfall dar. Obwohl die Komplementation der respiratorischen Aktivität extrem schlecht war, konnte auf glucosehaltigem Medium (YPD) bei 37°C beinahe wildtypähnliches Wachstum beobachtet werden. Während bei allen anderen DnaJ-Homologen ein schlechtes Wachstum auf glycerinhaltigem Medium mit einer verminderten Tolleranz gegenüber höherer Temperatur (37°C) zu korrelieren schien, komplementierte *Sis1p* die Temperatursensitivität deutlich besser, als den Wachstumsdefekt auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin (vgl. Abbildung 15).

Daher sollte untersucht werden, ob eine zusätzliche Expression von *Sis1p* in *ts*-Mutanten deren Wachstumsfähigkeit bei 37°C verbessern kann. Dazu wurden die *ts*-Mutanten *mdj1-4*,

mdj1-5, mdj1-6 und mdj1-7 mit dem *SIS1*-tragenden Plasmid, pYESMSSis1, transformiert und auf ihr Wachstumsverhalten bei 24°C und 37°C auf glucose- (YPD) und glycerinhaltigem Medium (YPG) untersucht.

Erneut konnte das Wachstum der ts-Mutante mdj1-4 auf glucosehaltigem Medium (YPD) durch das mitochondriale Sis1p verbessert werden (vgl. Abbildung 20). Das Wachstumsverhalten auf glycerinhaltigem Medium (YPG) blieb dagegen unverändert (nicht abgebildet). Bei allen anderen ts-Mutanten konnte keinerlei Veränderung des Wachstums durch die Anwesenheit von mitochondrialem Sis1p beobachtet werden (nicht abgebildet).

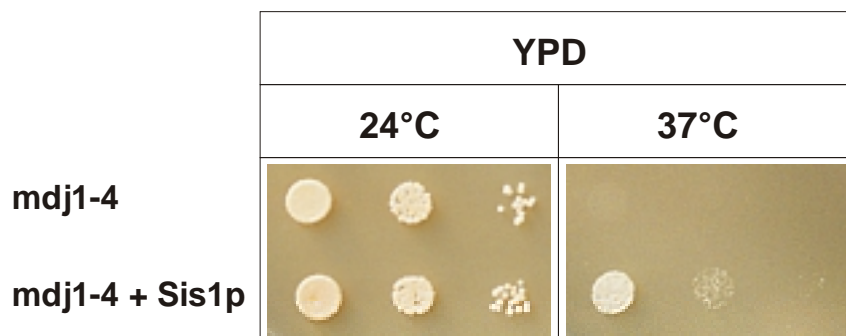


Abbildung 20: Vergleich des Wachstums der ts-Mutante mdj1-4 mit und ohne zusätzliche Expression von Sis1p.

Das N-terminale Fragment von Mdj1p bzw. das zytosolische DnaJ-Protein Sis1p kann nur die Temperatursensitivität der ts-Mutante mdj1-4 bei 37°C auf glucosehaltigem Medium unterdrücken. Dabei fällt auf, daß sowohl Sis1p als auch das N-terminale Fragment von Mdj1p eine intakte J-Domäne aufweisen, während im C-terminalen Teil deutliche Unterschiede zu Mdj1p auftreten bzw. dieser vollständig fehlt. Das deutet erneut darauf hin, daß für das Wachstum bei 37°C auf glucosehaltigem Medium eine intakte J-Domäne erforderlich ist. Für das respiratorische Wachstum ist dagegen ein vollständiges DnaJ-Protein notwendig, wobei der C-Terminus bestimmte strukturelle Voraussetzungen erfüllen muß, über die Sis1p nicht verfügt. Möglicherweise kommt dabei dem im Sis1p nicht vorhandenen Cystein-Motiv eine funktionelle Bedeutung zu.

2.11. Der Einfluß des Farnesylierungsmotivs auf die Funktionalität von Ydj1p

Bei der Auswahl von Xdj1p und Ydj1p als Kandidaten für die Komplementation von Mdj1p wurde vorrangig deren hohe Homologie zu Mdj1p berücksichtigt. Beide Proteine besitzen zusätzlich - im Unterschied zu Mdj1p - das Farnesylierungsmotiv CaaX⁵. Diese C-terminale Aminosäuresequenz wird im Zytosol posttranslational mit einem Farnesylrest modifiziert. Derart modifizierte Proteine weisen eine erhöhte Tendenz zur Membranassoziation auf. Da nicht bekannt war, ob eine Farnesylierung der Vorläuferproteine von Xdj1p und Ydj1p stattfinden würde, die möglicherweise einen effizienten Import in die Mitochondrien behindern könnte, wurde auch eine Ydj1p-Mutante in den Komplementationsstudien untersucht, die kein Farnesylierungsmotiv besaß. Für die Mutante Ydj1C406S, die anstelle von Cystein-406 ein Serin enthält, ist eine vollständige Inaktivierung der Farnesylierung von Ydj1p im Zytosol beschrieben (Caplan et al., 1992).

Ausgehend von pYESMSYDJ1 wurde durch ortsspezifische Mutagenese der Vektor pYESMSYDJ1_S erzeugt, mit dem die Mutante Ydj1C406S in *S. cerevisiae* exprimiert werden konnte. Der entsprechende Hefestamm, YTL3MSYDJ1_S, wurde wie schon beschrieben durch *plasmid shuffling* erhalten (vgl. III.2.5).

Mittels Western-Blot wurde die Mutante Ydj1C406S im mitochondrialen Extrakt nachgewiesen (Abbildung 21). Während für Wildtyp Ydj1p wie schon in Abbildung 13 ein Doppelbande sichtbar ist, wurde für die Mutante Ydj1C406S nur eine einzelne Bande detektiert. Die untere Bande bei Ydj1p mit der höheren elektrophoretischen Mobilität repräsentiert sehr wahrscheinlich die farnesylierte Form des Proteins (Caplan et al., 1992).

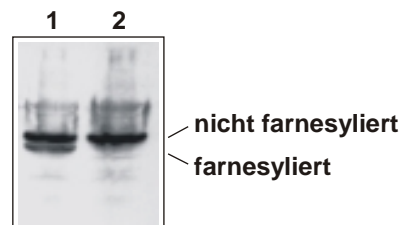


Abbildung 21: Immunologischer Nachweis von farnesyliertem und nicht farnesyliertem Ydj1p in Mitochondrien. Mitochondriale Extrakte aus YTL3MSYdj1 (Bahn 1), YTL3MSYdj1_S (Bahn 2) wurden über SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und mit Antiserum gegen Ydj1p dekoriert.

⁵ (C steht für Cystein, aa steht in den meisten Fällen für zwei aliphatische Aminosäuren und X repräsentiert ein Serin, Methionin oder ein Glutamin)

Ein derartiger Unterschied zwischen farnesylierter und nicht-farnesylierter Form von Ydj1p war zwar bekannt, dennoch war es überraschend, daß die farnesylierte Form von Ydj1p auch bei dem in den Mitochondrien vorliegenden Protein beobachtet werden konnte. Dabei ist bisher nicht geklärt, ob diese auch für andere farnesylierte Proteine beobachtete geringere elektrophoretische Mobilität die Farnesylierung selbst oder die nachfolgende C-terminale Prozessierung widerspiegelt. Auf jeden Fall hat die partielle C-terminale Modifikation, die bereits vor dem mitochondrialen Import erfolgt sein muß, offenbar keinen Einfluß auf den mitochondrialen Import. Außerdem läßt sich auf dem Immunoblott erkennen, daß Wildtyp und Mutante in vergleichbaren Mengen vorhanden sind.

Beim Vergleich Ydj1p und Ydj1C406S hinsichtlich ihrer Komplementationsfähigkeit zeigte sich, daß die Mutation im Farnesylierungssignal bei mitochondrial lokalisiertem Ydj1C406S sowohl auf glucosehaltigem als auch auf glycerinhaltigem Medium deutlich temperatursensitiver war als der Wildtyp Ydj1p (Abbildung 22).

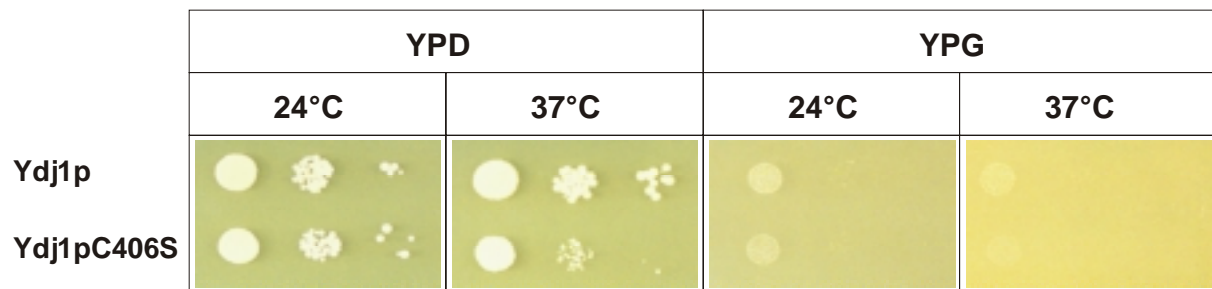


Abbildung 22: Vergleich der Komplementationsfähigkeit von Wildtyp Ydj1p und Mutante Ydj1C406S anstelle von Mdj1p.

Interessanterweise verursacht auch bei zytosolisch lokalisiertem Ydj1p die Inaktivierung des Farnesylierungssignals ein temperatursensitives Wachstum (Caplan et al., 1992). Die Farnesylierung ist offensichtlich sowohl im Zytosol als auch in den Mitochondrien für die Funktionalität des DnaJ-Proteins bei höheren Temperaturen wichtig. Unklar bleibt dennoch, ob der Farnesylrest bei höheren Temperaturen in seiner Rolle als Membrananker die Funktionalität des Proteins unterstützt, oder ob die Farnesylierung eine strukturelle Veränderung im Protein bewirkt, die dessen Temperaturstabilität beeinflusst. Im Western-Blot ließ sich für die Mutante Ydj1C406S ein geringfügig erhöhter proteolytischer Abbau beobachten, was einen Hinweis auf eine geringere Stabilität darstellen könnte.

Nach Substitution des mitochondrialen DnaJ-Proteins, Mdj1p, durch eines der heterologen DnaJ-Proteine DnaJ, Scj1p, Sis1p, Xdj1p bzw. Ydj1p konnte bei allen getesteten Komplementationsmutanten Wachstumsvorteile gegenüber der Deletionsmutante $\Delta mdj1$ beobachtet werden. Alle Komplementationsmutanten konnten zumindest partiell das Wachstum auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin vermitteln bzw. die Temperatursensitivität auf glucosehaltigem Medium unterdrücken. Das Ausmaß der Komplementation des $\Delta mdj1$ Phänotyps durch die heterologen DnaJ-Proteine war jedoch sehr unterschiedlich.

Die beste Komplementation wurde mit DnaJ aus *E. coli* erreicht. DnaJ weist die höchste Aminosäure-Identität zu Mdj1p auf. Anscheinend sind Mdj1p aus Mitochondrien von *S. cerevisiae* und DnaJ aus *E. coli* nicht nur hinsichtlich der Aminosäuresequenz sondern auch funktionell sehr homolog. So kann z.B. Mdj1p gemeinsam mit den *E. coli* Proteinen DnaK und GrpE anstelle von DnaJ die Rückfaltung von Enzymen *in vitro* vermitteln (Deloche et al., 1997a). Interessanterweise gelang jedoch die Komplementation des $\Delta dnaJ$ Phänotyps *in vivo* in *E. coli* durch Mdj1p nur, wenn vorher im C-Terminus von Mdj1p das Cystein-Motiv inaktiviert wurde; eine Überexpression von Wildtyp Mdj1p in *E. coli* war sogar toxisch (Deloche et al., 1997b).

Eine partielle Komplementation des $\Delta mdj1$ Phänotyps konnte ebenfalls durch ein N-terminales Fragment von Mdj1p, bestehend aus der J-Domäne und dem G/F-reichen Linker erreicht werden. Während die Temperatursensitivität bei 37°C auf glucosehaltigem Medium nahezu vollständig durch das N-terminale Fragment unterdrückt werden konnte, war für das respiratorische Wachstum bei 37°C das gesamte DnaJ-Protein mit einem intakten C-terminalen Bereich erforderlich. Offensichtlich stellt das Wachstum auf glycerin- bzw. glucosehaltigen Medien bei erhöhter Temperatur unterschiedliche Anforderungen an das DnaJ-Protein hinsichtlich Qualität bzw. Quantität. Vermutlich trägt der C-terminale Teil des Proteins entscheidend zum respiratorischen Wachstum bei höheren Temperaturen bei. Somit könnte die deutlich geringere Sequenz-Homologie im C-terminalen Bereich der DnaJ-Proteine bei erhöhter Temperatur zunehmend bedeutsam für deren Komplementationsvermögen auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen sein.

Sis1p z.B., das kein Cystein-Motiv besitzt, also im C-terminalen Teil des Proteins die deutlichsten Unterschiede zur Aminosäuresequenz von Mdj1p aufweist, vermittelte neben Scj1p am schlechtesten das respiratorische Wachstum.

Da das getestete N-terminale Fragment von Mdj1p fast vollständig die Abwesenheit von Wildtyp Mdj1p kompensiert, ist es sehr wahrscheinlich, daß auch in Mitochondrien von *S. cerevisiae* das DnaJ-Protein Mdj1p gemeinsam mit einem Hsp70-Partnerprotein agiert und somit ein vollständiges Hsp70-System für die Aufrechterhaltung der respiratorischen Aktivität notwendig ist. Es ist allerdings nicht auszuschließen, daß Mdj1p auch unabhängig von einem Hsp70-System agiert, da inzwischen für das N-terminale Fragment von DnaJ eine intrinsische Chaperoneigenschaft beobachtet werden konnte (Schäffner, 2000; Oehlmann, 2000).

Sollte Mdj1p für seine Rolle beim Wachstum auf glycerinhaltigem Medium bzw. beim Wachstum bei höherer Temperatur (37°C) gemeinsam mit einem Hsp70-Protein agieren, so könnte das Komplementationsvermögen der verwendeten DnaJ-Proteine auch dadurch bestimmt sein, wie gut deren Wechselwirkung mit dem mitochondrialen Hsp70 ist. Das erscheint zumindest insofern sinnvoll, da in den Kompartimenten einer Zelle verschiedene DnaJ-Proteine unter verschiedenen Hsp70-Molekülen das „richtige“ Partnerprotein auswählen müssen. Es wird angenommen, daß jedes DnaJ-Protein für eine bestimmte Funktion mit einem zugehörigen Hsp70-Protein in Wechselwirkung tritt und dessen Funktionalität und Spezifität modelliert (Schlenstedt et al., 1995). Unterstützt wird diese Theorie dadurch, daß sich DnaJ-Proteine gegenseitig nur begrenzt funktionell ersetzen können (Yan und Craig, 1999). So gibt es z.B. in den Mitochondrien von *S. cerevisiae* neben Mdj1p zwei weitere DnaJ-Proteine (Mdj2p und Jac1p), von denen jedoch keines in der Lage ist, den Verlust von Mdj1p zu kompensieren (Westermann und Neupert, 1997; Strain et al., 1998).

Für den Fall, daß Mdj1p in Mitochondrien unabhängig von einem mitochondrialen Hsp70-Protein agiert, könnte die beobachtete unterschiedliche Fähigkeit der heterologen DnaJ-Proteine zur Komplementation durch deren ungenügende Fähigkeit bestimmt sein, eines oder mehrere Substrate spezifisch zu erkennen.

Ebenfalls denkbar wäre, daß die getesteten DnaJ-Proteine innerhalb der Mitochondrien eine geringere Stabilität aufweisen als in ihrer ursprünglichen molekularen Umgebung. Entscheidend für die Funktionalität der heterologen DnaJ-Proteine könnte aber auch deren korrekte Faltung zur nativen Konformation nach dem Import in die Mitochondrien sein. Vor allem für Scj1p ist es - aufgrund der offensichtlich nicht korrekten Prozessierung zum reifen Protein - fraglich, ob in den Mitochondrien die Faltung in die funktionelle Konformation vollständig erfolgen konnte. Möglicherweise ist das ein Grund für das schlechte Komplementationsvermögen von Scj1p.

3. Respiratorische Aktivität der Komplementationsmutanten

In den Komplementationsstudien konnte gezeigt werden, daß alle DnaJ-Proteine und auch die N-terminalen Fragmente von DnaJ und Mdj1p, Wachstum auf glycerinhaltigem Medium zumindest partiell vermitteln können. Alle zur Komplementation verwendeten Proteine sind demnach in der Lage, den in der Nullmutante $\Delta mdj1$ beobachteten Verlust der mitochondrialen DNA auszugleichen.

Im Folgenden sollen die Unterschiede im Wachstumsverhalten der untersuchten Komplementationsmutanten näher untersucht werden.

Eine bewährte Methode, lebende Zellen hinsichtlich ihrer respiratorischen Aktivität zu untersuchen, nutzt die Reduktion von Tetrazoliumsalzen und deren Derivatisierung zu farbigem Formazan. Die in respiratorisch aktiven Mitochondrien bei der oxidativen Phosphorylierung auftretenden Elektronen bewirken eine Reduktion von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid und führen zur Ausbildung eines tiefroten Farbstoffs. Durch Überschichten von Einzelkolonien mit TTC-haltigem Topagar lassen sich respiratorisch aktive Zellen durch ihre rote Färbung von respiratorisch inaktiven Zellen unterscheiden.

Prinzipiell können respiratorisch inaktive Zellen auch daran erkannt werden, daß sie aufgrund einer langsameren Wachstumsrate kleinere Kolonien ausbilden. Dieser auch als *petite* bezeichnete Phänotyp kann sowohl durch Mutationen der nukleären als auch der mitochondrialen DNA hervorgerufen werden und geht häufig mit einem Defekt ($[\rho^-]$) oder Verlust ($[\rho^0]$) des mitochondrialen Genoms einher. Da die Größe von Zellkolonien jedoch auch von anderen Faktoren bestimmt wird, bietet die Anfärbung der Zellen mit TTC eine eindeutigere Identifizierung respiratorisch inaktiver Zellen.

Für die Bestimmung des Anteils atmungskompetenter Zellen in den verschiedenen Komplementationsmutanten wurden die Zellen in glucosehaltigem Minimalmedium 16 h kultiviert. Auf jeweils drei YPD-Platten wurden ca. 100 bis 200 Zellen ausplattiert und diese für zwei Tage bei 24°C inkubiert, bevor sie mit TTC-haltigem Topagar überschichtet wurden. Zwei Stunden nach der Überschichtung mit TTC-Topagar wurden die roten und weißen Zellkolonien ausgezählt und der Anteil atmungsaktiver Kolonien bestimmt.

In Abbildung 23 sind die Ergebnisse aus drei unabhängigen Experimenten zusammengefaßt. Innerhalb der Zellpopulation mit Wildtyp-Mdj1p wurden ca. 10% weiße, also respiratorisch inaktive Kolonien beobachtet. Das entspricht der bei Wildtypzellen beobachteten Rate von

5 – 10%. Mit einem Anteil von ca. 11% weißer Kolonien verhielt sich die Komplementationsmutante mit mitochondrialem DnaJ ähnliche wie Zellen mit Wildtyp-Mdj1p. Zellen mit mitochondrialem Xdj1p und Ydj1p zeigten einen leicht erhöhten Anteil atmungsinkompetenter Zellen, während für Scj1p- bzw. Sis1p-haltige Zellen und für Zellen mit den N-terminalen Fragmenten dieser Anteil, im Vergleich zum Wildtyp, zwei- bis viermal so groß war. Die Frequenz, mit der in den Komplementationsmutanten respiratorisch inaktive Zellkolonien beobachtet wurden, korrelierten mit den Ergebnissen der Wachstumstests.

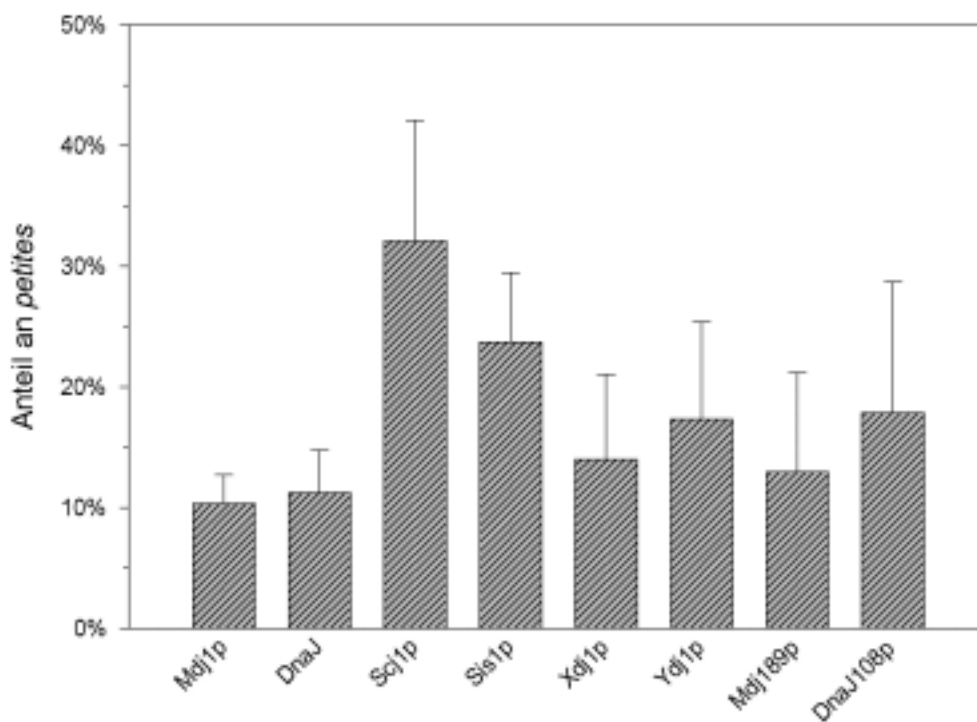


Abbildung 23: *petite* Induktion. Graphische Darstellung der Anteile an Kolonien bildenden Einheiten der verschiedenen Komplementationsmutanten, die bei permissiver Temperatur (24°C) respiratorisch inaktiv waren.

Auffällig war, daß die Intensität der Rotfärbung vor allem bei den Mutanten mit mitochondrialem Scj1p und Sis1p bzw. mit dem N-terminalen Fragment von DnaJ deutlich geringer war als beim Wildtyp. Diese Tatsache deutet auf eine generell verringerte respiratorische Aktivität in diesen Mutanten hin. Außerdem konnte bei den Komplementationsmutanten mit mitochondrialem Scj1p, Sis1p, Xdj1p und Ydj1p sowie mit den N-terminalen Fragmenten eine große Anzahl an Kolonien beobachtet werden, die in Sektoren mit weißer und roter Färbung unterteilt waren.

Der Anteil an atmungskompetenten Zellen in einer Zellpopulation der Komplementationsmutanten korreliert mit den Befunden, die bei dem Wachstumstest auf glycerinhaltigem Medium erhalten wurden. Die homologen DnaJ-Proteine sind mit einem unterschiedlichen Potential in der Lage, respiratorische Aktivität in den Zellen zu gewährleisten. Mutanten, die schlechtes Wachstum auf glycerinhaltigem Medium vermittelten, wurden mit TTC deutlich schwächer angefärbt. Der Anteil an respiratorisch inaktiven Zellen war in Zellpopulationen der Komplementationsmutanten bis zu dreimal höher als unter Wildtypzellen.

4. Untersuchung der mitochondrialen DNA in den Komplementationsmutanten

Komponenten der Atmungskette, die die Voraussetzung für respiratorisches Wachstum bilden, sind sowohl im Kern als auch in den Mitochondrien kodiert. Für kernkodierte Atmungskettenkomponenten kann Mdj1p frühestens nach dem mitochondrialen Import eine Rolle spielen, da es am mitochondrialen Import selbst nicht beteiligt ist (Rowley et al., 1994). Die Biogenese mitochondrial kodierter Atmungskettenkomponenten erfolgt dagegen in ständiger Anwesenheit von Mdj1p. Der erste Schritt ist dabei die Erhaltung der mitochondrialen DNA. Da die Deletion von *MDJ1* zum Verlust der mitochondrialen DNA führt, sollte im Folgenden untersucht werden, ob in den Komplementationsmutanten Unterschiede bezüglich der mitochondrialen DNA beobachtet werden können (Rowley et al., 1994).

4.1. Anfärbung der mitochondrialen DNA mit DAPI

Mit DAPI, einem DNA-bindenden Fluoreszenzfarbstoff, kann die mitochondriale DNA neben dem Zellkern in Form kleiner Mikrosatelliten sichtbar gemacht werden. Diese Mikrosatelliten stellen Anhäufung von Mitochondrien im Zytoskelet dar, in deren Inneren DNA-Protein-Komplexe, die sogenannten mitochondrialen Nucleoide oder Chondriolyten, durch DAPI angefärbt wurden.

Für die Anfärbung der mitochondrialen DNA in Hefezellen wurden diese bei 24°C in glucosehaltigem Minimalmedium 16 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf einem

Objektträger fixiert und mit DAPI inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde ausgewaschen und die Präparate unter einem Fluoreszenzmikroskop analysiert (Abbildung 24).

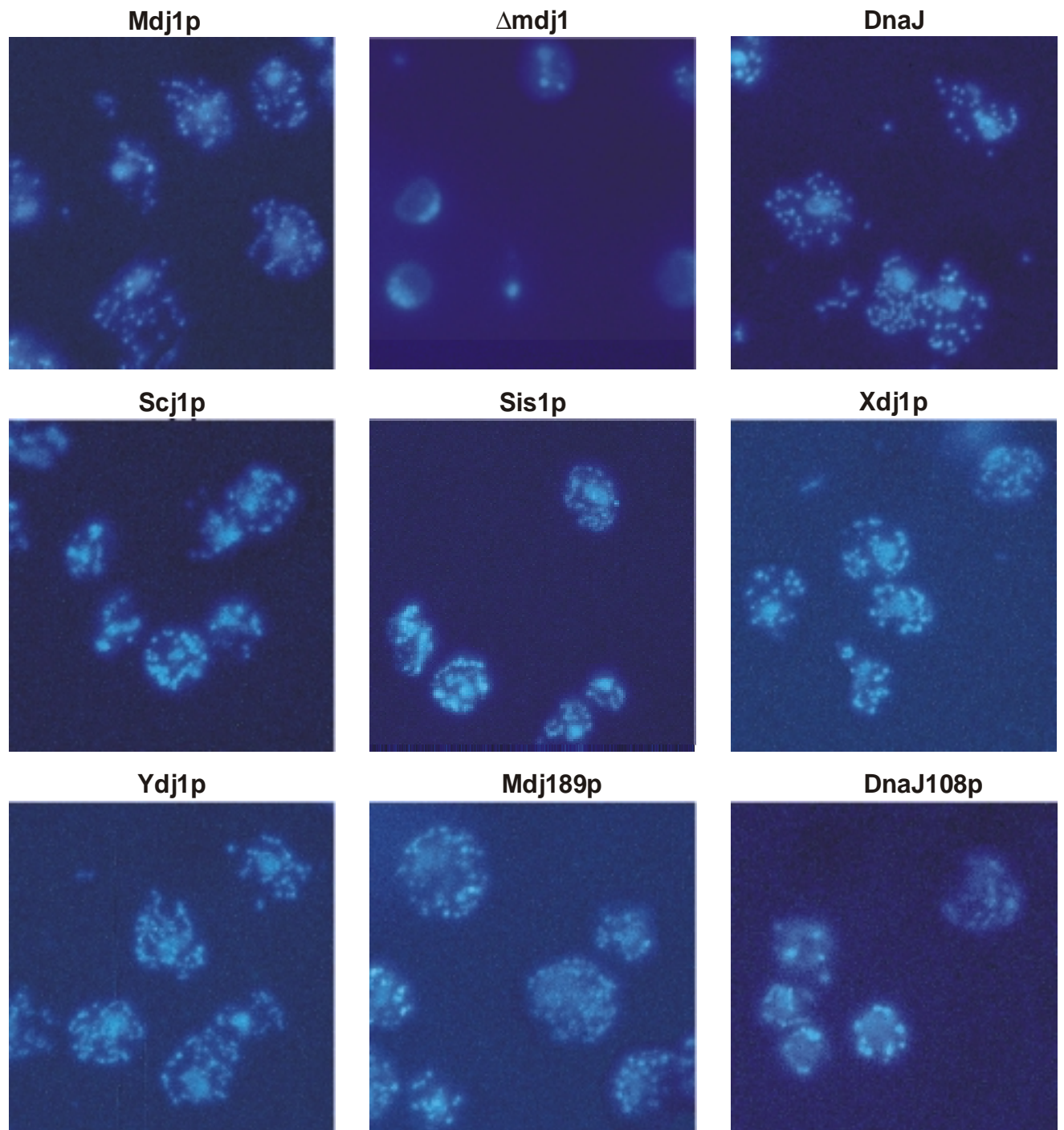


Abbildung 24: Repräsentative Bildausschnitte von DAPI-gefärbten Präparaten von den verschiedenen Komplementationsmutanten und der Nullmutante, $\Delta mdj1$.

Für den Wildtyp und alle anderen Komplementationsmutanten wurde neben einem dominanten Signal, welches vom DNA-haltigen Zellkern verursacht wird, extrachromosomale DNA beobachtet. Überraschend war, daß keine auffälligen Unterschiede in der Verteilung oder in der Menge der Mikrosatelliten bei den einzelnen Komplementationsmutanten zu beobachten waren. Vielmehr glichen alle Mutanten dem Wildtyp. Auch die in ihrer respiratorischen Aktivität stark eingeschränkten Mutanten, die Scj1p bzw. Sis1p anstelle von Mdj1p enthielten, enthielten Mikrosatelliten in vergleichbarer Anzahl und Verteilung wie der Wildtyp.

Somit konnte bei keiner der Komplementationsmutanten bezüglich der mitochondrialen DNA Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp beobachtet werden, die eine unterschiedliche Komplementationsfähigkeit der Mutanten erklären könnten. Allerdings ist eine quantitative Aussage über den DNA-Gehalt mit dieser Methode nur sehr begrenzt möglich. Auch Veränderungen innerhalb der Sequenz der mitochondrialen DNA können mit diesem Experiment nicht nachgewiesen werden.

Einen interessanten Befund lieferte dagegen die Untersuchung der Nullmutante $\Delta mdj1$. Entgegen den Aussagen aus früheren Arbeiten, die über einen totalen Verlust der mitochondrialen DNA berichtet hatten, konnten, obwohl die gesamte Zellpopulation respiratorisch inaktiv war, in einzelne Zellen Chondriolyten beobachtet werden (Abbildung 25).

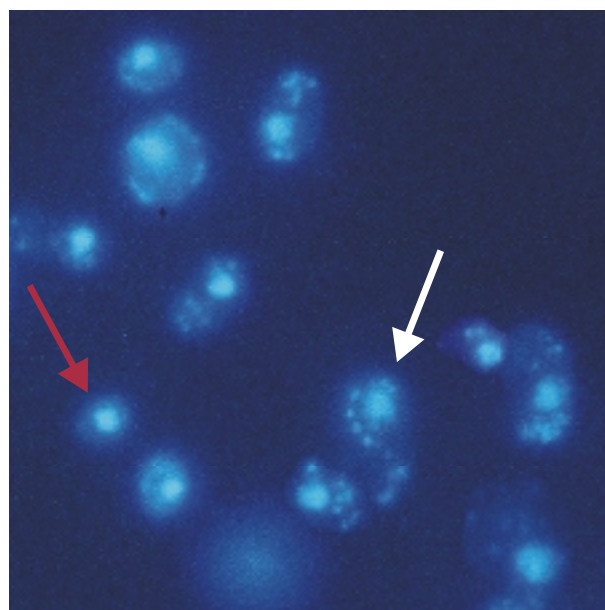


Abbildung 25: DAPI-gefärbtes Präparat der Nullmutante $\Delta mdj1$ (YTLO). Durch einen roten bzw. weißen Pfeil wurden Zellen markiert, die eindeutig keine bzw. Reste mitochondrialer DNA aufweisen.

Diese Tatsache deutet darauf hin, daß in der $\Delta mdj1$ -Nullmutante nicht-funktionelle mitochondriale DNA über mehrere Generationen erhalten geblieben war. Daß $\Delta mdj1$ -Mutanten tatsächlich Reste mitochondrialer DNA enthielten, konnte mittels Southernblot nachgewiesen werden. Dazu wurde Gesamtzell-DNA aus Wildtyp (YTL3MSMdj1) und Nullmutante ($\Delta mdj1$) isoliert, mit *Xba*I-verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Bei der Hybridisierung einer mitochondrialen Sonde mit Wildtyp-DNA wurde nur ein diskretes Signal beobachtet. Im Fall der Nullmutante hybridisierte die Sonde dagegen an mehrere kleine Fragmente, was ein deutlicher Hinweis darauf war, daß Reste mitochondrialer DNA in der Nullmutante erhalten geblieben waren (vgl. Abbildung 26).

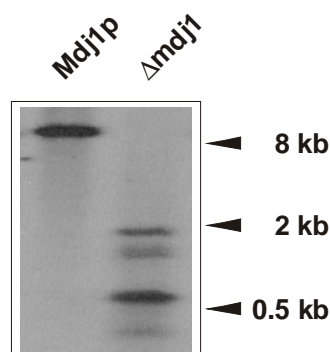


Abbildung 26: Nachweis von Resten mitochondrialer DNA in der Nullmutante $\Delta mdj1$. Gesamtzell-DNA von YTL3MSMdj1 (mdj1p) und der Nullmutante ($\Delta mdj1$) wurde mit *Xba*I verdaut, elektrophoretisch aufgetrennt, geblotet und anschließend mit einer radioaktiv markierten *ori5*-Sonde hybridisiert.

Inzwischen konnte sogar mitochondriale DNA von unabhängig isolierten, neu erzeugten $\Delta mdj1$ -Klonen mittels CsCl-Gradient charakterisiert werden. Dabei wurden nach Verdau mit *Eco*RI verschiedene zum Wildtyp stark degenerierte Schnittmuster beobachtet (Duchniewicz et al., 1999). Es wurde deshalb geschlußfolgert, daß der Prozeß, der letztlich zum Verlust des mitochondrialen Genoms führt, über mehrere Generationen stetig voranschreitet. Die Veränderung der mitochondrialen DNA und somit die Unfähigkeit zu respiratorischem Wachstum scheint unmittelbar nach dem Verlust des mitochondrialen Mdj1p einzusetzen. Einzelne Zellen können jedoch über mehrere Generationen hinweg Reste an mitochondrialer DNA erhalten.

4.2. Transformation von YTL3MSScj1 und YTL3MSSis1 mit einem MDJ1-Allel

Durch DAPI-Färbung konnte die Anwesenheit mitochondrialer DNA auch für die Komplementationsmutanten YTL3MSScj1 und YTL3MSSis1 gezeigt werden, die in ihrer Fähigkeit, respiratorisch zu wachsen, stark eingeschränkt waren. Es stellte sich daher die Frage, ob es sich bei der beobachteten mitochondrialen DNA um ein funktionelles mitochondriales Genom handelte. Wenn diese Mutanten tatsächlich die korrekte genetische Information für alle mitochondrial kodierten Proteine enthielten, so sollte es möglich sein, nach Zugabe von Wildtyp-Mdj1p die respiratorische Aktivität in vollem Umfang zurückzugewinnen.

Dazu wurden kompetente Zellen der Komplementationsmutanten YTL3MSScj1 und YTL3MSSis1 durch Elektroporation mit pMDJ315 [*MDJ1*, *LEU2*, *CEN*] transformiert. Die erhaltenen Transformanten wurden wie im Abschnitt 2.7 beschrieben, auf ihre Fähigkeit hin untersucht, fermentierbare und nicht-fermentierbare Kohlenstoffquellen bei 24°C bzw. 37°C zu verstoffwechseln. Alle getesteten Transformanten waren in der Lage, ähnlich wie der Wildtyp auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle zu wachsen. Außerdem konnte durch die zusätzliche Anwesenheit von Mdj1p die Temperatursensitivität der Komplementationsmutanten unterdrückt werden (vgl. Abbildung 27).

Scj1p und Sis1p sind demnach in der Lage die Propagierung eines funktionellen mitochondrialen Genoms zu vermitteln.

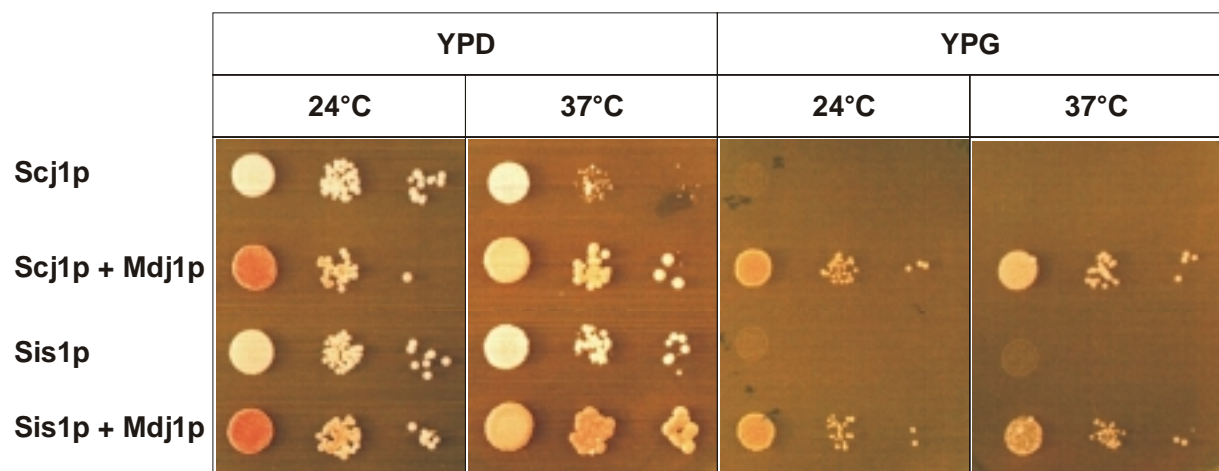


Abbildung 27: Vergleich des Wachstums von YTL3MSScj1 und YTL3MSSis1 vor und nach Transformation mit pMDJ315, welches das Gen für Wildtyp Mdj1p trägt.

4.3. Analyse der mitochondrialen DNA im Southern-Blott

In *S. cerevisiae* findet man in Abhängigkeit von den Kultivierungsbedingungen eine deutlich variierende Anzahl an Mitochondrien pro Zelle. Während fermentierende Hefen teilweise nur ein bis zwei Mitochondrien besitzen, tragen atmende Hefen bis zu 300 Mitochondrien, die bis zu 20% des Zellvolumens einnehmen können. Jedes Mitochondrium enthält dabei mehrere Kopien des mitochondrialen Genoms. Die Besonderheiten der mitochondrialen DNA-Replikation und der Weitergabe der Mitochondrien an Tochterzellen verursachen oft heterogene Populationen an mitochondrialer DNA innerhalb einer Zelle. Demnach wäre es möglich, daß die Beeinträchtigung des respiratorischen Wachstums in einigen Komplementationsmutanten darauf beruht, daß neben funktionsfähigen Mitochondrien auch Mitochondrien existieren, die durch Akkumulation von mitochondrialen Mutationen nicht mehr zur Respiration beitragen können.

Mit den bisher verwendeten experimentellen Ansätzen ließen sich derart veränderte Zellen nicht erkennen. Durch Anfärbung der Zellen mit DAPI würde nur eine drastische Verringerung der mitochondrialen DNA detektiert werden können. Auch bei der Transformation von Komplementationsmutanten mit einem *MDJ1*-Allel würde das Vorhandensein eines einzigen intakten mitochondrialen Genomes in einer Transformante genügen, um durch einen Wachstumsvorteil die beobachtete Restaurierung des Wildtyp-Phänotyps zu bewirken. Deshalb sollte durch eine genauere Analyse mittels Southernblot überprüft werden, ob die mitochondriale DNA der Komplementationsmutanten qualitative bzw. quantitative Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp aufweist.

Zunächst wurde Gesamtzell-DNA nach Kultivierung der Zellen bei 24°C in Minimalmedium isoliert. Nach Restriktionsverdau mit *HindIII* bzw. *XbaI* wurde die Gesamtzell-DNA elektrophoretisch über ein 0.8%iges Agarosegel aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Anschließend erfolgte die Hybridisierung mit nukleären bzw. mitochondrialen Sonden. Als mitochondriale Sonde diente ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment, welches den Replikationsorigin *ori5* enthielt. Das Plasmid mit der *ori5*-DNA-Sequenz wurde freundlicherweise von Dr. Benedikt Westermann zur Verfügung gestellt.

Während bei der Nullmutante mit der *ori5*-Sonde kein Signal erhalten wurde, konnte bei allen Komplementationsmutanten und dem Wildtyp mitochondriale DNA nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 28). Im Vergleich zum Wildtyp wiesen die detektierten DNA-

Fragmente der Komplementationsmutanten nach *Xba*I-Verdau keine Unterschiede in ihrer elektrophoretischen Mobilität auf.

Zur Kontrolle wurde die gleiche DNA-Präparation mit *Hind*III verdaut und mit einer nukleären Sonde, die ein radioaktiv markiertes DNA-Fragment des *MGE1*-Gens enthielt, hybridisiert. Mit dieser Sonde wurde bei allen DNA-Proben ein Fragment mit der erwarteten Größe von ca. 2500 bp detektiert.

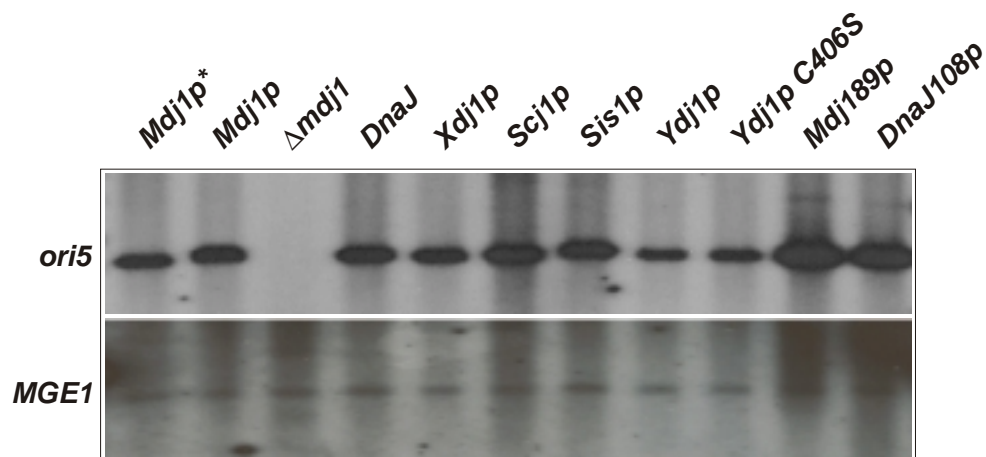


Abbildung 28: Untersuchung der mitochondrialen DNA der Komplementationsmutanten in Gesamtzell-DNA Präparationen mittels Southern-Blott. Aufgetragen wurde von links nach rechts jeweils ca. 10 µg Gesamtzell-DNA von: Wildtyp *MdjA*⁺, YTL3MSMdj1, YTL0, YTL3MSDnaJ, YTL3MSXdj1, YTL3MSScj1, YTL3MSSis1, YTL3MSYdj1, YTL3MSYdj1_s, YTL3MSM189 und YTL3MSD108. Die für die Hybridisierung verwendeten Sonden sind links in der Abbildung angegeben.

Die unterschiedlichen Intensitäten der beobachteten Hybridisierungssignale wurden auch in den Ethidiumbromid gefärbten Agarosegelen detektiert. Sie widerspiegeln daher eher eine ungleiche Gelbeladung, als einen unterschiedlichen Gehalt an mitochondrialer DNA in den Präparationen der Gesamtzell-DNA. Demnach sind in allen Komplementationsmutanten und in Zellen mit Wildtyp-*Mdj1p* vergleichbare Mengen an mitochondrialer DNA vorhanden.

Um diese Schlußfolgerung zu bestätigen wurde außerdem isolierte mitochondriale DNA untersucht. Dazu wurde mitochondriale DNA, die über einen CsCl-Gradienten gereinigt worden war, mit dem Restriktionsenzym *Hind*III verdaut und parallel mit drei mitochondrialen Sonden hybridisiert (vgl. Abbildung 29). Die Sonden enthielten die drei mitochondrialen DNA-Replikationsursprünge *ori2*, *ori3* und *ori5*. Diese drei DNA-Sequenzen, die auf dem mitochondrialen Genom weit genug auseinander liegen, sollten es ermöglichen, größere Deletionen bzw. Umlagerungen innerhalb des mitochondrialen Genomes mit Hilfe von

Hybridisierungsexperimenten zu detektieren. Die für die Herstellung der Sonden verwendeten Plasmide, wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Françoise Foury von der UCL in Lovaine la Neuf (Belgien) zur Verfügung gestellt.

Mit keiner der getesteten mitochondrialen Sonden konnten im Southern-Blott Veränderungen an der mitochondrialen DNA detektiert werden. Weder in der Anzahl noch in der elektrophoretischen Mobilität der detektierten DNA-Fragmente konnten Unterschiede zwischen den Komplementationsmutanten und dem Wildtyp beobachtet werden.

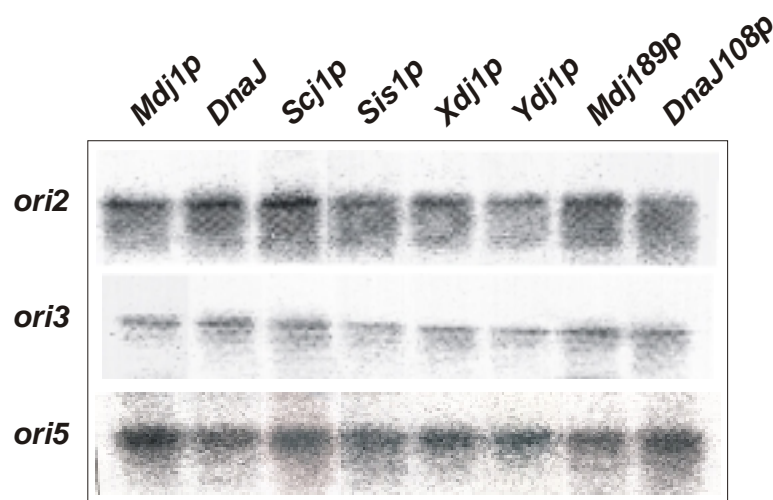


Abbildung 29: Untersuchung isolierter mitochondrialer DNA der Komplementationsmutanten mittels Southern-Blott. Aufgetragen wurden gleiche Mengen (ca. 1 µg) an isolierter mitochondrialer DNA nach Verdau mit dem Restriktionsenzym *HindIII*. Von links nach rechts: YTL3MSMdj1, YTL3MSDnaJ, YTL3MSScj1, YTL3MSSis1, YTL3MSXdj1, YTL3MSYdj1, YTL3MSM189 und YTL3MSD108. Die Hybridisierung erfolgte mit den links in der Abbildung angegebenen Sonden.

Alle Komplementationsmutanten konnten die Vererbung eines intakten mitochondrialen Genoms vermitteln. Weder durch Anfärbung der DNA mittels DAPI, noch durch Southernblot-Analysen konnten Unterschiede hinsichtlich der Qualität bzw. der Quantität der mitochondrialen DNA in den Komplementationsmutanten beobachtet werden, mit der sich deren unterschiedliche Fähigkeiten, Glycerin als einzige Kohlenstoffquelle zu verwerten, erklären ließe. Demzufolge ist die unterschiedliche Befähigung der Komplementationsmutanten zu respiratorischem Wachstum anscheinend nicht auf die mitochondriale DNA zurückzuführen. Eine direkte Funktion von Mdj1p bei der Propagierung des mitochondrialen Genoms ist damit unwahrscheinlich.

Zellen mit einem intakten mitochondrialen Genom [rho^+] besaßen nach Deletion von *MDJ1* bei 24°C zunächst Mutationen im mitochondrialen Genom [rho^-], bevor sie die mitochondriale DNA komplett verloren [rho^0].

Interessant ist in diesem Zusammenhang, daß ein artifizielles hypersuppressives mitochondriales Genom [HSrho^-] in Δmdj1 -Nullmutanten bei 24°C stabil erhalten bleibt; erst bei einer Temperatur von 37°C geht dieses hypersuppressive Genom [HSrho^-] verloren (Duchniewicz et al., 1999). Der Verlust des hypersuppressiven Genoms konnte auf eine drastisch verminderte Aktivität der mitochondrialen DNA-Polymerase zurückgeführt werden (Duchniewicz et al., 1999). Daraufhin wurde für Mdj1p eine Rolle als Chaperon für die mitochondriale DNA-Polymerase bei erhöhter Temperatur postuliert. Ungeklärt bleibt aber die Rolle, die Mdj1p bei niedrigeren Temperaturen von etwa 24°C erfüllt.

5. Synthese mitochondrial kodierter Proteine in den Komplementationsmutanten

Nachdem für alle Komplementationsmutanten mitochondriale DNA nachgewiesen werden konnte, sollte im folgenden die Synthese der mitochondrial kodierten Komponenten der Atmungskette vergleichend untersucht werden. Dazu wurde sowohl die Transkription als auch die Translation in den Komplementationsmutanten und im Wildtyp analysiert.

Insgesamt werden neben den beiden Untereinheiten des mitochondrialen Ribosoms (21S und 15S), der 9S Komponente der RNase P und den verschiedenen tRNAs acht Proteine innerhalb der Mitochondrien synthetisiert (Foury et al., 1998). Sieben dieser Proteine sind Komponenten der Atmungskette (CoxI, CoxII, CoxIII, Atp6, Atp8, Atp9 und Cytb). Das achte Protein ist ein ribosomal assoziiertes Protein (Var1).

5.1. Mitochondriale Transkription in den Komplementationsmutanten

Ein möglicher Einfluß der DnaJ-Proteine auf die Transkription sollte mittels Northern-Blot-Experimenten untersucht werden. Dazu wurde die zelluläre RNA der verschiedenen Komplementationsmutanten, des Wildtyps sowie der Nullmutante isoliert, elektrophoretisch aufgetrennt und auf einer Nylonmembran immobilisiert. Zur Detektion mitochondrialer

Transkripte wurden radioaktiv markierte Sonden gegen die Untereinheiten I und II der Cytochrom-C-Oxidase (*COXI* und *COXII*) für die Hybridisierung eingesetzt. Die zur Herstellung der Sonden verwendeten Plasmide wurden freundlicherweise von Prof. Dr. Françoise Foury (UCL, Belgien) zur Verfügung gestellt.

Während bei der Nullmutante, wie erwartet, keine Transkripte von *COXI* bzw. *COXII* detektierbar waren, konnte beim Wildtyp und bei allen Komplementationsmutanten nach Hybridisierung mit einer *COXI*-Sonde ein 2,1 kb-Fragment und mit einer *COXII*-Sonde ein 0.9 kb-Fragment nachgewiesen werden (vgl. Abbildung 30 und Abbildung 31).

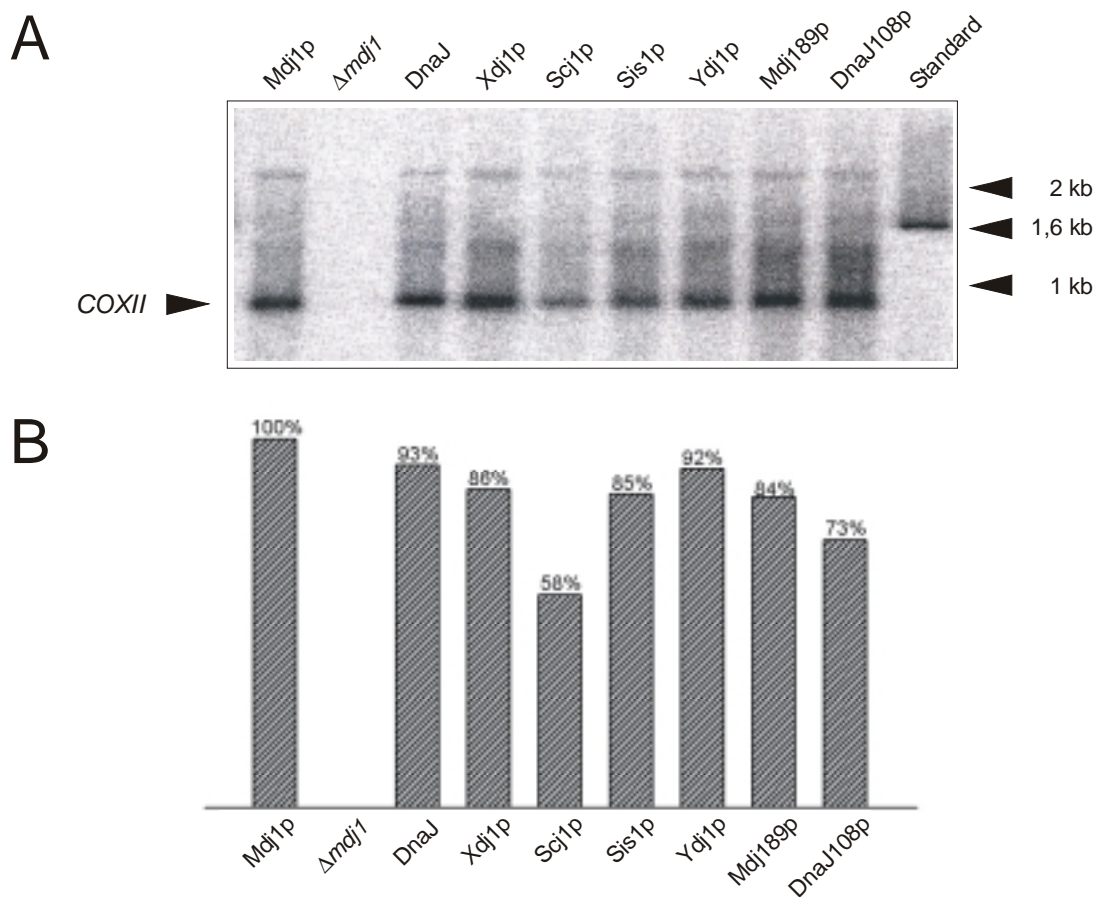


Abbildung 30: **A)** Untersuchung der mitochondrialen RNA der Komplementationsmutanten mittels Northern-Blott. Die Gesamtzell-RNA der verschiedenen Komplementationsmutanten wurde isoliert, elektrophoretisch in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *COXII* hybridisiert. Aufgetragen wurden von links nach rechts gleiche Mengen an isolierter mitochondrialer RNA von: YTL3MSMdj1, YTL0, YTL3MSDnaJ, YTL3MSXdj1, YTL3MSScj1, YTL3MSSis1, YTL3MSYdj1, YTL3MSM189 und YTL3MSD108. **B)** Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms. Das Signal der *COXII*-mRNA aus Mdj1p-haltigen Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Die beobachteten Fragmentgrößen entsprachen den für reife mRNA von *COXI* bzw. *COXII* bekannten Werten. Allerdings wurden deutlich unterschiedliche Mengen an mRNA in den verschiedenen Komplementationsmutanten beobachtet. Die Quantifizierung der Signalintensitäten der reifen mRNAs widerspiegelte für beide Transkripte das Wachstumsverhalten auf nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquellen. Diese Korrelation war bei *COXI* noch deutlicher ausgeprägt als bei *COXII*.

Die geringste Transkriptionsausbeute wurde bei Zellen mit mitochondrialem *Scj1p* beobachtet.

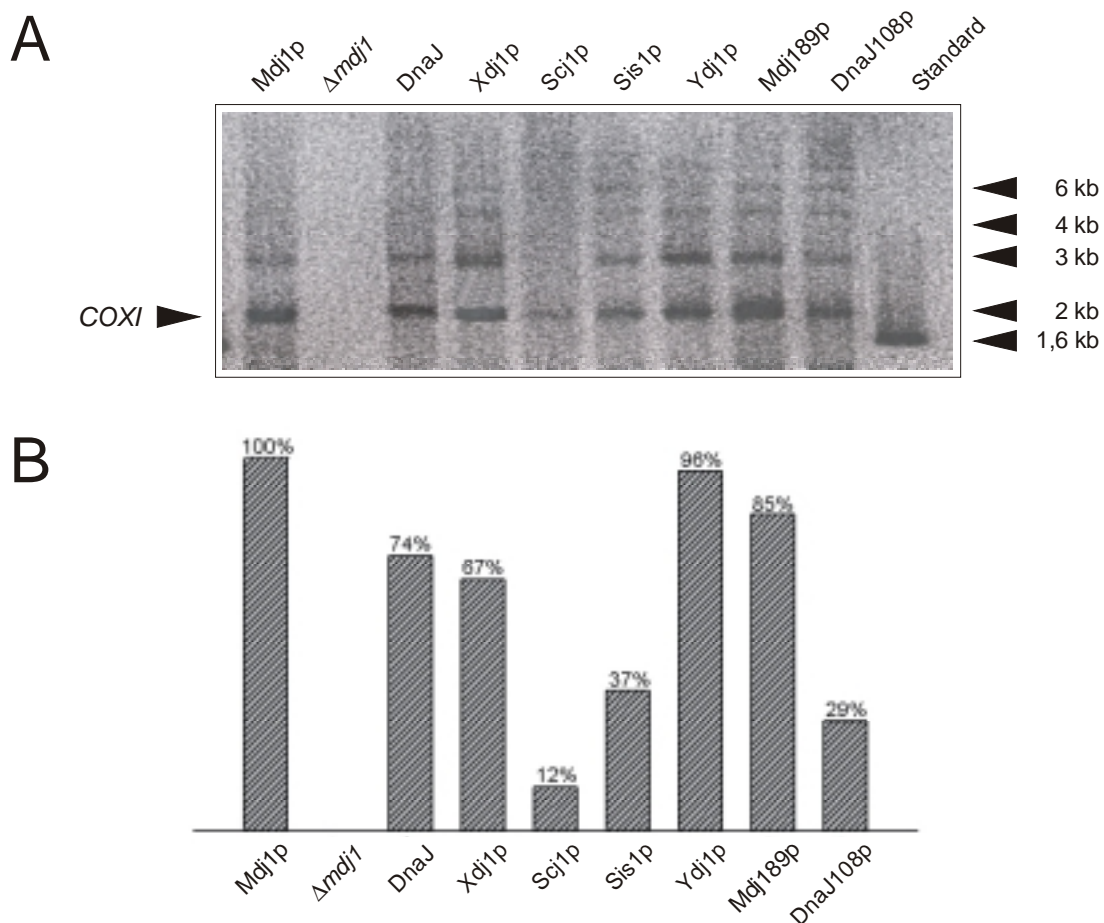


Abbildung 31: **A)** Untersuchung der mitochondrialen RNA der Komplementationsmutanten mittels Northern-Blott. Die Gesamtzell-RNA der verschiedenen Komplementationsmutanten wurde isoliert, elektrophoretisch in einem 1.2%igen Agarosegel aufgetrennt, auf eine Nylonmembran übertragen und mit einer radioaktiv markierten Sonde gegen *COXI* hybridisiert. Aufgetragen wurden von links nach rechts gleiche Mengen an isolierter mitochondrialer RNA von: YTL3MSMdj1, YTL0, YTL3MSDnaJ, YTL3MSXdj1, YTL3MSScj1, YTL3MSSis1, YTL3MSYdj1, YTL3MSM189 und YTL3MSD108. **B)** Densitometrische Auswertung des Autoradiogramms. Das Signal der *COXI*-mRNA aus Mdj1p-haltigen Zellen wurde auf 100% gesetzt.

Bezogen auf die Menge an Transkripten, die in Anwesenheit von Mdj1p synthetisiert wurden, lieferte Scj1p nur 12% mRNA für *COXI* bzw. 58% mRNA für *COXII*, eine Tatsache, die deutlich mit dem schlechten Wachstum dieser Zellen auf glycerinhaltigem Medium korrelierte.

Zusätzlich ließen sich nach Hybridisierung mit der *COXI*-Sonde - mit Ausnahme von DnaJ - bei allen Komplementationsmutanten mRNA-Moleküle mit geringerer elektrophoretischer Mobilität beobachten, die Zwischenprodukte der mRNA-Prozessierung darstellten.

Nur Apocytochrom-b und *COXI* werden in den Mitochondrien als intronhaltige Primärtranskripte synthetisiert. Das Primärtranskript von *COXI* enthält dabei sieben Introns, von denen einige RNA-Maturasen kodieren, die für die Reifung der mRNA von *COXI* notwendig sind. Eine Akkumulation von unvollständig prozessierten Transkripten deutet auf eine Beeinträchtigung der Reifung der mRNA hin.

Demnach beeinflussen die zur Komplementation eingesetzten DnaJ-Proteine zum einen die Gesamtausbeute an *COXI*- und *COXII*-mRNA und zum anderen die Reifung des Primärtranskriptes von *COXI*.

Interessanterweise rufen Mutationen in Proteasen der mitochondrialen Matrix ähnliche Defekte bei der Synthese und Reifung mitochondrialer mRNAs hervor. So hatte beispielsweise die Deletion von Yta10p oder Yta12p – beide Proteine sind Untereinheiten der in der inneren mitochondrialen Membran verankerten ATP-abhängigen *m*-AAA-Protease – eine Akkumulation der Primärtranskripte von *COXI* und *CYTb* zur Folge. Es wurde gezeigt, daß die zur Reifung der mRNAs notwendigen intronkodierte Maturasen die Anwesenheit von Yta10p bzw. Yta12p erfordern (Arlt et al., 1998). Auch die Deletion von Pim1p, einer weiteren ATP-abhängigen Protease in der mitochondrialen Matrix, beeinträchtigt die Reifung der mRNA von *COXI* und *CYTb*. Für eine überlappende Funktion der beiden Proteasen spricht, daß durch Überexpression von *PIM1* der Verlust an Yta10p und Yta12p kompensiert werden kann (van Dyck et al., 1998).

Sowohl Yta10p und Yta12p als auch Pim1p kontrollieren den Proteinumsatz innerhalb der mitochondrialen Matrix. Außerdem sind sie an der Assemblierung der Komponenten der Atmungskette maßgeblich beteiligt. Die pleiotropen Phänotypen der Nullmutanten $\Delta yta10$, $\Delta yta12$ und $\Delta pim1$ äußern sich in der gleichen Weise wie die Nullmutante $\Delta mdj1$. Bei jeder dieser Nullmutanten wird der Verlust der mitochondrialen DNA und somit der Fähigkeit zu respiratorischem Wachstum beobachtet. In allen diesen Mutanten ist eine Störung der Transkription bzw. der Reifung von Primärtranskripten mit dem Verlust der mitochondrialen DNA gekoppelt. Über den genauen Zusammenhang, der zwischen der defekten

Transkription und dem Erhalt der mitochondrialen DNA besteht, kann derzeit nur spekuliert werden. Dabei wird zwar nicht ausgeschlossen, daß die Proteasen einen direkten regulatorischen Effekt auf den Metabolismus der mitochondrialen DNA ausüben, es ist aber eher wahrscheinlich, daß diese Proteasen durch die Akkumulation von mißgefalteten Polypeptiden einen indirekten Einfluß auf den Erhalt der mitochondrialen DNA ausüben. Von besonderem Interesse ist in diesem Zusammenhang, daß für Pim1p und die *m*-AAA-Protease gezeigt werden konnte, daß sie beim Abbau von mißgefalteten Polypeptiden mit dem mitochondrialen Hsp70-System - also auch mit Mdj1p - kooperieren (Wagner et al., 1994; van Dyck et al., 1998; Savel'ev et al., 1998).

5.2. Mitochondriale Translation in den Komplementationsmutanten

Die mitochondriale Proteinsynthese kann getrennt von der zytosolischen Proteinsynthese untersucht werden. Dabei wird die Tatsache ausgenutzt, daß - gemäß der Endosymbiontentheorie - der mitochondriale Syntheseapparat dem prokaryontischen verwandt ist und sich von dem zytosolischen durch seine Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Cycloheximid auszeichnet. Somit kann mittels Cycloheximid die zytosolische Translation inhibiert werden und eine separate Analyse der mitochondrialen Translationsprodukte *in vivo* erfolgen.

Durch die Analyse der mitochondrialen Proteintranslation sollte Aufschluß darüber gewonnen werden, ob die beobachtete reduzierte Menge an reifer mRNA für *COXI* und *COXII* sich limitierend auf die Synthese dieser beiden Proteine auswirkt.

Die Zellen der verschiedenen Komplementationsmutanten wurden zunächst in Minimalmedium bei 24°C bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0.3$ kultiviert, bevor die Synthese von kernkodierten Proteinen durch Zugabe von Cycloheximid inhibiert wurde. Anschließend erfolgte während einer 15-minütigen Inkubation mit ^{35}S -L-Methionin die Markierung der mitochondrialen Translationsprodukte. Zur Bewertung der mitochondrialen Translation in den Komplementationsmutanten wurden die Gesamtzellextrakte mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. Die Signale der radioaktiv markierten Syntheseprodukte wurden mittels Autoradiographie detektiert. Außerdem wurde durch anschließende Immunodekoration der Nitrocellulosemembran mit einem Antikörper gegen das mitochondriales Hsp70 (Ssc1p) bestätigt, daß vergleichbare Mengen an mitochondrialen Extrakten auf der Membran immobilisiert waren (nicht

abgebildet). Die mitochondriale Proteinsynthese wurde sowohl bei 24°C als auch bei 37°C verfolgt.

Bei 24°C wurden die acht mitochondrialen Proteine bei allen Komplementationsmutanten synthetisiert (vgl. Abbildung 32 A). Dennoch wurden deutliche quantitative Unterschiede beobachtet. Nur Var1, ein Protein, welches mit dem mitochondrialen Ribosom assoziiert ist, wurde bei 24°C in allen Extrakten annähernd gleich stark detektiert. Dagegen widerspiegelten vor allem die Signale von CoxI und CoxII das Komplementationsvermögen der jeweiligen Mutanten. Zellen mit mitochondrialem Scj1p bzw. Sis1p zeigten bei allen Syntheseprodukten die schwächsten Signale.

Auffällig war, daß bei allen Komplementationsmutanten - auch bei der Mutante mit mitochondrialem DnaJ, für die wildtypähnliches Wachstumsverhalten gezeigt werden konnte - im Vergleich zum Wildtyp die relativen Mengen der einzelnen Syntheseprodukte untereinander verschieden waren. Das bedeutet, daß beispielsweise Zellen mit Wildtyp Mdj1p neben Var1 und CoxIII auch CoxII ein sehr starkes Signal zeigte. Im Unterschied dazu wurden bei den Komplementationsmutanten vor allem für Cytb und ATPase6 prominente Signale beobachtet. Das Signal für CoxII war bei allen Komplementationsmutanten nur äußerst schwach detektierbar. Im Vergleich zu Zellen mit Wildtyp Mdj1p wurde demnach von den Komplementationsmutanten mehr Cytb bzw. ATPase6 und deutlich weniger CoxI bzw. CoxII synthetisiert.

Vergleicht man nun die Mengen an synthetisiertem CoxI und CoxII mit der Menge der entsprechenden mRNA-Transkripte, so fällt auf, daß wesentlich weniger Protein detektiert wurde als entsprechend der Menge an Transkripten zu erwarten war. So wurden beispielsweise für die Komplementationsmutante mit mitochondrialem DnaJ im Vergleich zu Mdj1p ca. 70% COXI- und ca. 90% COXII-Transkripte gefunden. Dagegen wurden bei der *in vivo* Translation im Vergleich zu Mdj1p für die DnaJ-haltige Komplementationsmutante für CoxI weniger als 10% und für CoxII ca. 20% Signalintensität detektiert.

Noch weitaus deutlicher konnten diese Veränderungen bei der Analyse der bei 37°C durchgeführten Proteinsynthese beobachtet werden (Abbildung 32 B). Die Zellen wurden dazu wie oben beschrieben bis zu einer optischen Dichte von $OD_{600} = 0.3$ bei 24 °C vorkultiviert. Für die anschließende Markierungsreaktion wurden die Zellen bei 37°C inkubiert.

Nur bei Zellen mit Wildtyp Mdj1p wurden nach wie vor alle Syntheseprodukte beobachtet. Von allen Komplementationsmutanten zeigten DnaJ und das N-terminale Fragment von Mdj1p die höchste Translationsaktivität. Das entsprach ihrem Vermögen, Mdj1p beim

Wachstum auf glycerinhaltigen Medien auch bei 37°C zu ersetzen. Überraschend war jedoch, daß, obwohl DnaJ wildtypähnliches Wachstum bei 37°C vermitteln kann, die Menge an CoxI dennoch zu gering war, um in diesem Experiment detektiert zu werden.

Interessanterweise wurde - wie bei 24°C - auch bei 37°C das ribosomale Protein Var1 von allen Komplementationsmutanten in vergleichbaren Mengen synthetisiert. Dagegen konnte bei den meisten Komplementationsmutanten bei dieser Temperatur CoxI und CoxII nicht mehr detektiert werden. Deutlich vermindert war neben CoxI und CoxII auch die Synthese von CoxIII und ATPase6. Dieser Unterschied zeigte sich bei der Mutante mit mitochondrialem Ydj1p am deutlichsten.

Zusätzlich waren - wie bereits bei 24°C beobachtet - die Mengenverhältnisse der synthetisierten mitochondrialen Proteine bei den Komplementationsmutanten verschieden zum Wildtyp. Für Cytb und ATPase6 wurden in den Komplementationsmutanten auch bei 37°C im Vergleich zum Wildtyp verhältnismäßig starke Signale beobachtet.

Durch eine *in vivo* Markierung der mitochondrialen Translationsprodukte, wie in diesem Experiment, wird ausschließlich ein Zeitfenster zwischen 20 und 30 min berücksichtigt. Dieser Zeitraum widerspiegelt hauptsächlich die Syntheserate. Ob sich eine verminderte Syntheserate aber tatsächlich auf eine geringere Menge dieser Proteine in der Zelle auswirkt, kann durch immunologische Detektion nachgewiesen werden.

Hierfür wurden Gesamtzellextrakte der Komplementationsmutanten, die bei 24°C kultiviert worden waren, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach Übertragung auf eine Nitrocellulose-Membran der Gehalt an CoxII und CoxIII mittels spezifischer Antikörper analysiert (vgl. Abbildung 33). Um zu zeigen, daß alle Zellextrakte gleiche Mengen an mitochondrialem Protein enthielten, wurde parallel eine Immunodekoration mit einem Antikörper gegen Mge1p durchgeführt.

Die Immunodekoration mit Antikörpern gegen CoxII zeigte deutliche Unterschiede im Gehalt an CoxII in den untersuchten Zellextrakten. Wildtypzellen enthalten mit Abstand die größte Menge an CoxII. In den Stämmen, die DnaJ bzw. die J-Domäne von Mdj1p an Stelle von Mdj1p enthielten, konnten nur noch äußerst schwache Signale für CoxII detektiert werden. Für alle anderen Mutanten lag die Menge an CoxII unterhalb der Nachweisgrenze. Der Gehalt an CoxII reflektiert somit das Resultat der *in vivo* Translation.

Die Bande, die oberhalb von CoxII im Western-Blot detektiert wurde, wurde durch eine Kreuzreaktion mit einem offensichtlich nicht-mitochondrial kodierten Protein hervorgerufen, da diese Bande auch in der Nullmutante $\Delta mdj1$ vorhanden war.

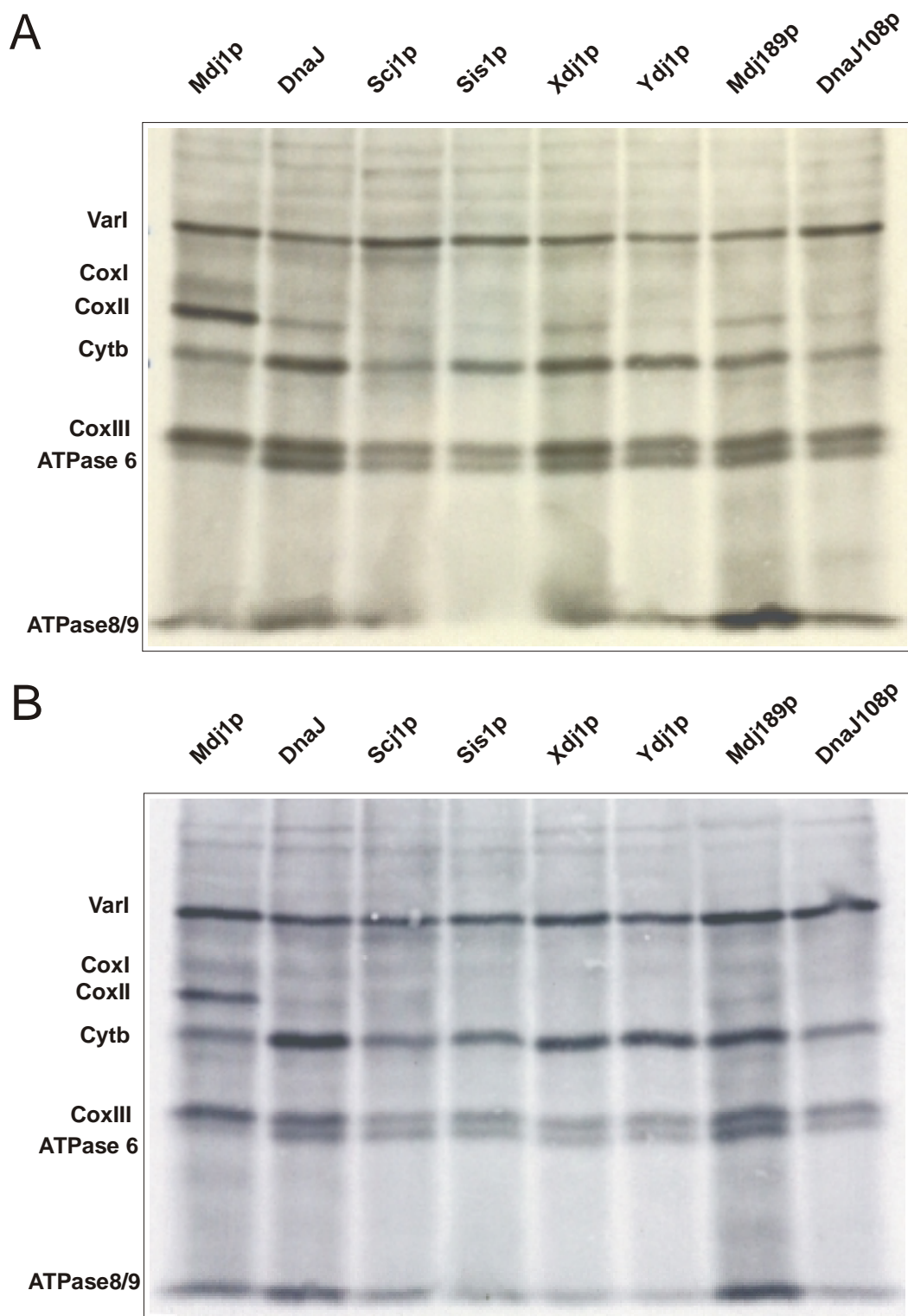


Abbildung 32: **A)** Mitochondriale Proteintranslation bei 24°C. **B)** Mitochondriale Proteintranslation bei 37°C. Proteinextrakte der *in vivo* Translationsreaktionen der einzelnen Komplementationsmutanten (von links nach rechts: YTL3MSMdj1, YTL3MSDnaJ, YTL3MSScj1, YTL3MSSis1, YTL3MSXdj1, YTL3MSYdj1, YTL3MSM189 und YTL3MSD108) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose-Membran gebliottet. Signale der radioaktiv markierten Proteine wurden nach Exposition auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Die Zuordnung der einzelnen Banden erfolgte nach Herrmann et al., 1994.

Mit einem gegen CoxIII gerichteten Antikörper konnte in alle Komplementationsmutanten, mit Ausnahme der Mutante mit mitochondrialem Scj1p, CoxIII detektiert werden. Wie schon bei der *in vivo* Translation der mitochondrialen Proteine, ist der Gehalt an CoxIII weniger stark durch die Substitution von Mdj1p durch die andern DnaJ-Protein beeinträchtigt als CoxII. Überraschend war jedoch, daß für Zellen mit mitochondrialem Scj1p kein CoxIII im Westernblot nachweisbar war, obwohl mittels radioaktiver Markierung der mitochondrialen Translationsprodukte CoxIII in ähnlichen Mengen wie für Zellen mit mitochondrialem Sis1p detektiert werden konnte.

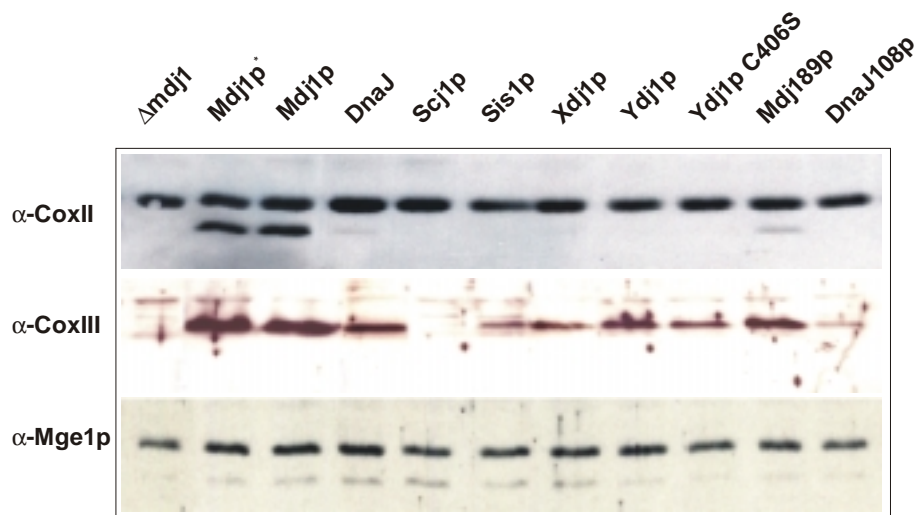


Abbildung 33: Immunologische Analyse von CoxII und CoxIII in Gesamtzellextrakten von YTL0, YTL3MSMdj1, YTL3MSDnaJ, YTL3MSScj1, YTL3MSSis1, YTL3MSXdj1, YTL3MSYdj1, YTLMSYdj1_s, YTL3MSM189 und YTL3MSD108. Die verwendeten Antikörper sind links in der Abbildung angegeben.

Es ist bekannt, daß die einzelnen Komponenten, die in den Enzymkomplexen der Atmungskette assembliert vorliegen, mit einer Stöchiometrie synthetisiert werden, die ihrer Beteiligung an den Proteinkomplexen entsprechen. Nicht assemblierte Untereinheiten werden vom mitochondrialen Proteolyseapparat rasch abgebaut, nur die Untereinheiten in vollständig assemblierten Komplexen sind über längere Zeit stabil. Wird also eine Untereinheit eines Komplexes nicht in ausreichender Menge synthetisiert, weil zum Beispiel nicht ausreichend Transkripte zur Verfügung stehen, werden die anderen Untereinheiten der Komplexe nicht vollständig assembliert und statt dessen abgebaut.

Es wäre somit denkbar, daß eine Funktion von Mdj1p darin besteht, die Langzeitstabilität mitochondrialer Proteine zu beeinflussen, indem es in seiner Funktion als Chaperon

einerseits nicht assemblierte Proteine vor dem Abbau schützt und andererseits als Chaperon an der Assemblierung der Atmungskettenkomponenten in Proteinkomplexe beteiligt ist. Für diese Prozesse ist eine Rolle des mitochondrialen Hsp70-Komplexes bereits gezeigt worden (Herrmann et al., 1994).

Während bei der Betrachtung der mitochondrialen DNA keine Unterschiede zwischen den Komplementationsmutanten und dem Wildtyp festgestellt werden konnten, die das unterschiedliche respiratorische Wachstum dieser Mutanten erklären könnten, wurden bei der Analyse der mitochondrialen Proteinsynthese deutliche Abweichungen beobachtet.

Komplementationsmutanten, die die stärksten Einschränkungen beim respiratorischen Wachstum zeigten, wiesen im Westernblot nur geringe bzw. keine Signale für die mitochondrialen Proteine CoxII und CoxIII auf. Diese drastisch verminderte Menge an mitochondrialen Proteinen konnte auf eine verringerte Protein-Synthese und auf eine verringerte Anzahl an mitochondrialen mRNA-Transkripten zurückgeführt werden. Die Transkription war dabei sowohl durch eine verringerte Transkriptionsrate als auch durch Defekte bei der Reifung von intronhaltigen Transkripten beeinträchtigt.

Die Komplementationsmutanten können somit an vier Prozessen, die alle zur Biogenese mitochondrialer Proteine gehören, das endogene mitochondriale DnaJ-Protein Mdj1p in unterschiedlichem Ausmaß ersetzen. Sowohl die Transkription, die Prozessierung von Primärtranskripten, die Translation als auch die Assemblierung von Untereinheiten zu funktionellen Proteinkomplexen scheinen von Mdj1p beeinflusst zu werden.

Es war bereits bekannt, daß zumindest das Rieske Fe/S-Protein für seine funktionelle Assemblierung in der mitochondrialen Membran von Mdj1p abhängig ist (Rowley et al., 1994). Für das Hsp70-System, welches Mdj1p einschließt, konnte weiterhin gezeigt werden, daß es an der Assemblierung der Komplexe der Atmungskette in der inneren mitochondrialen Membran beteiligt ist (Herrmann et al., 1994).

Außerdem wurde in früheren Untersuchungen nachgewiesen, daß Mdj1p gemeinsam mit seinem Hsp70-Partnerprotein, Ssc1p, die Faltung von neu synthetisiertem Var1 unterstützt und dessen Aggregation bei 37°C verhindern kann (Westermann et al., 1996). Experimente mit temperatursensitiven Ssc1p-Mutanten ergaben, daß eine korrekte mitochondriale Translation von funktionellem Ssc1p abhängt (Herrmann et al., 1994). Es ist daher naheliegend anzunehmen, daß Mdj1p als Komponente des mitochondrialen

Hsp70-Systems auch an diesem Prozeß beteiligt ist. Dafür ist es von großer Bedeutung, daß eine funktionelle Wechselwirkung zwischen dem DnaJ-Protein und dem mitochondrialen Hsp70-Protein stattfinden kann.

Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, daß immobilisiertes DnaK und freies mt-Hsp70 um die Bindung an den nukleär kodierten mitochondrialen Transkriptionsfaktor A (h-mtTFA) konkurrieren (Naylor, 1999). Sollte das homologe Protein in Hefe auch ein Substrat des Hsp70-Systems sein und für seine Funktion Mdj1p benötigen, könnte das die beobachtete Abhängigkeit der Transkription von den DnaJ-Proteinen in den Komplementationsmutanten erklären.

Von besonderer Bedeutung erschien, daß Pim1p beim Abbau von mißgefalteten bzw. nicht assemblierten Polypeptiden eng mit dem mitochondrialen Hsp70-System kooperiert (Savel'ev et al., 1998). So konnte für Pim1p und die mitochondriale *m*-AAA-Protease eine Rolle bei der Prozessierung intronhaltiger Primärtranskripte gezeigt werden (van Dyck et al., 1998). Sollte die enge Verknüpfung von Chaperon- und Proteolyse-Maschinerie eine allgemeingültige Strategie innerhalb der Zelle sein, wäre es denkbar, daß auch bei der Reifung von Transkripten eine Kooperation von Chaperon und Protease stattfindet.

Ob Mdj1p all diese Prozessen direkt induziert, reguliert oder stimuliert ist derzeit unklar. Es wäre möglich, daß Mdj1p als typisches Chaperon bzw. als Cochaperon von mitochondrialem Hsp70 die Strukturbildung einer Vielzahl von Proteinen, die an der mitochondrialen Biogenese beteiligt sind, fördert.

Während eine essentielle Beteiligung von Mdj1p am Import von Vorläuferproteinen in die Mitochondrien bereits ausgeschlossen worden ist, konnte bereits früher gezeigt werden, daß Mdj1p in den Mitochondrien die korrekte Faltung neu importierter bzw. neu synthetisierter Proteine unterstützt (Rowley et al., 1994; Westermann et al., 1996).

Die besondere Rolle, die ein mitochondriales Chaperon zu erfüllen hat besteht somit darin, die meisten mitochondrialen Proteine nach ihrem Import so zu unterstützen, daß sie zu ihrer nativen Konformation gelangen können, damit sie ihre Funktion innerhalb der Mitochondrien erfüllen können.

IV. Zusammenfassung und Ausblick

Zur Untersuchung der Bedeutung des mitochondrialen DnaJ-Proteins Mdj1p aus *S. cerevisiae* wurde eine Komplementationsstudie angefertigt, in der die nicht-mitochondrialen DnaJ-Proteine DnaJ, Scj1p, Sis1p, Xdj1p und Ydj1p sowie N-terminale Fragmente von Mdj1p und DnaJ auf ihr Potential getestet wurden, Mdj1p *in vivo* zu ersetzen.

Zunächst wurde ein System etabliert, mit dessen Hilfe eine vergleichende Betrachtung der verschiedenen DnaJ-Proteine möglich war. Hierzu wurden Hefestämme, die eines der DnaJ-Proteine anstelle von Mdj1p enthielten, konstruiert und hinsichtlich ihres Wachstumsverhalten untersucht. Insbesondere wurde das Wachstum bei 37°C im Vergleich zum Wachstum bei 24°C und das Wachstum auf der nicht-fermentierbaren Kohlenstoffquelle Glycerin analysiert.

Die Untersuchung des Wachstumsverhaltens der Komplementationsmutanten ergab, daß nur DnaJ aus *E. coli* unter allen getesteten Bedingungen wildtypähnliches Wachstum vermittelt. Die Substitution von Mdj1p durch eines der anderen nicht-mitochondrialen DnaJ-Proteine verursachte zum Teil schwerwiegende Wachstumsdefekte.

Durch die anschließende Analyse einzelner Prozesse der mitochondrialen Biogenese wurde versucht, das beeinträchtigte Wachstumsverhalten der Komplementationsmutanten zu erklären. Neben dem Erhalt der mitochondrialen DNA wurde die mitochondriale Transkription und die mitochondriale Translation der Komplementationsmutanten untersucht.

Es konnte festgestellt werden, daß alle DnaJ-Proteine in der Lage waren den Verlust der mitochondrialen DNA, der bei der Nullmutante $\Delta mdj1$ beobachtet wird, zu verhindern. Dennoch konnte keines der DnaJ-Proteine Mdj1p in vollem Umfang ersetzen. Selbst für DnaJ, das die höchste Homologie zu Mdj1p aufweist und wildtypähnliches Wachstum vermittelte, ließen sich deutliche Unterschiede bei der mitochondrialen Translation beobachten.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit lieferten keine Hinweise auf eine direkte Beteiligung von Mdj1p an der Replikation der mitochondrialen DNA. Vielmehr unterstützen die gewonnenen Ergebnisse die Hypothese, daß die Proteintranslation eine grundlegende Voraussetzung für den Erhalt der mitochondrialen DNA ist (Myers et al., 1985).

Bei Substitution von Mdj1p durch nicht-mitochondriale DnaJ-Proteine wurden Veränderungen in der Menge und Reifung mitochondrialer Transkripte festgestellt. Bei

Substitution von Mdj1p durch homologe DnaJ-Proteine *in vivo*, ließen sich sowohl Veränderungen bei der mitochondrialen Protein-Synthese als auch eine Verringerung der Stabilität mitochondrialer Proteine beobachten. Somit wurde bereits vor dem Verlust der mitochondrialen DNA eine Abhängigkeit verschiedener Prozesse der mitochondrialen Biogenese von funktionellem Mdj1p festgestellt.

Die Rolle von DnaJ-Proteinen als molekulare Chaperone ist bekannt. Ein Einfluß auf die Translation und Stabilität mitochondrialer Proteine wurde für mitochondriales Hsp70, zu dem Mdj1p als Cochaperon zugehörig ist, gezeigt. Neu ist dagegen, daß Mdj1p auch in die mitochondriale Transkription involviert ist.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten darauf hin, daß Mdj1p verschiedene Komponenten sowohl des Transkriptions- als auch des Translationsapparates bei der Erlangung und Aufrechterhaltung ihrer Funktionalität innerhalb der mitochondrialen Matrix unterstützt. Allein oder in engem Wechselspiel mit dem mitochondrialen Hsp70-System ist Mdj1p somit an einer Vielzahl von Prozessen der mitochondrialen Biogenese beteiligt.

Ob die optimale Wechselwirkung zwischen dem DnaJ-Protein Mdj1p und dem Hsp70-Protein Ssc1p entscheidend für die mitochondriale Biogenese ist, könnte in einem geeigneten Versuchsansatz überprüft werden. Beispielsweise sollte bei einer parallelen Komplementation des kompletten mitochondrialen Hsp70-Systems durch die Komponenten eines heterologen Hsp70-Systems deutlich geringere Einschränkungen bei der mitochondrialen Transkription bzw. Translation beobachtet werden. Bisher sind Komplementationsstudien sowohl in *E. coli* als auch in *S. cerevisiae* nur mit einzelnen Komponenten des Hsp70-Systems durchgeführt worden.

In diesem Zusammenhang wäre es weiterhin von Interesse, detaillierter die Struktur-/Funktionsbeziehungen der DnaJ-Proteine zu untersuchen. Während bisher hauptsächlich der N-terminale Bereich von DnaJ-Proteinen untersucht wurde, zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, das vor allem für die Funktionalität bei erhöhten Temperaturen das vollständige DnaJ-Protein benötigt wird. So wäre es für das Verständnis der Rolle der DnaJ-Proteine von Bedeutung zu wissen, ob dem C-terminalen Bereich von DnaJ-Proteinen stabilisierende, strukturbildende oder substraterkennende Eigenschaften aufweist oder ob gar die Auswahl des richtigen Hsp70-Partnerproteins über diesen Proteinbereich erfolgt.

V. Literaturverzeichnis

1. **Adams, J. M. und Cory, S.** (2001) Life-or-death decisions by the Bcl-2 protein family. *Trends Biochem. Sci.* 26, 61-66.
2. **Alfano, C. und McMacken, R.** (1989) Heat shock protein-mediated disassembly of nucleoprotein structures is required for the initiation of bacteriophage lambda DNA replication. *J Biol. Chem.*, 264, 10709-10718.
3. **Arlt, H., Steglich, G., Perryman, R., Guiard, B., Neupert, W. und Langer, T.** (1998) The formation of respiratory chain complexes in mitochondria is under the proteolytic control of the m-AAA protease. *EMBO J.*, 17, 4837-4847.
4. **Azpiroz, R. und Butow, R. A.** (1993) Patterns of mitochondrial sorting in yeast zygotes. *Mol. Biol. Cell.*, 4, 21-36.
5. **Banecki, B., Liberek, K., Wall, D., Wawrzynow, A., Georgopoulos, C., Bertoli, E., Tanfani, F. und Zylicz, M.** (1996) Structure-function analysis of the zinc finger region of the DnaJ molecular chaperone. *J Biol. Chem.*, 271, 14840-14848.
6. **Baumann, F., Milisav, I., Neupert, W. und Herrmann, J. M.** (2000) Ecm10, a novel hsp70 homolog in the mitochondrial matrix of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 487, 307-312.
7. **Becker, J., Walter, W., Yan, W. und Craig, E. A.** (1996) Functional interaction of cytosolic hsp70 and a DnaJ-related protein, Ydj1p, in protein translocation in vivo. *Mol. Cell Biol.*, 16, 4378-4386.
8. **Blumberg, H. und Silver, P. A.** (1991) A homologue of the bacterial heat-shock gene DnaJ that alters protein sorting in yeast. *Nature*, 349, 627-630.
9. **Bolliger, L., Deloche, O., Glick, B. S., Georgopoulos, C., Jenö, P., Kronidou, N., Horst, M., Morishima, N. und Schatz, G.** (1994) A mitochondrial homolog of bacterial GrpE interacts with mitochondrial hsp70 and is essential for viability. *EMBO J.*, 13, 1998-2006.
10. **Bonilla, E., Tanji, K., Hirano, M., Vu, T. H., DiMauro, S. und Schon, E. A.** (1999) Mitochondrial involvement in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta*, 1410, 171-182.
11. **Bossy-Wetzell, E. und Green, D. R.** (1999) Apoptosis: checkpoint at the mitochondrial frontier. *Mutat. Res.*, 434, 243-251.
12. **Bradford, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248-254.

13. **Buchberger, A., Gässler, C. S., Buttner, M., McMacken, R. und Bukau, B.** (1999) Functional defects of the DnaK756 mutant chaperone of Escherichia coli indicate distinct roles for a. *J Biol. Chem.*, 274, 38017-38026.
14. **Bukau, B. und Horwich, A. L.** (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell*, 92, 351-366.
15. **Bullock, W. O.** (1987) *BioTechniques*, 5, 376-378.
16. **Campbell, K. S., Mullane, K. P., Aksoy, I. A., Stubdal, H., Zalvide, J., Pipas, J. M., Silver, P. A., Roberts, T. M., Schaffhausen, B. S. und DeCaprio, J. A.** (1997) DnaJ/hsp40 chaperone domain of SV40 large T antigen promotes efficient viral DNA replication. *Genes Dev.*, 11, 1098-1110.
17. **Caplan, A. J., Cyr, D. M. und Douglas, M. G.** (1993) Eukaryotic homologues of Escherichia coli dnaJ: a diverse protein family that functions with hsp70 stress proteins. *Mol. Biol. Cell*, 4, 555-563.
18. **Caplan, A. J., Tsai, J., Casey, P. J. und Douglas, M. G.** (1992) Farnesylation of YDJ1p is required for function at elevated growth temperatures in Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.*, 267, 18890-18895.
19. **Chattoraj, D. K., Ghirlando, R., Park, K., Dibbens, J. A. und Lewis, M. S.** (1996) Dissociation kinetics of RepA dimers: implications for mechanisms of activation of DNA binding by chaperones. *Genes Cells*, 1, 189-199.
20. **Clayton, D. A.** (1991) Nuclear gadgets in mitochondrial DNA replication and transcription. *Trends Biochem. Sci.*, 16, 107-111.
21. **Cortopassi, G. A. und Wong, A.** (1999) Mitochondria in organismal aging and degeneration. *Biochim. Biophys. Acta*, 1410, 183- 193.
22. **Craig, E. A., Kramer, J., Shilling, J., Werner-Washburne, M., Holmes, S., Kosic-Smithers, J. und Nicolet, C. M.** (1989) SSC1, an essential member of the yeast HSP70 multigene family, encodes a mitochondrial protein. *Mol. Cell Biol.*, 9, 3000-3008.
23. **Crompton, M.** (1999) The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, 341 (Pt 2), 233-249.
24. **Croteau, D. L., Stierum, R. H. und Bohr, V. A.** (1999) Mitochondrial DNA repair pathways. *Mutat. Res.*, 434, 137-148.
25. **Cyr, D. M.** (1997) Hsp40 (DnaJ-related) proteins - an overview.89-95.
26. **Cyr, D. M., Langer, T. und Douglas, M. G.** (1994) DnaJ-like proteins: molecular chaperones and specific regulators of Hsp70. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 176-181.
27. **Daum, G., Bohni, P. C. und Schatz, G.** (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J Biol. Chem.*, 257, 13028-13033.

28. **Davis, J. E., Voisine, C. und Craig, E. A.** (1999) Intragenic suppressors of Hsp70 mutants: interplay between the ATPase- and peptide-binding domains. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 96, 9269-9276.
29. **de Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G., Baldacci, G., Goursot, R. und Bernardi, G.** (1984) The ori sequences of the mitochondrial genome of a wild-type yeast strain: number, location, orientation and structure. *Gene*, 32, 439-457.
30. **Deloche, O., Kelley, W. L. und Georgopoulos, C.** (1997b) Structure-function analyses of the Ssc1p, Mdj1p, and Mge1p *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial proteins in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.*, 179, 6066-6075.
31. **Deloche, O., Liberek, K., Zylicz, M. und Georgopoulos, C.** (1997a) Purification and biochemical properties of *Saccharomyces cerevisiae* Mdj1p, the mitochondrial DnaJ homologue. *J Biol. Chem.*, 272, 28539-28544.
32. **Douglas, M. G. und Butow, R. A.** (1976) Variant forms of mitochondrial translation products in yeast: evidence for location of determinants on mitochondrial DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 73, 1083-1086.
33. **Drake, J. W.** (1991) A constant rate of spontaneous mutation in DNA-based microbes. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 88, 7160-7164.
34. **Druzhyina, N., Nair, R. G., LeDoux, S. P. und Wilson, G. L.** (1998) Defective repair of oxidative damage in mitochondrial DNA in Down's syndrome. *Mutat. Res.*, 409, 81-89.
35. **Duchniewicz, M., Germaniuk, A., Westermann, B., Neupert, W., Schwarz, E. und Marszalek, J.** (1999) Dual role of the mitochondrial chaperone Mdj1p in inheritance of mitochondrial DNA in yeast. *Mol. Cell Biol.*, 19, 8201-8210.
36. **Eilers, M., Oppliger, W. und Schatz, G.** (1987) Both ATP and an energized inner membrane are required to import a purified precursor protein into mitochondria. *EMBO J.*, 6, 1073-1077.
37. **Eskes, R., Desagher, S., Antonsson, B. und Martinou, J. C.** (2000) Bid induces the oligomerization and insertion of Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol. Cell Biol.*, 20, 929-935.
38. **Fangman, W. L. und Dujon, B.** (1984) Yeast mitochondrial genomes consisting of only A.T base pairs replicate and exhibit suppressiveness. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 81, 7156-7160.
39. **Fangman, W. L., Henly, J. W. und Brewer, B. J.** (1990) RPO41-independent maintenance of [rho⁻] mitochondrial DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 10, 10-15.
40. **Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. und Purnelle, B.** (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.*, 440, 325-331.
41. **Gässler, C. S., Buchberger, A., Laufen, T., Mayer, M. P., Schroder, H., Valencia, A. und Bukau, B.** (1998) Mutations in the DnaK chaperone affecting interaction with the DnaJ cochaperone. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 95, 15229-15234.

42. **Gasser, S.M., Daum, G. und Schatz, G.** (1982) Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent uptake of precursors by isolated mitochondria. *J Biol. Chem.*, 257, 13034-13041.
43. **Graves, T., Dante, M., Eisenhour, L. und Christianson, T. W.** (1998) Precise mapping and characterization of the RNA primers of DNA replication for a yeast hypersuppressive petite by in vitro capping with guanylyltransferase. *Nucleic Acids Res.*, 26, 1309-1316.
44. **Green, D. R. und Reed, J. C.** (1998) Mitochondria and apoptosis. *Science*, 281, 1309-1312.
45. **Greene, M. K., Maskos, K. und Landry, S. J.** (1998) Role of the J-domain in the cooperation of Hsp40 with Hsp70. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 95, 6108-6113.
46. **Gu, M., Gash, M. T., Mann, V. M., Javoy-Agid, F., Cooper, J. M. und Schapira, A. H.** (1996) Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann. Neurol.*, 39, 385-389.
47. **Guthrie, C. und Fink, G. R.** (1991) Guide to yeast genetics and molecular biology.
48. **Halestrap, A. P., Doran, E., Gillespie, J. P. und O'Toole, A.** (2000) Mitochondria and cell death. *Biochem. Soc. Trans.*, 28, 170-177.
49. **Hartl, F. U.** (1996) Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381, 571-579.
50. **Hayashi, J., Ohta, S., Kagawa, Y., Kondo, H., Kaneda, H., Yonekawa, H., Takai, D. und Miyabayashi, S.** (1994) Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. Functional integrity of mitochondrial DNA from aged subjects. *J Biol. Chem.*, 269, 6878-6883.
51. **Herrmann, J. M., Stuart, R. A., Craig, E. A. und Neupert, W.** (1994) Mitochondrial heat shock protein 70, a molecular chaperone for proteins encoded by mitochondrial DNA. *J Cell. Biol.*, 127, 893-902.
52. **Hill, R. B., Flanagan, J. M. und Prestegard, J. H.** (1995) 1H and 15N magnetic resonance assignments, secondary structure, and tertiary fold of Escherichia coli DnaJ(1-78). *Biochemistry*, 34, 5587-5596.
53. **Höhfeld, J. und Jentsch, S.** (1997) GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1 [published erratum appears in EMBO J 1998 Feb 2;17(3):847]. *EMBO J.*, 16, 6209-6216.
54. **Horst, M., Oppliger, W., Rospert, S., Schönfeld, H. J., Schatz, G. und Azem, A.** (1997) Sequential action of two hsp70 complexes during protein import into mitochondria. *EMBO J.*, 16, 1842-1849.
55. **Howell, N.** (1999) Human mitochondrial diseases: answering questions and questioning answers. *Int. Rev. Cytol.*, 186, 49-116.
56. **Huang, K., Flanagan, J. M. und Prestegard, J. H.** (1999) The influence of C-terminal extension on the structure of the "J- domain" in E. coli DnaJ. *Protein Sci.*, 8, 203-214.

57. **Isobe, K., Ito, S., Hosaka, H., Iwamura, Y., Kondo, H., Kagawa, Y. und Hayashi, J. I.** (1998) Nuclear-recessive mutations of factors involved in mitochondrial translation are responsible for age-related respiration deficiency of human skin fibroblasts. *J Biol. Chem.*, 273, 4601-4606.
58. **Ito, S., Ohta, S., Nishimaki, K., Kagawa, Y., Soma, R., Kuno, S. Y., Komatsuzaki, Y., Mizusawa, H. und Hayashi, J.** (1999) Functional integrity of mitochondrial genomes in human platelets and autopsied brain tissues from elderly patients with Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 96, 2099-2103.
59. **Kang, P. J., Ostermann, J., Shilling, J., Neupert, W., Craig, E. A. und Pfanner, N.** (1990) Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins. *Nature*, 348, 137-143.
60. **Karzai, A. W. und McMacken, R.** (1996) A bipartite signaling mechanism involved in DnaJ-mediated activation of the Escherichia coli DnaK protein. *J Biol. Chem.*, 271, 11236-11246.
61. **Kelley, W. L.** (1998) The J-domain family and the recruitment of chaperone power. *Trends Biochem. Sci.*, 23, 222-227.
62. **Kelley, W. L.** (1999) Molecular chaperones: How J domains turn on Hsp70s. *Curr. Biol.*, 9, 305-308.
63. **Kelley, W. L. und Landry, S. J.** (1994) Chaperone power in a virus? [letter]. *Trends Biochem. Sci.*, 19, 277-278.
64. **Köhler, C. M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. und Schatz, G.** (1999) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 96, 2141-2146.
66. **Kubo, Y., Tsunehiro, T., Nishikawa, S., Nakai, M., Ikeda, E., Toh-e A, Morishima, N., Shibata, T. und Endo, T.** (1999) Two distinct mechanisms operate in the reactivation of heat-denatured proteins by the mitochondrial Hsp70/Mdj1p/Yge1p chaperone system. *J Mol. Biol.*, 286, 447-464.
67. **Laemmli, U. K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
68. **Laloraya, S., Gambill, B. D. und Craig, E. A.** (1994) A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 91, 6481-6485.
69. **Lang, B. F., Burger, G., O'Kelly, C. J., Cedergren, R., Golding, G. B., Lemieux, C., Sankoff, D., Turmel, M. und Gray, M. W.** (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature [see comments]. *Nature*, 387, 493-497.
70. **Langer, T., Lu, C., Echols, H., Flanagan, J., Hayer, M. K. und Hartl, F. U.** (1992) Successive action of DnaK, DnaJ and GroEL along the pathway of chaperone-mediated protein folding. *Nature*, 356, 683-689.
71. **Laufen, T., Mayer, M. P., Beisel, C., Klostermeier, D., Mogk, A., Reinstein, J. und Bukau, B.** (1999) Mechanism of regulation of hsp70 chaperones by DnaJ cochaperones. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 96, 5452-5457.

72. **Lee, D. H., Sherman, M. Y. und Goldberg, A. L.** (1996) Involvement of the molecular chaperone Ydj1 in the ubiquitin-dependent degradation of short-lived and abnormal proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 16, 4773-4781.
73. **Lee, D. Y. und Clayton, D. A.** (1998) Initiation of mitochondrial DNA replication by transcription and R-loop processing. *J Biol. Chem.* 273, 30614-30621.
74. **Lee, H. C. und Wei, Y. H.** (1997) Mutation and oxidative damage of mitochondrial DNA and defective turnover of mitochondria in human aging. *J Formos. Med. Assoc.*, 96, 770-778.
75. **Liberek, K., Marszalek, J., Ang, D., Georgopoulos, C. und Zylicz, M.** (1991) *Escherichia coli* DnaJ and GrpE heat shock proteins jointly stimulate ATPase activity of DnaK. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 88, 2874-2878.
76. **Lisse, T. und Schwarz, E.** (2000) Functional specificity of the mitochondrial DnaJ protein, Mdj1p, in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, 263, 527-534.
77. **Liu, J. S., Kuo, S. R., Makhov, A. M., Cyr, D. M., Griffith, J. D., Broker, T. R. und Chow, L. T.** (1998) Human Hsp70 and Hsp40 chaperone proteins facilitate human papillomavirus-11 E1 protein binding to the origin and stimulate cell-free DNA replication. *J Biol. Chem.*, 273, 30704-30712.
78. **Lodi, R., Cooper, J. M., Bradley, J. L., Manners, D., Styles, P., Taylor, D. J. und Schapira, A. H.** (1999) Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in patients with Friedreich ataxia [see comments]. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 96, 11492-11495.
79. **Lorimer, H. E., Brewer, B. J. und Fangman, W. L.** (1995) A test of the transcription model for biased inheritance of yeast mitochondrial DNA. *Mol. Cell Biol.*, 15, 4803-4809.
80. **Luke, M. M., Sutton, A. und Arndt, K. T.** (1991) Characterization of SIS1, a *Saccharomyces cerevisiae* homologue of bacterial dnaJ proteins. *J Cell Biol.*, 114, 623-638.
81. **MacAlpine, D. M., Perlman, P. S. und Butow, R. A.** (1998) The high mobility group protein Abf2p influences the level of yeast mitochondrial DNA recombination intermediates in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 95, 6739-6743.
82. **Marcelino, L. A. und Thilly, W. G.** (1999) Mitochondrial mutagenesis in human cells and tissues. *Mutat. Res.*, 434, 177-203.
83. **Margulis, L.** (1975) Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp. Soc Exp. Biol.*, 21-38.
84. **Martindale, D., Hackam, A., Wieczorek, A., Ellerby, L., Wellington, C., McCutcheon, K., Singaraja, R., Kazemi-Esfarjani, P., Devon, R., Kim, S. U., Bredesen, D. E., Tufaro, F. und Hayden, M. R.** (1998) Length of huntingtin and its polyglutamine tract influences localization and frequency of intracellular aggregates. *Nat. Genet.*, 18, 150-154.

85. **Martinou, J. C., Desagher, S. und Antonsson, B.** (2000) Cytochrome c release from mitochondria: all or nothing [news; comment]. *Nat. Cell Biol.*, 2, E41-E43.
86. **Martinez-Yamout, M., Legge, G. B., Zhang, O., Wright, P. E. und Dyson, H. J.** (2000) Solution structure of the cysteine-rich domain of the Escherichia coli chaperone protein DnaJ. *J Mol. Biol.*, 300, 805-318.
87. **Mayer, M. P., Rudiger, S. und Bukau, B.** (2000) Molecular basis for interactions of the DnaK chaperone with substrates. *Biol. Chem.*, 381, 877-85.
89. **McCarty, J. S., Buchberger, A., Reinstein, J. und Bukau, B.** (1995) The role of ATP in the functional cycle of the DnaK chaperone system. *J Mol. Biol.*, 249, 126-137.
90. **Meier-Ruge, W. A. und Bertoni-Freddari, C.** (1999) Mitochondrial genome lesions in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease. *Gerontology*, 45, 289-297.
91. **Myers, A. M., Pape, L. K. und Tzagoloff, A.** (1985) Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genomes in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 4, 2087-2092.
92. **Nagata, H., Hansen, W. J., Freeman, B. und Welch, W. J.** (1998) Mammalian cytosolic DnaJ homologues affect the hsp70 chaperone- substrate reaction cycle, but do not interact directly with nascent or newly synthesized proteins. *Biochemistry*, 37, 6924-6938.
93. **Naylor, D. J., Stines, A. P., Hoogenraad, N. J. und Hoj, P. B.** (1998) Evidence for the existence of distinct mammalian cytosolic, microsomal, and two mitochondrial GrpE-like proteins, the Co-chaperones of specific Hsp70 members. *J Biol. Chem.*, 273, 21169-21177.
94. **Naylor, D. J., Hoogenraad, N.J. und Hoj, P. B.** (1999) Characterisation of several Hsp70 interacting proteins from mammalian organelles. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1431, 443-450.
95. **Neupert, W.** (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.*, 66, 863-917.
96. **Nosek, J., Tomaska, L., Fukuhara, H., Suyama, Y. und Kovac, L.** (1998) Linear mitochondrial genomes: 30 years down the line. *Trends Genet.*, 14, 184-188.
97. **Oehlmann, M.** (2000) Untersuchung der intrinsischen Chaperonaktivität der N-terminalen Domäne von DnaJ in vitro. *Diplomarbeit*.
98. **Ogur, M., St.John, R. und Nagai, S.** (1957) Tetrazolium Overlay Technique for Population Studies of Respiration Deficiency in Yeast. *Science*, 125, 928-929.
99. **Packschies, L., Theyssen, H., Buchberger, A., Bukau, B., Goody, R. S. und Reinstein, J.** (1997) GrpE accelerates nucleotide exchange of the molecular chaperone DnaK with an associative displacement mechanism. *Biochemistry*, 36, 3417-3422.

100. **Papa, S. und Skulachev, V. P.** (1997) Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell Biochem.*, 174, 305-319.
101. **Pellecchia, M., Szyperski, T., Wall, D., Georgopoulos, C. und Wüthrich, K.** (1996) NMR structure of the J-domain and the Gly/Phe-rich region of the Escherichia coli DnaJ chaperone. *J Mol. Biol.*, 260, 236-250.
102. **Pfanner, N., Tropschug, M. und Neupert, W.** (1987) Mitochondrial protein import: nucleoside triphosphates are involved in conferring import-competence to precursors. *Cell*. Jun 19;49(6):815-23.
103. **Picard, V., Ersdal-Badju, E., Lu, A. und Bock, S. C.** (1994) A rapid and efficient one-tube PCR-based mutagenesis technique using Pfu DNA polymerase. *Nucleic Acids Res.*, 22, 2587-2591.
104. **Pierpaoli, E. V., Sandmeier, E., Schonfeld, H. J. und Christen, P.** (1998) Control of the DnaK chaperone cycle by substoichiometric concentrations of the co-chaperones DnaJ and GrpE. *J Biol. Chem.*, 273, 6643-6649.
105. **Prip-Buus, C., Westerman, B., Schmitt, M., Langer, T., Neupert, W. und Schwarz, E.** (1996) Role of the mitochondrial DnaJ homologue, Mdj1p, in the prevention of heat-induced protein aggregation. *FEBS Lett.*, 380, 142-146.
106. **Rassow, J., von Ahsen, O., Bömer, U. und Pfanner, N.** (1997) Molecular chaperones: towards a characterization of the heat-shock protein 70 family. *Trends Cell Biol.*, 7, 129-133.
107. **Rose, M. D., Winston, F. und Hieter, P.** (1990) *Methods in Yeast Genetics*.
108. **Rowley, N., Prip-Buus, C., Westermann, B., Brown, C., Schwarz, E., Barrell, B. und Neupert, W.** (1994) Mdj1p, a novel chaperone of the DnaJ family, is involved in mitochondrial biogenesis and protein folding. *Cell*, 77, 249-259.
109. **Rustin, P., von Kleist-Retzow, J. C., Vajo, Z., Rotig, A. und Munnich, A.** (2000) For debate: defective mitochondria, free radicals, cell death, aging-reality or myth-ochondria? *Mech. Ageing Dev.*, 114, 201-206.
110. **Saito, H. und Uchida, H.** (1978) Organization and expression of the dnaJ and dnaK genes of Escherichia coli K12. *Mol. Gen. Genet.*, 164, 1-8.
111. **Saito, H., Nakamura, Y. und Uchida, H.** (1978) A transducing lambda phage carrying grpE, a bacterial gene necessary for lambda DNA replication, and two ribosomal protein genes, rpsP (S16) and rplS (L19). *Mol. Gen. Genet.*, 165, 247-256.
112. **Sakakibara, Y.** (1988) The dnaK gene of Escherichia coli functions in initiation of chromosome replication. *J Bacteriol.*, 170, 972-979.
113. **Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 74, 5463-5467.

114. **Savel'ev, A. S., Novikova, L. A., Kovaleva, I. E., Luzikov, V. N., Neupert, W. und Langer, T.** (1998) ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *J Biol. Chem.*, 273, 20596-20602.
115. **Sawa, A., Wiegand, G. W., Cooper, J., Margolis, R. L., Sharp, A. H., Lawler, J. F., Jr., Greenamyre, J. T., Snyder, S. H. und Ross, C. A.** (1999) Increased apoptosis of Huntington disease lymphoblasts associated with repeat length-dependent mitochondrial depolarization. *Nat. Med.*, 5, 1194-1198.
116. **Sawyer, D. E. und Van Houten, B.** (1999) Repair of DNA damage in mitochondria. *Mutat. Res.*, 434, 161-176.
117. **Schäffner, J.** (2000) Einfluß niedermolekularer Medienzusätze und sezernierter, ATP-unabhängiger Chaperone auf die Ausbeute therapeutischer Proteine im Periplasma von Escherichia coli. *Dissertationsschrift*.
118. **Schapira, A. H. und Cock, H. R.** (1999) Mitochondrial myopathies and encephalomyopathies. *Eur. J Clin. Invest.*, 29, 886-898.
119. **Schatz, G. und Dobberstein, B.** (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science*, 271, 1519-1526.
120. **Schilke, B., Forster, J., Davis, J., James, P., Walter, W., Laloraya, S., Johnson, J., Miao, B. und Craig, E.** (1996) The cold sensitivity of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* lacking a mitochondrial heat shock protein 70 is suppressed by loss of mitochondrial DNA. *J Cell Biol.*, 134, 603-613.
121. **Schleyer, M., Schmidt, B. und Neupert, W.** (1982) Requirement of a membrane potential for the posttranslational transfer of proteins into mitochondria. *Eur. J Biochem.*, 125, 109-116.
122. **Schlenstedt, G., Harris, S., Risse, B., Lill, R. und Silver, P. A.** (1995) A yeast DnaJ homologue, Scj1p, can function in the endoplasmic reticulum with BiP/Kar2p via a conserved domain that specifies interactions with Hsp70s. *J Cell Biol.*, 129, 979-988.
123. **Schmitt, M. E. und Clayton, D. A.** (1993) Conserved features of yeast and mammalian mitochondrial DNA replication. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 3, 769-774.
124. **Schwarz, E., Seytter, T., Guiard, B. und Neupert, W.** (1993) Targeting of cytochrome b2 into the mitochondrial intermembrane space: specific recognition of the sorting signal. *EMBO J.*, 12, 2295-2302.
125. **Schwarz, E., Westermann, B., Caplan, A. J., Ludwig, G. und Neupert, W.** (1994) XDJ1, a gene encoding a novel non-essential DnaJ homologue from *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, 145, 121-124.
126. **Siesjo, B. K., Elmer, E., Janelidze, S., Keep, M., Kristian, T., Ouyang, Y. B. und Uchino, H.** (1999) Role and mechanisms of secondary mitochondrial failure. *Acta Neurochir. Suppl (Wien.)*, 73, 7-13.
127. **Silver, P. A. und Way, J. C.** (1993) Eukaryotic DnaJ homologs and the specificity of Hsp70 activity. *Cell*, 74, 5-6.

128. **Skulachev, V. P.** (1998) Uncoupling: new approaches to an old problem of bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta*, 1363, 100-124.
129. **Strain J., Lorenz, C. R., Bode, J., Garland, S., Smolen, G. A., Ta, d. T., Vickery, L. E. und Culotta, V. C.** (1998) Suppressors of superoxide dismutase (SOD1) deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. Identification of proteins predicted to mediate iron-sulfur cluster assembly. *J Biol. Chem.*, 273, 31138-31144.
130. **Suh, W. C., Burkholder, W. F., Lu, C. Z., Zhao, X., Gottesman, M. E. und Gross, C. A.** (1998) Interaction of the Hsp70 molecular chaperone, DnaK, with its cochaperone DnaJ. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 95, 15223-15228.
131. **Szabo, A., Korszun, R., Hartl, F. U. und Flanagan, J.** (1996) A zinc finger-like domain of the molecular chaperone DnaJ is involved in binding to denatured protein substrates. *EMBO J.*, 15, 408-417.
132. **Szyperski, T., Pellecchia, M., Wall, D., Georgopoulos, C. und Wüthrich, K.** (1994) NMR structure determination of the *Escherichia coli* DnaJ molecular chaperone: secondary structure and backbone fold of the N-terminal region (residues 2-108) containing the highly conserved J domain. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 91, 11343-11347.
133. **Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J.** (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 76, 4350-4354.
134. **Tsujimoto, Y. und Shimizu, S.** (2000) Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.*, 466, 6-10.
135. **van Dyck, L., Neupert, W. und Langer, T.** (1998) The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.*, 12, 1515-1524.
136. **Voisine C., Cheng Y. C., Ohlson M., Schilke B., Hoff K., Beinert H., Marszalek J. und Craig E. A.** (2001) Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U. S. A.*, 98, 1483-1488.
137. **Wagner I., Arlt, H., van Dyck, L., Langer T. und Neupert W.** (1994) Molecular chaperones cooperate with PIM1 protease in the degradation of misfolded proteins in mitochondria. *EMBO J.*, 13, 5135-5145.
138. **Wall, D., Zyllicz, M. und Georgopoulos, C.** (1994) The NH₂-terminal 108 amino acids of the *Escherichia coli* DnaJ protein stimulate the ATPase activity of DnaK and are sufficient for lambda replication. *J Biol. Chem.*, 269, 5446-5451.
139. **Wallace, D. C.** (1992) Mitochondrial genetics: a paradigm for aging and degenerative diseases? *Science*, 256, 628-632.
140. **Webster, T. J., Naylor, D. J., Hartman, D. J., Hoj, P. B. und Hoogenraad, N. J.** (1994) cDNA cloning and efficient mitochondrial import of pre-mtHSP70 from rat liver. *DNA Cell Biol.*, 13, 1213-1220.

141. **Westermann, B., Gaume, B., Herrmann, J. M., Neupert, W. und Schwarz, E.** (1996) Role of the mitochondrial DnaJ homolog Mdj1p as a chaperone for mitochondrially synthesized and imported proteins. *Mol. Cell Biol.*, 16, 7063-7071.
142. **Westermann, B. und Neupert, W.** (1997) Mdj2p, a novel DnaJ homolog in the mitochondrial inner membrane of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol. Biol.*, 272, 477-483.
143. **Wickner, S., Hoskins, J., Chatteraj, D. und McKenney, K.** (1990) Deletion analysis of the mini-P1 plasmid origin of replication and the role of *Escherichia coli* DnaA protein. *J Biol. Chem.*, 265, 11622-11627.
144. **Wickner, S., Skowrya, D., Hoskins, J. und McKenney, K.** (1992) DnaJ, DnaK, and GrpE heat shock proteins are required in oriP1 DNA replication solely at the RepA monomerization step. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 89, 10345-10349.
145. **Xu, B. und Clayton, D. A.** (1995) A persistent RNA-DNA hybrid is formed during transcription at a phylogenetically conserved mitochondrial DNA sequence. *Mol. Cell Biol.*, 15, 580-589.
146. **Xu, B. und Clayton, D. A.** (1996) RNA-DNA hybrid formation at the human mitochondrial heavy-strand origin ceases at replication start sites: an implication for RNA-DNA hybrids serving as primers. *EMBO J.*, 15, 3135-3143.
147. **Yan, W. und Craig, E. A.** (1999) The glycine-phenylalanine-rich region determines the specificity of the yeast Hsp40 Sis1. *Mol. Cell Biol.*, 19, 7751-7758.
148. **Yochem, J., Uchida, H., Sunshine, M., Saito, H., Georgopoulos, C. P. und Feiss, M.** (1978) Genetic analysis of two genes, *dnaJ* and *dnaK*, necessary for *Escherichia coli* and bacteriophage lambda DNA replication. *Mol. Gen. Genet.*, 164, 9-14.
149. **Zhong, T. und Arndt, K. T.** (1993) The yeast SIS1 protein, a DnaJ homolog, is required for the initiation of translation. *Cell*, 73, 1175-1186.
150. **Ziegelhoffer, T., Johnson, J. L. und Craig, E. A.** (1996) Chaperones get Hip. Protein folding. *Curr. Biol.*, 6, 272-275.
151. **Zou, Y., Crowley, D. J. und Van Houten, B.** (1998) Involvement of molecular chaperonins in nucleotide excision repair. DnaK leads to increased thermal stability of UvrA, catalytic UvrB loading, enhanced repair, and increased UV resistance. *J Biol. Chem.*, 273, 12887-12892.
152. **Zylicz, M., Ang, D., Liberek, K. und Georgopoulos, C.** (1989) Initiation of lambda DNA replication with purified. *EMBO J.*, 8, 1601-1608.
153. **Zylicz, M., Liberek, K., Wawrzynow, A. und Georgopoulos, C.** (1998) Formation of the preprimosome protects lambda O from RNA transcription-dependent proteolysis by ClpP/ClpX. *Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A.*, 95, 15259-15263.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich diese Arbeit bisher weder an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, noch an einer anderen Einrichtung zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht habe.

Ich versichere, die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommene Stellen sind als solche gekennzeichnet.

Tanja Lisse

Angaben zur Person und zum Bildungsweg

Personalien:

Vor- und Zuname: Tanja, Sabine Lisse
geboren am / in: 27.04.1970 / Brehna
Anschrift: Pfälzer Str. 9, 06108 Halle (Saale)
Familienstand: geschieden

Schulbildung:

09/1976 - 06/1979 Schule beim Generalkonsulat der DDR in Bombay, Indien
09/1979 - 06/1986 Polytechnische Oberschule in Sandersdorf
09/1986 - 06/1988 Erweiterte Oberschule in Bitterfeld
06/1988 Abitur

Studium:

10/1988 – 03/1991 Studium der Chemie an der Technischen Hochschule in Merseburg
03/1991 Vordiplom
10/1991 – 07/1995 Studium der Chemie an der Universität Regensburg;
Diplomarbeit am Institut für Biophysik und physikalische Biochemie LS Prof. Dr. Jaenicke zum Thema: „Reinigung und Charakterisierung von rekombinantem Dsp16 aus *Craterostigma plantagineum*.“
07/1995 Erlangung des akademischen Grades Diplom Chemikerin
03/1996 – 03/2000 Doktorandin an der Martin-Luther Universität Halle-Wittenberg;
Promotionsarbeit am Institut für Biotechnologie am LS Prof. Dr. Rudolph zum Thema: „Untersuchungen zur Rolle von Mdj1p aus *Saccharomyces cerevisiae* bei der mitochondrialen Biogenese.“

Berufstätigkeit:

09/1995 – 02/1996	Wissenschaftliche Hilfskraft an der Universität Regensburg und am MPI für Züchtungsforschung in Köln
04/1996 – 03/2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg am Institut für Biotechnologie
seit 04/2000	Wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Scil Proteins GmbH in Halle (Saale)

Forschungsaufenthalte und Kongresse während der Promotionsarbeit:

03/1996	4 wöchiger Forschungsaufenthalt am Institut für Physiologische Chemie der LMU München
05/1998	Meeting: „Molecular Chaperones and the Heat Shock Response“ in Cold Spring Harbor, New York, U.S.A.
10/1998	Internationales Symposium „Molecular Cell Biology of the Heat Stress Response“ in Frankfurt/Main
04/1999	3 wöchiger Forschungsaufenthalt an der Unité de Biochimie Physiologique, UCL, Belgien

Tanja Lisse

Danksagung

Hiermit möchte ich allen, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben, herzlich danken.

Prof. Dr. Rainer Rudolph danke ich dafür, daß er mir die Möglichkeit gegeben hat, an seinem Lehrstuhl - einer wunderbar modern ausgestatteten Forschungseinrichtung - zu arbeiten.

Dr. Elisabeth Schwarz danke ich für die Überlassung des Themas dieser Dissertation.

Bei allen Mitarbeitern des Biotechnikums und besonders bei allen „Bewohnern“ des Labors 514, die nach dem Umzug ins neue Biotechnikum im Labor 262 eine Heimat gefunden haben, bedanke ich mich für die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Benedikt Westermann, Johannes Herrmann und Kai Hell danke ich für wertvolle Tips im Umgang mit Hefen und Mitos und für die freundliche Aufnahme während meiner Besuche in München am Institut für Physiologische Chemie der LMU.

Bei Françoise Foury bedanke ich mich für ihr Interesse an meiner Arbeit und die Gastfreundschaft während meines Aufenthalts in Belgien an der UCL in Lovain la Neuf.

Bettina Hause danke ich dafür, daß sie mir die Nutzung des Fluoreszenzmikroskops des IPB ermöglicht hat.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern der Scil Proteins GmbH, die mich durch ihr Verständnis und ihr Vertrauen bei der Fertigstellung dieser Arbeit motiviert haben.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern für ihre Unterstützung und ihre Geduld, während meiner gesamten Ausbildungs- und Promotionszeit bis hin zur Vorlage dieser Arbeit.