



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

**Charakterisierung mitochondrialer
Pentatricopeptid-repeat-Proteine aus
*Neurospora crassa***

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Ricarda Moseler
aus Duisburg

Düsseldorf, Dezember 2014

aus dem Institut für Biochemie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: PD Dr. Ulrich Schulte

Korreferent: Prof. Dr. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung:

"Jeder kann über sich hinauswachsen und etwas erreichen, wenn er es mit Hingabe und Leidenschaft tut."

Nelson Mandela

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	4
2.1 Mitochondriale Genexpression.....	4
2.2 Pentatricopeptid-repeat-Proteine	7
2.3 Struktur von PPR-Proteinen.....	10
2.4 Funktionen von PPR-Proteinen in der mitochondrialen Genexpression .	14
2.5 PPR-Proteine aus <i>Neurospora crassa</i>	19
2.6 Ziel der Arbeit.....	24
3. Material und Methoden	26
3.1 Mikroorganismen.....	26
3.2 Plasmide	26
3.3 Oligonukleotide	26
3.4 Medien und Lösungen.....	29
3.5 Methoden für <i>Neurospora crassa</i>	35
3.5.1 Kultivierung von <i>N. crassa</i>	35
3.5.2 Transformation von <i>N. crassa</i>	36
3.5.3 Mitochondrienisolierung aus <i>N. crassa</i>	37
3.6 Methoden für <i>Escherichia coli</i>	37
3.6.1 Kultivierung von <i>E. coli</i>	37
3.6.2 Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan (1983).....	37
3.6.3 Transformation kompetenter Zellen von <i>E. coli</i>	38
3.7 Präparationen von Nukleinsäuren.....	38

3.7.1 Agarose-Gelelektrophorese	39
3.7.2 Phenol-Chloroform-Extraktion	39
3.7.3 Ethanolfällung von Nukleinsäuren	40
3.7.4 Präparation von DNA.....	40
3.7.4.1 Klonierung von Vektoren für die Genexpression von ncu06461 und ncu07684 ohne mitochondriale Präsequenz	41
3.7.4.2 Klonierung von DNA-Vorlagen für die RNA Transkription..	44
3.7.5 Präparation von RNA.....	45
3.7.5.1 In-vitro-Transkription	45
3.7.5.2 Denaturierende Polyacrylamid-gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung nach Beidler <i>et al.</i> (1982) ...	46
3.7.5.3 3' Endmarkierung von RNA mit 5'-32[P]pCp.....	47
3.8 Proteinbiochemische Methoden.....	47
3.8.1 Genexpression.....	47
3.8.1.1 Genexpression von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis.....	47
3.8.1.2 Genexpression von $\Delta 95$ -ncu06461-His.....	48
3.8.2 Proteinisolierung.....	48
3.8.2.1 Proteinisolierung von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis	49
3.8.2.2 Proteinisolierung von $\Delta 95$ -ncu06461-His	49
3.8.2.3 Optimierung der Puffer für chromatographische Methoden	50
3.8.3 Proteinanalyse und –charakterisierung	50
3.8.3.1 Proteinbestimmung nach Biuret	51
3.8.3.2 Blau Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese	51
3.8.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	52

3.8.3.4 Western Blot-Analyse	53
3.8.3.5 Massenspektrometrie	54
3.8.3.6 Statische Lichtstreuung	54
3.8.3.7 Retardierungsanalysen	54
4. Ergebnisse	56
4.1 Sequenzanalyse der PPR-Proteine ncu07684 und ncu06461	56
4.2 Komplementation der Deletionsmutanten 20112 und 20449	59
4.3 Heterologe Expression von PPR-Proteinen	62
4.3.1 Expression von ncu07684	63
4.3.2 Expression von ncu06461	72
4.4 Proteinisolierung	77
4.4.1 Proteinisolierung von $\Delta 65$ -ncu07684-His	77
4.4.2 Proteinisolierung von $\Delta 95$ -ncu06461-His	86
4.5 Charakterisierung von $\Delta 95$ -ncu06461-His	92
4.5.1 Bestimmung der molekularen Masse	92
4.5.2 Bestimmung der Proteinstruktur	94
4.5.3 Bestimmung der Funktion	96
5. Diskussion	104
5.1 Komplementation der Deletionsmutanten 20112 und 20449	104
5.2 Heterologe Expression von PPR-Genen	106
5.3 Proteinisolierung	110
5.3.1 Proteinisolierung von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis	110
5.3.2 Proteinisolierung von $\Delta 95$ -ncu06461-His	112
5.4 Charakterisierung von $\Delta 95$ -ncu06461-His	113
5.4.1 Aufklärung der Tertiärstruktur	114

5.4.2 Interaktionsstudien.....	115
5.5 Mögliche Funktionen der PPR-Proteine ncu07684 und ncu06461	117
5.5.1 Mögliche Funktion von ncu07684 als Leucin-reiches Protein.....	117
5.5.2 Mögliche Funktion von ncu06461	119
5.6 Ausblick.....	122

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1	Das mitochondriale Genom von <i>N. crassa</i>	5
Abbildung 2.2	Spleißen von Introns der Gruppe I und II.....	6
Abbildung 2.3	Motive der PPR-Proteine aus <i>A. thaliana</i>	8
Abbildung 2.4	Ungefähre Zeitpunkte der Divergenz von Moos und Landpflanzen	9
Abbildung 2.5	Kristallstruktur von PPR10	11
Abbildung 2.6	Basenspezifische Erkennung der einzelsträngigen RNA durch PPR10 Motive	12
Abbildung 2.7	Struktur von THA8 im Komplex mit RNA	13
Abbildung 2.8	Funktionen von PPR-Proteinen in der mitochondrialen Genexpression.....	15
Abbildung 2.9	Absorptionsdifferenzspektren	21
Abbildung 2.10	Blau Nativ-PAGE mit spezifischer Aktivitätsfärbung der Komplexe I und IV.....	22
Abbildung 2.11	Northern-Blot-Analyse von mitochondrial kodierten Untereinheiten von Komplex I.....	23
Abbildung 3.1	Klonierungsstrategie von $\Delta 21$ -ncu07684-His sowie $\Delta 65$ -ncu07684-His	42
Abbildung 3.2	Klonierungsstrategie von $\Delta 95$ -ncu06461-His.....	42
Abbildung 4.1	Schematische Darstellung des Gens ncu20711 bzw. ncu06461 von MIPS und dem Broad Institute	56
Abbildung 4.2	Alignment der PPR-Motive von ncu07684 und ncu20711	58
Abbildung 4.3	BN-PAGE komplementierter Deletionsmutanten 20112 und 20449 mit Komplex-I-Aktivitätsfärbung.	61
Abbildung 4.4	SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von ncu07684, $\Delta 21$ -ncu07684-His und $\Delta 65$ -ncu07684-His	65
Abbildung 4.5	SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse aufgeschlossener Zellen von $\Delta 21$ -ncu07684-His und $\Delta 65$ -ncu07684-His	67
Abbildung 4.6	Western Blot-Analyse aufgeschlossener Zellen von $\Delta 65$ -ncu07684-His unter Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock während der Expression.	68

Abbildung 4.7	Western Blot-Analyse aufgeschlossener Zellen von $\Delta 65$ -ncu07684-His unter Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock während der Expression bei unterschiedlichen Temperaturen	70
Abbildung 4.8	SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse aufgeschlossener Zellen von $\Delta 65$ -ncu07684-His und ncu07684 unter Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock während der Expression	71
Abbildung 4.9	Expression von $\Delta 95$ -ncu06461-His.....	73
Abbildung 4.10	SDS-PAGE und Western Blot aufgeschlossener Zellen von $\Delta 95$ -ncu06461-His	74
Abbildung 4.11	Expression von $\Delta 95$ -ncu06461-His bei 25°C und 37°C mit und ohne vorangegangenen Hitzeschock	75
Abbildung 4.12	Expression von $\Delta 95$ -ncu06461-His in LBNB- und LBSB-Medium bei 25°C mit und ohne vorangegangenen Hitzeschock.....	76
Abbildung 4.13	SDS-PAGE- und Western Blot Analyse der IMACs von $\Delta 65$ -ncu07684-His an mit Nickel-, Kobalt- und Zink-Ionen beladenen <i>HiTrapTM Chelating HP</i> Säulen.....	79
Abbildung 4.14	SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der IMAC von $\Delta 65$ -ncu07684-His an einer mit Kobalt-Ionen beladenen <i>HiTrapTM Chelating HP</i> Säule und Stufenelution	80
Abbildung 4.15	SDS-PAGE Analyse der IMAC von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis an einer mit Kobalt-Ionen beladenen <i>HiTrapTM Chelating HP</i> Säule und Stufenelution.....	81
Abbildung 4.16	SDS-PAGE-Analyse und zugehöriger Western Blot der IMAC von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis mit Elution bei pH 9	84
Abbildung 4.17	Blau Nativ-PAGE der Elutionsfraktionen der IMAC	85
Abbildung 4.18	Auszug aus dem Chromatogramm der IMAC von $\Delta 95$ -ncu06461-His an einer mit Nickel-Ionen beladenen <i>HiTrapTM Chelating HP</i> Säule und Gradientenelution.....	86
Abbildung 4.19	Coomassie gefärbte SDS-PAGE der IMAC von $\Delta 95$ -ncu06461-His an einer mit Nickel-Ionen beladenen <i>HiTrapTM Chelating HP</i> Säule und Gradientenelution.....	87

Abbildung 4.20 Analytische Größenausschlusschromatographie von $\Delta 95$ -ncu06461-His in unterschiedlichen Pufferbedingungen ...	89
Abbildung 4.21 Analytische Größenausschlusschromatographie von $\Delta 95$ -ncu06461-His in 100 mM Bicine pH 9, 50 mM NaCl und 0,2 M Xylitol	91
Abbildung 4.22 SDS-PAGE-Analyse der Proteinisolation von $\Delta 95$ -ncu06461-His im Überblick.....	91
Abbildung 4.23 Größenausschlusschromatographie und statische Lichtstreuungsanalyse von $\Delta 95$ -ncu06461-His.....	93
Abbildung 4.24 Massenspektrometrische Analyse der Elutionsfraktion von $\Delta 95$ -ncu06461-His mittels MALDI-TOF.....	94
Abbildung 4.25 Proteinkristalle von $\Delta 95$ -ncu06461-His	95
Abbildung 4.26 Retardierungsanalyse von Fragment G	98
Abbildung 4.27 Retardierungsanalyse von Fragment G mit Zugabe von Heparin	99
Abbildung 4.28 Retardierungsanalyse der Fragmente L, P, O und S mit Zugabe von Heparin	100
Abbildung 4.29 Retardierungsanalyse von Fragment L mit Zugabe von Heparin in unterschiedlichen Puffern.....	102
Abbildung 4.30 Retardierungsanalyse der Fragmente C und G mit Zugabe von Heparin in pH 7,5	103
Abbildung 5.1 Periodische Leucin-Wiederholungen in ncu07684	118

1. Zusammenfassung

Pentatricopeptid-*repeat*-Proteine sind eukaryotenspezifische Proteine, die in verschiedene Schritte der Genexpression in Organellen involviert sind. Sie werden charakterisiert durch ein degeneriertes Motiv aus 35 Aminosäuren, welches bis zu 30 mal in Tandemanordnung innerhalb eines Proteins vorkommt. Seit ihrer Entdeckung im Jahr 2000, liegt das Ziel in der Aufklärung der Funktion und Struktur dieser neuen Proteinfamilie.

In dem Modellorganismus *Neurospora crassa* wurden neun PPR-Proteine identifiziert, welche bereits in vorangegangenen Arbeiten mit Hilfe von Deletionsmutanten untersucht wurden. In den Mutanten der Gene *ncu06461* sowie *ncu07684* zeigten sich Defekte in der korrekten Assemblierung vom Atmungskettenkomplex I sowie Veränderungen in der Prozessierung bzw. Synthese von Transkripten für mitochondrial kodierte Untereinheiten des Membranarms.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein direkter Zusammenhang zwischen Komplex-I-Defekt und der Abwesenheit der Gene *ncu06461* sowie *ncu07684* über die erfolgreiche Komplementation der Deletionsmutanten hergestellt, welche durch eine wiederhergestellte Komplex-I-Aktivität nachgewiesen wurde. Anschließend erfolgte die funktionelle Charakterisierung dieser Proteine. Nach Optimierung war es möglich, die Gene heterolog in *Escherichia coli* als Fusionsproteine mit C-terminalem His-*tag* ohne mitochondriale Präsequenz und unter Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock zu exprimieren. Die Proteinisolierung wurde in einem einstufigen Prozess mittels immobilisierter Metallionen Affinitätschromatographie durchgeführt.

Mit dem Protein $\Delta 95$ -*ncu06461*-His wurden Kristallisationsversuche durchgeführt, welche der Bestimmung der Strukturanalyse des Proteins mittels Röntgenbeugung dienen sollen.

In Retardierungsanalysen wurde die spezifische Bindung des Proteins $\Delta 95$ -*ncu06461*-His an das RNA-Fragment am Exon-Intron-Übergang des Transkripts für die Untereinheit ND4 des Komplex I in Anwesenheit von Magnesium-Ionen nachgewiesen. Ein Einfluss des Proteins auf die Spleißvorgänge des ND4-Introns wird folglich vermutet. Die Funktion des

Proteins liegt vermutlich in der Bindung katalytisch aktiver RNA-Strukturen, um die Rekrutierung von Effektorproteinen zum Transkript zu ermöglichen.

1. Summary

Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins are eukaryote specific proteins implicated in various steps of organellar gene expression. They are characterised by a degenerated 35 amino acid motif, which can be repeated in tandems up to 30 times. Since the discovery of the Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins in the year 2000, the aim is to decipher the function and structure of this new protein family.

Nine PPR proteins have been identified in the model organism *Neurospora crassa* and have been examined in previous studies by means of knockout mutants. Mutants of the genes *ncu06461* and *ncu07684* revealed defects in the assembly of respiratory chain complex I as well as changes in the processing respectively synthesis of transcripts for subunits of the membrane arm.

This work confirms a direct link between the absence of the genes *ncu06461* and *ncu07684* and the defect in complex I via complementation mutants, where the formation of complex I was restored. Subsequently these proteins were characterised functionally. After optimisation it was possible to heterologously express the proteins as fusion proteins with a C-terminal His-tag without their mitochondrial presequence using osmotic stress and heatshock. The proteins were purified in a one-step approach via immobilised metal ion affinity chromatography.

Attempts towards structure determination via x-ray diffraction were carried out by crystallising protein $\Delta 95$ -*ncu06461*-His.

Gel retardation analysis revealed an interaction between the protein $\Delta 95$ -*ncu06461*-His and an RNA fragment consisting of the exon/intron junction of transcript for subunit ND4 of respiratory chain complex I in the presence of magnesium ions. An influence of the protein on splicing of the ND4 intron is assumed. The protein may function by binding to catalytic active RNA structures to target effector proteins to the transcript.

2. Einleitung

Mitochondrien produzieren den Hauptteil der für viele biologische Prozesse unabdingbaren Energie in Form von ATP mithilfe des Systems der oxidativen Phosphorylierung. Das System der oxidativen Phosphorylierung besteht aus den drei protonenpumpenden Komplexen I, III und IV der Atmungskette sowie dem Komplex V, welche in Eukaryoten in der inneren Mitochondrienmembran lokalisiert sind. Durch den Übergang von Elektronen innerhalb der Komplexe der Atmungskette wird Energie frei, welche zum Aufbau eines Protonengradienten über die Membran genutzt wird und anschließend die Synthese von ATP durch Komplex V ermöglicht (Saraste 1999).

Das mitochondriale Genom enthält eine geringe Anzahl von Genen, welche für die Synthese der Komplexe, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, benötigt werden. Die Genexpression in Mitochondrien umfasst eine Reihe von posttranskriptionellen Prozessen, die durch RNA-bindende Proteine reguliert werden. Diese Proteine haben einen essentiellen Einfluss auf die Prozessierung der prä-mRNA sowie die Editierung, Translation und Stabilität der mRNAs. Zu diesen Proteinen gehören die Pentatricopeptid-*repeat*- (PPR) Proteine, welchen in Mitochondrien und Chloroplasten eine große Relevanz für den RNA-Metabolismus zugesprochen wird (Schmitz-Linneweber und Small 2008).

2.1 Mitochondriale Genexpression

Mitochondrien sind Organellen, die aufgrund ihres endosymbiotischen Ursprungs ein kleines, rudimentäres Genom sowie eine vollständige Genexpressions-Maschinerie enthalten. Das zirkuläre mitochondriale Genom des Hyphenpilzes *Neurospora crassa* besitzt eine Größe von ca. 65 kb und beinhaltet Gene, welche für Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe und der ATP-Synthase kodieren und die kleinen und großen ribosomalen RNAs sowie 27 tRNAs, welche für ihre Translation benötigt werden. Ungefähr die Hälfte des Genoms kodiert für die sieben Untereinheiten ND1-6 und ND4L des

Komplex I. Weiterhin werden das Apocytochrom b von Komplex III, die drei Untereinheiten *cox1-3* für Komplex IV und die drei Untereinheiten ATP6, 8 und 9 für Komplex V mitochondrial kodiert. Abbildung 2.1 zeigt schematisch das mitochondriale Genom von *N. crassa* (Griffiths *et al.* 1995).

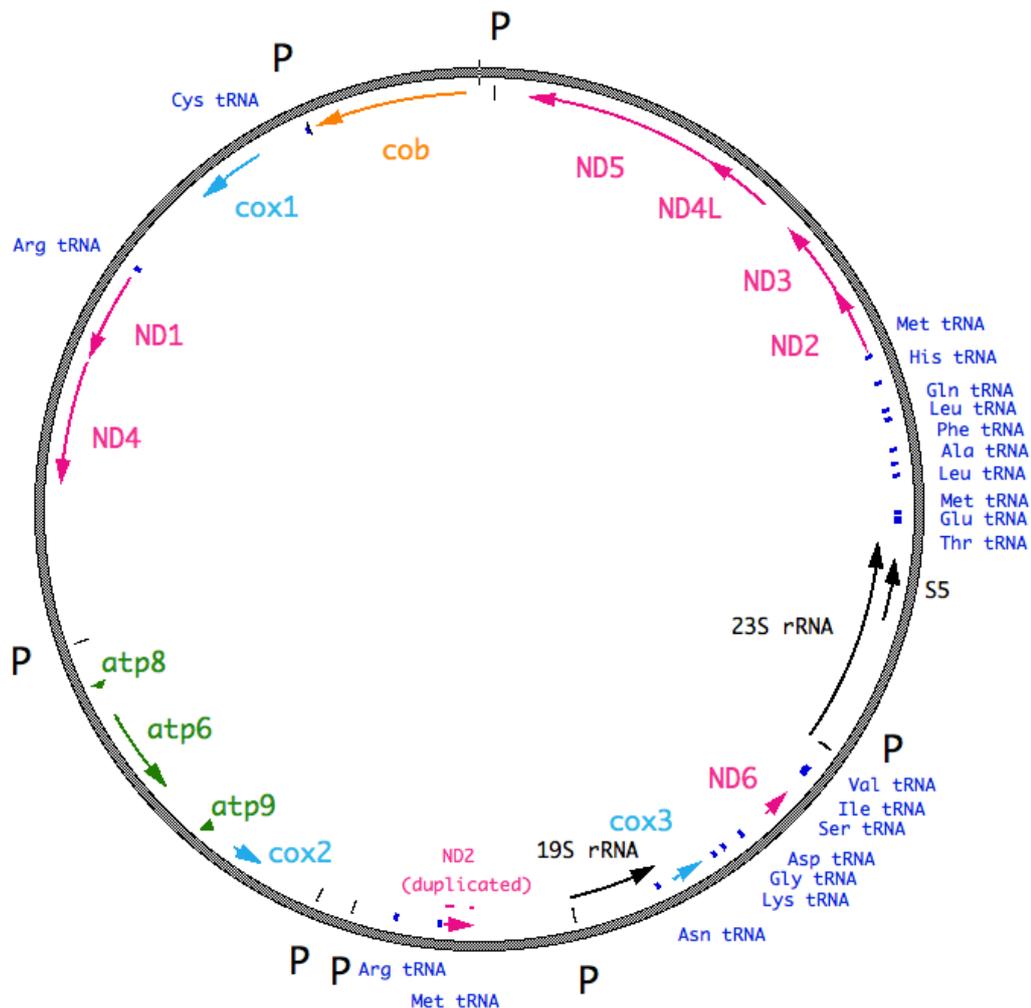


Abbildung 2.1 Das mitochondriale Genom von *N. crassa*. Gezeigt sind die proteinkodierenden Gene für die Untereinheiten von Komplex I in pink, Komplex III in orange, Komplex IV in blau und Komplex V in grün. Die große und kleine rRNA und das ribosomale Protein S5 sind in schwarz dargestellt. Die Pfeile geben die Orientierung der Gene für die Transkription an. Zusätzlich sind die bekannten Promotorsequenzen (P) und die tRNA-Sequenzen in dunkelblau markiert (Solotoff 2011)

Im mitochondrialen Genom von *N. crassa* wurde nur eine geringe Anzahl von fünf Konsensussequenzen für Promotorregionen identifiziert. Die Transkription der Gene erfolgt demnach in multigenetischen Segmenten, welche anschließend zur reifen mRNA durch Spaltungsprozesse und Spleißen der Introns prozessiert werden (Nelson und Macino 1987; Kennell und Lambowitz 1989; Kubelik *et al.* 1990; Bittner-Eddy *et al.* 1994).

In den Mitochondrien von Pilzen wurden bisher die zwei Klassen von Introns, die Gruppe-I- und II-Introns beschrieben, welche sich in Sequenz, Struktur und Mechanismus des Spleißens voneinander unterscheiden (Michel *et al.* 1982; Michel *et al.* 1989; Michel und Ferat 1995).

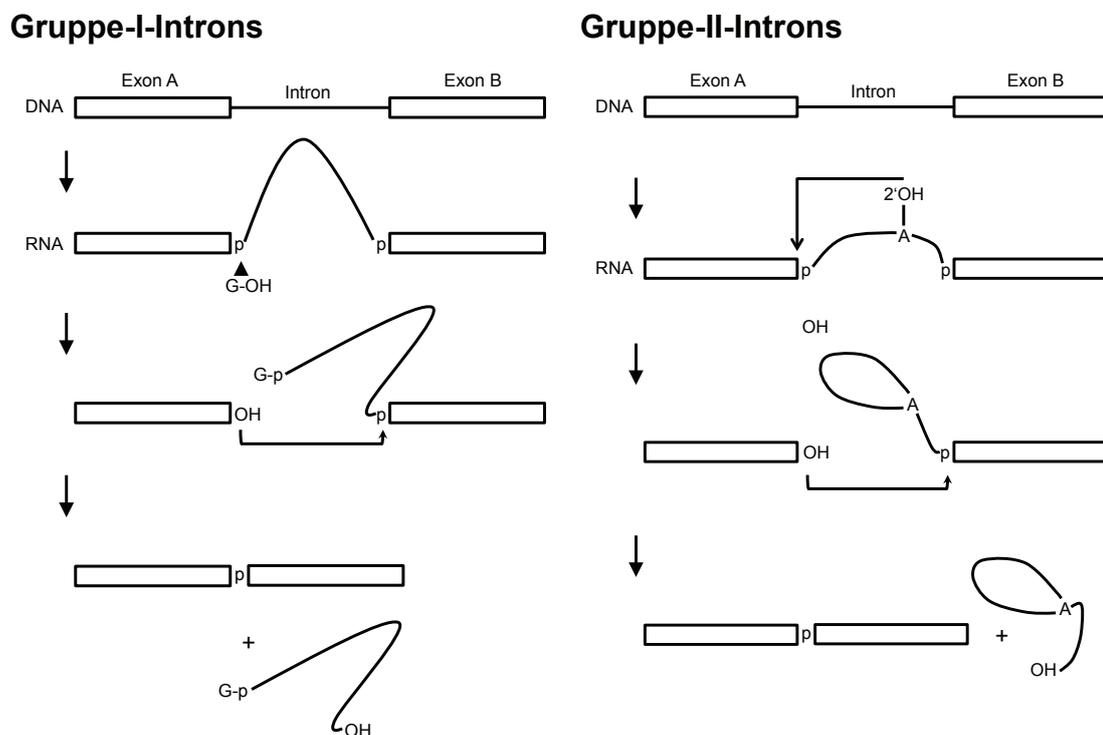


Abbildung 2.2 Spleißen von Introns der Gruppe I und II. Das Spleißen in Gruppe-I-Introns erfolgt durch Umesterung mit einem externen Guanosin. In Gruppe-II-Introns erfolgt eine zweistufige Umesterung über eine intermediäre Lariatstruktur durch ein internes nukleophiles Adenosin (modifiziert nach Griffith *et al.* 1995).

Die Entfernung der Introns erfolgt durch autokatalytisches Spleißen, welche durch die Tertiärstruktur der RNA und die Anwesenheit weiterer Proteine vermittelt wird. Abbildung 2.2 zeigt schematisch die Spleiß-Vorgänge in den Introns der Gruppe I und II. Das Spleißen in Gruppe-I-Introns erfolgt durch Umesterung mit einem externen Guanosin als nukleophile Initiator. Basenpaarung zwischen den 5'- und 3'- Regionen von Exon und Intron definieren die Spleißstellen. Das Intron wird hierbei in linearer Form herausgeschnitten. In Gruppe-II-Introns erfolgt eine zweistufige Umesterung über eine intermediäre Lariatstruktur und ein internes nukleophiles Adenosin, das herausgeschnittene Intron befindet sich anschließend in der Lariat-Form (Jacquier 1996; Bonen und Vogel 2001).

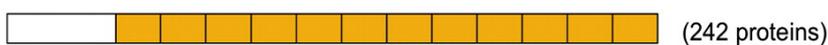
Die Regulierung der Genexpression erfolgt in den Mitochondrien vermutlich durch multiple post-transkriptionelle Prozesse, entweder durch translationale Kontrolle oder Prozessierung bzw. Stabilisierung der Transkripte. Die Mechanismen zur Genexpression sind dabei abhängig von kernkodierten enzymatischen und regulatorischen Proteinen, welche durch Bindung an strukturelle Elemente der mRNA die Translation aktivieren, die mRNA stabilisieren oder die Translation reprimieren (Kleidon *et al.* 2003). Für die post-transkriptionelle Prozessierung in Mitochondrien wurde in den letzten Jahren den Pentatricopeptid-*repeat*-Proteinen eine entscheidende Rolle zugesprochen (Schmitz-Linneweber und Small 2008).

2.2 Pentatricopeptid-*repeat*-Proteine

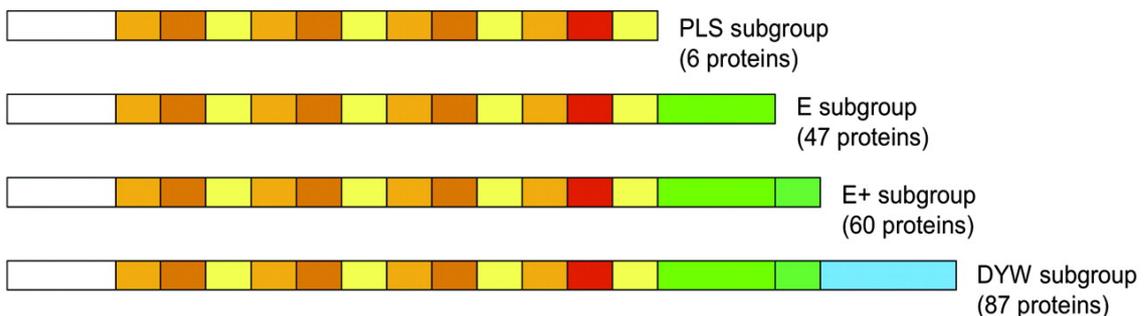
Im Jahr 2000 wurden im Rahmen der Genomsequenzierung von *Arabidopsis thaliana* durch zwei unabhängige Gruppen die Pentatricopeptid-*repeat*-Proteine entdeckt. PPR-Proteine werden charakterisiert durch ein degeneriertes Motiv aus 35 Aminosäuren, welches sich in einem Protein in Tandemanordnung bis zu 30 mal wiederholen kann und namensgebend für die Proteinfamilie ist (Aubourg *et al.* 2000; Small und Peeters 2000; Schmitz-Linneweber und Small 2008). In *A. thaliana* wurde beobachtet, dass nur die Hälfte der ca. 450 PPR-Proteine das klassische Motiv in angrenzenden

Wiederholungen (P-Motiv) enthält, während in der anderen Hälfte reguläre Abstände zwischen den einzelnen Motiven von ca. 65 – 70 Aminosäuren festgestellt wurden. Diese Abstände wurden aufgrund ihrer hohen Verwandtschaft zu den PPR-Motiven als PPR-ähnliche S- (engl. *short*, meistens 31 Aminosäuren) und L- (engl. *long*, meistens 36 Aminosäuren) Motive bezeichnet, wobei die L-Motive in Größe und Sequenz variabel erscheinen. PPR-Proteine aus *A. thaliana* lassen sich demnach in die zwei Unterfamilien P und PLS aufteilen, wobei die PLS-Unterfamilie ihrerseits aufgrund verschiedener C-terminaler Sequenzen unbekannter Funktion in vier Unterklassen aufgegliedert werden kann.

P subfamily



PLS subfamily



Motifs



Abbildung 2.3 Motive der PPR-Proteine aus *A. thaliana*. PPR-Proteine aus *A. thaliana* unterteilen sich in die P und PLS-Untergruppe, wobei die PLS-Untergruppe ihrerseits in die vier Unterklassen PLS, E, E+ und DYW aufgeteilt wird. In Klammern sind die Anzahl der Proteine in *A. thaliana* angegeben (Lurin *et al.* 2004)

Ausschließlich in PPR-Proteinen der PLS Unterfamilie wurden zusätzliche C-terminale Domänen identifiziert, die mit E (engl. *extended*), E+ und DYW (Benennung aufgrund von drei konservierten Aminosäuren) bezeichnet werden.

Dabei treten diese Domänen nur einzeln und nie wiederholt in einem Protein auf. Daraus entwickelten sich die vier Unterklassen der PLS Unterfamilie: (1) Proteine ohne C-terminale Domäne, (2) Proteine mit E-Motiv, (3) Proteine mit E- und E+-Motiv, (4) Proteine mit E-, E+- und DYW-Motiv (Lurin *et al.* 2004). Die PLS- Untergruppe ist dabei spezifisch für Pflanzen und steht in Zusammenhang mit der Editierung. Die Darstellung der Untergruppierung der PPR-Proteine erfolgt in Abbildung 2.3 (Lurin *et al.* 2004). PPR-Proteine wurden in einer Vielzahl und ausschließlich in eukaryotischen Organismen identifiziert. Bemerkenswert ist die zahlreiche Verbreitung in terrestrischen Pflanzen im Vergleich zu der geringen Anzahl von PPR-Proteinen in anderen eukaryotischen Organismen. Während in *A. thaliana* und *O. sativa* mehrere hundert Proteine dieser Familie auftreten, kodieren die Genome nicht-pflanzlicher Eukaryoten nur für eine geringe Anzahl an PPR-Proteinen, darunter beispielsweise für sechs in *Homo sapiens* (Lurin *et al.* 2004) oder 15 in *Saccharomyces cerevisiae* (Lipinski *et al.* 2011). In *N. crassa* wurden kürzlich neun PPR-Proteine identifiziert (Solotoff *et al.* 2014). Die Abwesenheit von PPR-Proteinen in Prokaryoten und die unüblich große Anzahl dieser Proteine in Pflanzen, stellt bis zum heutigen Tage ein Rätsel dar, indiziert jedoch eine mögliche Expansion dieser Genfamilie während der Evolution der Pflanzen.

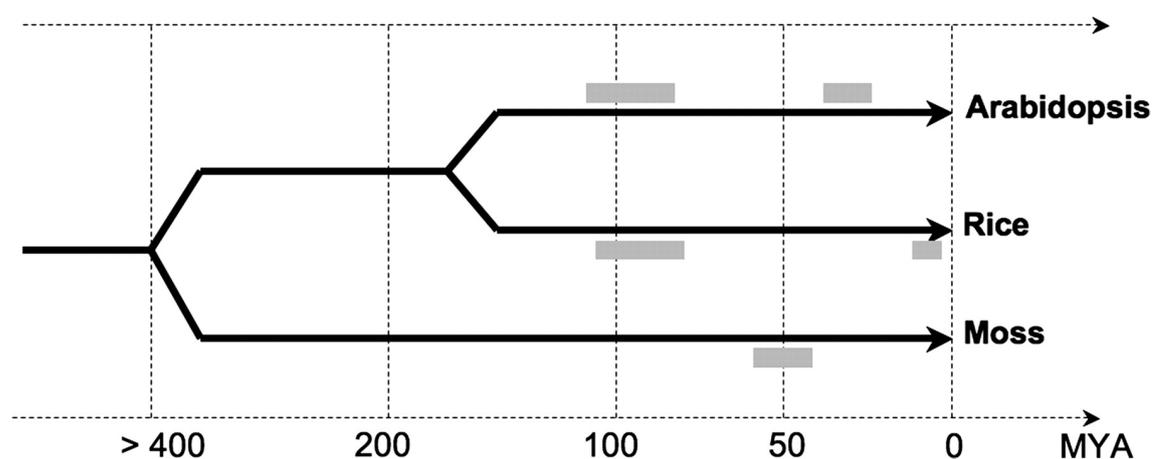


Abbildung 2.4 Ungefähre Zeitpunkte der Divergenz von Moos und Landpflanzen. Die grauen Balken markieren die ungefähren Zeitpunkte, bei denen es Hinweise auf Genduplikationen gibt (O'Toole *et al.* 2008).

Ein Genomvergleich der Samenpflanzen *A. thaliana* und *O. sativa* und dem Laubmoos *Physcomitrella patens* zeigte mit 103 PPR-Proteinen eine deutlich geringere Anzahl im Moos im Vergleich zu den vergleichbaren Anzahlen von 450 in *A. thaliana* und 477 in *O. sativa*. Demnach wird die Expansion der PPR-Proteine erst nach der Divergenz von Moos und Landpflanzen vermutet (Abbildung 2.4). Eine Auffälligkeit der PPR-Gene aus den Samenpflanzen ist die Abwesenheit von Introns in einer Mehrzahl der Gene. Dies gab Hinweise auf die mögliche Expansion der PPR-Proteine durch Retrotransposition. Hierbei wird reife mRNA revers transkribiert und ins Genom integriert (Lurin *et al.* 2004; Babushok *et al.* 2007; O'Toole *et al.* 2008).

2.3 Struktur von PPR-Proteinen

Aufgrund der Ähnlichkeit zum TPR- (*Tetratricopeptide repeat*) Motiv wurde für das PPR-Motiv eine ähnliche Struktur postuliert. Beide Motive werden der α -Solenoid-Superfamilie zugeordnet, welche sich durch die multiple Wiederholung nahezu identischer Sekundärstrukturen aus α -Helices auszeichnet (Schmitz-Linneweber und Small 2008; Fournier *et al.* 2013).

Das TPR-Motiv besteht aus einem degenerierten Motiv aus 34 Aminosäuren, welches durch 3-16 Tandemwiederholungen in einem Protein ein Gerüst für Protein-Protein-Interaktionen bildet. TPR-Domänen bilden zwei antiparallele α -Helices, welche ihrerseits durch die tandemartigen Wiederholungen eine rechtsgängige Superhelix mit einem helikalen Tunnel zur Erkennung von Proteinen bilden (Das *et al.* 1998). Für das PPR-Motiv wurden die gleiche charakteristische Sekundärstruktur aus zwei antiparallelen α -Helices sowie die Superhelix als Tertiärstruktur vorhergesagt (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Im Gegensatz zu der Proteinbindung bei den TPR-Proteinen wurde für PPR-Proteine die Assoziation mit einzelsträngiger RNA vorgeschlagen. Der von der Superhelix eingeschlossene Innenraum enthält Vorhersagen zufolge im Inneren vorherrschend hydrophobe Aminosäuren und eine positive geladene untere Grenze. Zusammen mit der hohen Anzahl der Motivwiederholungen in

einem Protein wurden folglich multiple oder größere hydrophile und saure Liganden vermutet (Small und Peeters 2000).

Die humane mitochondriale RNA-Polymerase ist das erste PPR-Protein, dessen Struktur gelöst wurde und somit die Formation der vorhergesagten antiparallelen α -Helices der PPR-Motive verifizierte (Ringel *et al.* 2011). Abbildung 2.5 zeigt die Kristallstruktur eines anderen PPR-Proteins PPR10 aus Mais Chloroplasten in Abwesenheit von RNA, welche sich mit einer Auflösung von 2,85 Å bestimmen ließ. PPR10 bildet mit 19 PPR-Motiven der Aminosäuren 107-771 eine rechtsgängige Helix mit zwei Umdrehungen. Die in violett dargestellte N-terminale Domäne enthält drei kurze α -Helices, während der in gelb dargestellte C-Terminus aus einer einzelnen α -Helix besteht (Abbildung 2.5 a). Das 35 Aminosäuren umfassende PPR-Motiv formt ein Haarnadelmotiv aus jeweils einer α -Helix mit vier Umdrehungen, gefolgt von einem Loop aus fünf Aminosäuren. Die zwei Helices, welche als a und b deklariert und in grün und blau dargestellt sind, werden durch zwei Aminosäuren miteinander verbunden (Abbildung 2.5 b).

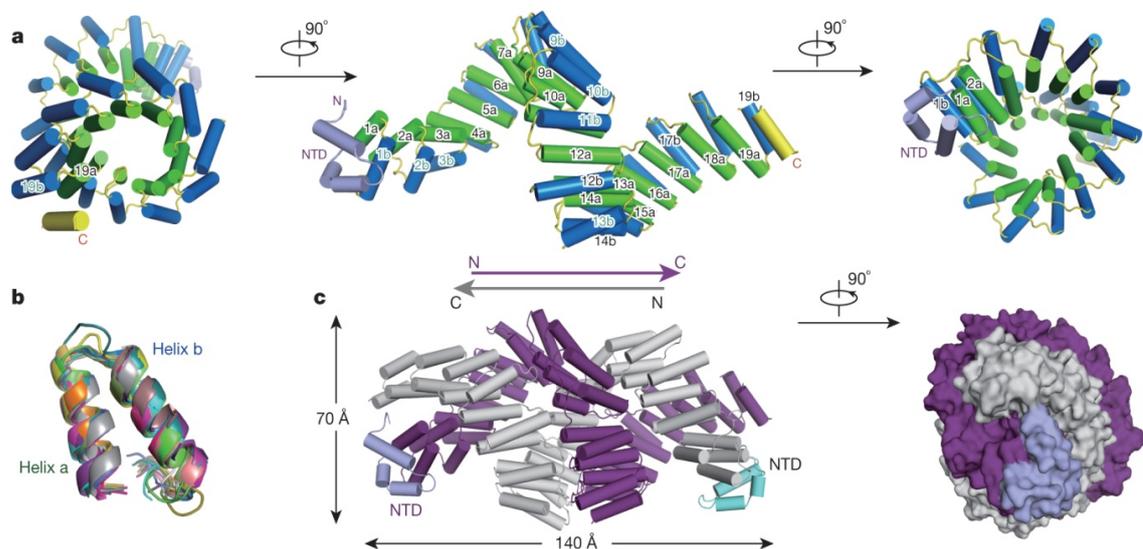


Abbildung 2.5 Kristallstruktur von PPR10. a) Struktur von PPR10 ohne gebundene RNA. Violett: aminoterminaler Domäne, gelb: C-terminale Helix. Die zwei Helices a und b innerhalb eines PPR-Motivs sind in grün und blau dargestellt. b) Strukturelle Überlagerung der 19 PPR-Motive aus PPR10. c) Struktur des PPR10 Dimers (Yin *et al.* 2013).

Die beiden Helices a und b bilden dabei jeweils die innere und äußere Lage der Superhelix. Insgesamt formt PPR10 ein Dimer aus zwei ineinander gewundenen antiparallelen Helices (Abbildung 2.5 c).

Die Bestimmung der Kristallstruktur von PPR10 in Kombination mit RNA lieferte wichtige Hinweise auf den Erkennungsmechanismus von RNA durch die PPR-Motive. Mit den C- und N-Termini der unterschiedlichen Monomere jeweils in räumlicher Nähe wird die Bindung der 5'- und 3'- Region der einzelsträngigen RNA spezifisch realisiert. Die Bindung der ersten vier Nukleotide erfolgt dabei jeweils spezifisch durch den N- und C-Terminus eines Protomers.

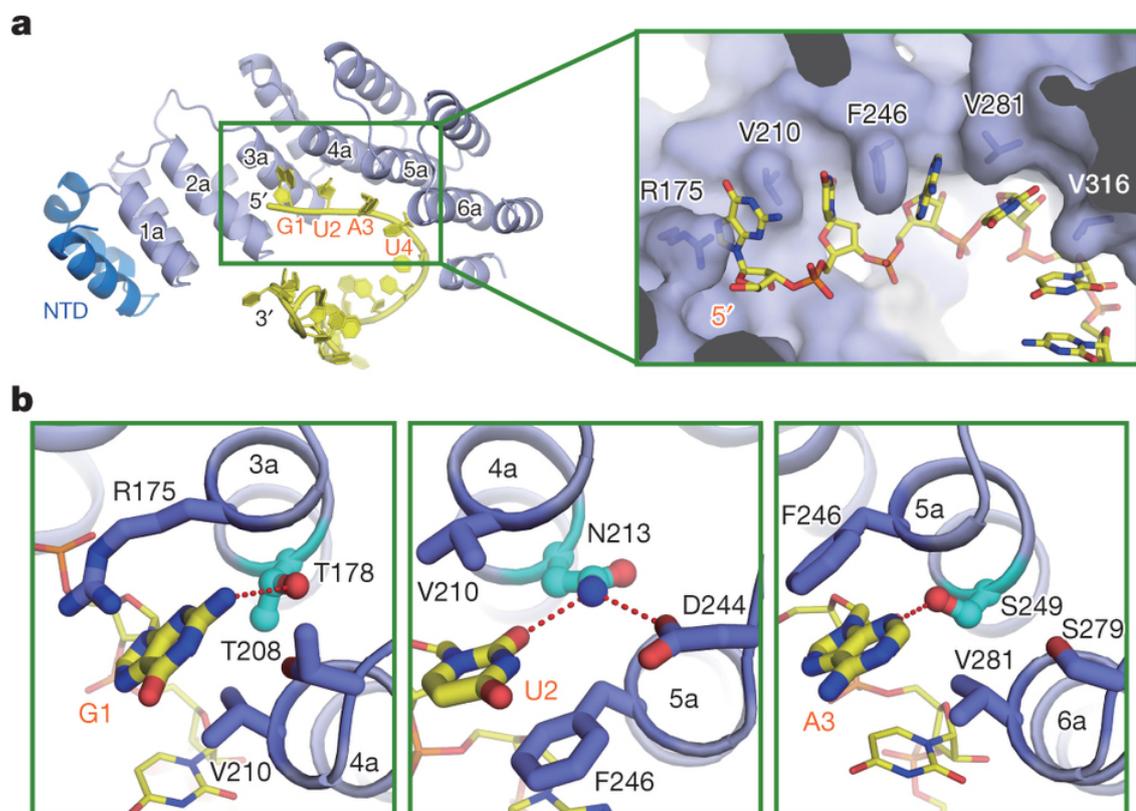


Abbildung 2.6 Basenspezifische Erkennung der einzelsträngigen RNA durch PPR10 Motive. a) Erkennung der vier Nukleotide am 5'-Terminus der RNA in Sandwichkonformation jeweils durch die zweite Aminosäure zweier benachbarter PPR-Motive. b) Die fünfte Aminosäure des Motivs, welche in hellblau dargestellt wird, bildet Wasserstoffbrückenbindungen zu der Base aus, die in rot gepunkteter Linie dargestellt werden (Yin *et al.* 2013).

Jede Base ist dabei von vier Aminosäureresten umgeben, welche für die Koordination von immenser Bedeutung zu sein scheinen. Dabei handelt es sich um die zweite Aminosäure von zwei benachbarten Motiven sowie die fünfte und 35. Aminosäure eines zugehörigen Motivs. Das Phosphatrückgrat und die Ribose werden durch geladene oder polare Aminosäuren koordiniert. Die RNA-Basen-Spezifität wird durch die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den RNA-Basen und einer polaren Aminosäure an fünfter Position des PPR-Motivs erreicht (Abbildung 2.6 b). Jede der vier Basen am 5'-Ende wird über eine Sandwich-Formation durch Van-der-Waals-Kräfte mit der zweiten Position des PPR-Motivs koordiniert (Abbildung 2.6 a). Die 35. Aminosäure befindet sich in direkter Nachbarschaft zur Base. Es wird vermutet, dass Wassermoleküle für die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen polaren Seitenketten und den Basen fungieren. Weitere Wasserstoffbrückenbindungen zwischen der 35. und fünften Aminosäure innerhalb eines PPR-Motivs stabilisieren die Konformation zur Erkennung der Basen (Yin *et al.* 2013). Mit der Aufklärung dieser Struktur wurden die bisher vorhergesagten Strukturen bestätigt.

In 2013 wurde eine weitere Struktur eines PPR-Proteins gelöst. Die ermittelte Struktur von THA8 aus *Brachypodium distachyon*, welche nur fünf PPR-Motive aufweist, zeigt im Gegenzug eine unerwartete RNA-Bindung an der Grenzfläche eines asymmetrisch angeordneten Dimers aus zwei THA8 Monomeren.

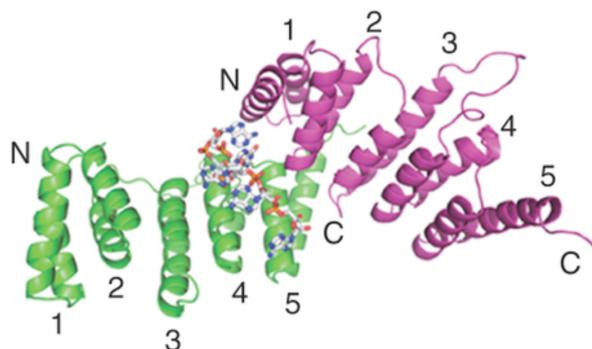


Abbildung 2.7 Struktur von THA8 im Komplex mit RNA. Zwei Monomere, welche in grün und pink dargestellt werden, binden die RNA, welche als Stäbchenmodell dargestellt wird, an der Grenzfläche (Ke *et al.* 2013).

Abbildung 2.7 zeigt die RNA als Stäbchenmodell, welche durch die beiden Monomere, jeweils in grün und pink dargestellt, an der Grenzfläche gebunden wird. Während ein Monomer mit einer flachen, rechteckigen Form keine optimale Voraussetzung für die RNA-Bindung bildet, fördert die Dimerisierung die Ausbildung einer konkaven Oberfläche mit hohem positiven Ladungspotenzial zur Bindung kurzer negativ geladener RNA-Fragmente. Durch die Dimerisierung wird auch die Affinität des Proteins zu RNA erhöht (Ke *et al.* 2013).

Die RNA-induzierte Dimerisierung und Oligomerisierung ist möglicherweise eine Eigenschaft von Proteinen mit einer geringen Anzahl an PPR-Motiven (Ke *et al.* 2013). Insgesamt deuten die unterschiedlichen Strukturen der PPR-Proteine und die dabei ermittelten, verschieden Mechanismen zur Bindung von RNA auf die Variabilität von PPR-Proteinen hin.

2.4 Funktionen von PPR-Proteinen in der mitochondrialen Genexpression

Bei der Entdeckung der PPR-Proteine im Jahr 2000 wurde für viele der Proteine eine mitochondriale oder chloroplastidäre Präsequenz identifiziert (Small und Peeters 2000). Bis zum heutigen Tage wurden die bisher ermittelten Funktionen von PPR-Proteinen dem RNA-Metabolismus von Organellen zugeordnet (Saha *et al.* 2007; Schmitz-Linneweber und Small 2008). Es wird eine direkte sequenzspezifische Interaktion von PPR-Proteinen mit ihrer Ziel-RNA angenommen (Delannoy *et al.* 2007; Schmitz-Linneweber und Small 2008), welche sowohl durch *in-vivo*- als auch *in-vitro*-Experimente belegt wurde (Schmitz-Linneweber *et al.* 2005; Kobayashi *et al.* 2007). Durch genetische und biochemische Untersuchungen konnten die in Abbildung 2.8 dargestellten allgemeinen diversen Funktionen von PPR-Proteinen in der mitochondrialen Genexpression charakterisiert werden (Andrés *et al.* 2007).

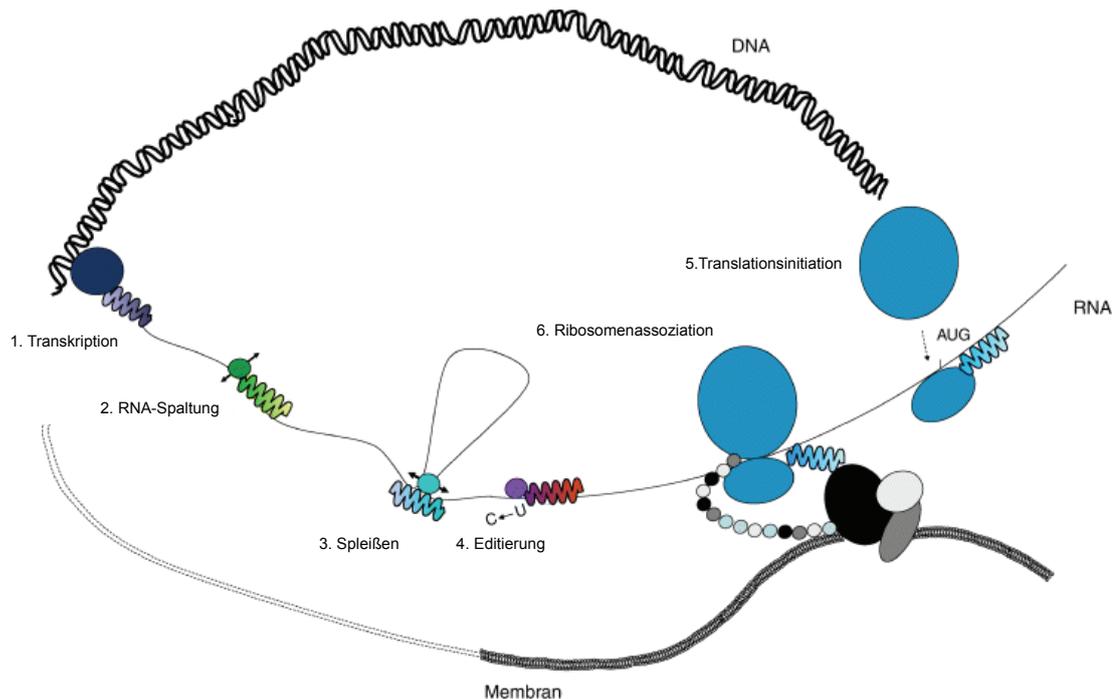


Abbildung 2.8 Funktionen von PPR-Proteinen in der mitochondrialen Genexpression (in Anlehnung an Andrés *et al.* 2007).

1. Transkription: Die Rolle von PPR-Proteinen als Transkriptionsfaktoren wurde beispielsweise in den Mitochondrien aus Weizen sowie Hefe und *A. thaliana* identifiziert. Das Protein p63 aus Weizen besitzt eine Affinität zur Promotorregion von *cox2*, welche die spezifische Transkription der RNA ermöglicht (Ikeda und Gray 1999). Das PPR-Protein GRP23 wurde durch Interaktion mit der RNA-Polymerase II als potenzieller Regulator der Genexpression in Hefe und *A. thaliana* postuliert (Ding *et al.* 2006).

Studien zeigen die Assoziation von PPR-Proteinen mit der RNA-Polymerase, die Funktion der PPR-Proteine wird jedoch eher für die Stabilisierung der naszierenden RNA-Kette als in der Bindung des DNA-Substrats vermutet (Andrés *et al.* 2007).

2. RNA-Spaltung: Die mitochondriale Genexpression ist abhängig von multiplen posttranskriptionellen Prozessen. Die Regulierung der Expression erfolgt in der einfachsten Möglichkeit über die Menge der mRNA durch Stabilisierung der RNA oder Aktivierung der Degradation (Andrés *et al.* 2007).

Die Bindung von PPR-Proteinen verhindert den Zugriff von RNasen und ermöglicht somit die Stabilisierung der RNA. Umgekehrt kann die Komplexbildung von PPR-Proteinen und RNA die Rekrutierung von Endonukleasen realisieren (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Das humane PPR-Protein LRPPRC dient beispielsweise der Stabilisierung von mRNA-Transkripten für Untereinheiten der Cytochrom-c-Oxidase (Xu *et al.* 2012). In *A. thaliana* dient das Protein MTSF1 der Stabilisierung des Transkripts für die Untereinheit ND4 des Atmungskettenkomplex I durch Bindung der 3'-untranslatierten Regionen der reifen mRNA (Haili *et al.* 2013). Die Proteine RF1A und RF1B (engl. *restorer of fertility*) aus Reis hingegen realisieren die Wiederherstellung der cytoplasmatischen, männlichen Sterilität durch Blockieren der Synthese von ORF79 durch endonukleolytische Spaltung oder Degradation der bicistronischen B-ATP6/ORF79-mRNA (Wang *et al.* 2006).

3. Spleißen: Die Interaktion von PPR-Proteinen mit stabilen Sekundärstrukturen von Gruppe-II-Introns ist essentiell für das Spleißen von mitochondrialer mRNA (Schmitz-Linneweber und Small 2008). In *A. thaliana* wurde das Protein OTP43 als PPR-Protein identifiziert, welches ausschließlich für das Spleißen des ersten Introns des Transkripts für die Untereinheit ND1 des Atmungskettenkomplex I verantwortlich ist (de Longevialle *et al.* 2007). Das Protein CCM1 aus *S. cerevisiae* ist essentiell für die Entfernung des jeweils vierten Introns des Transkripts für Cytochrom b des Komplex III sowie für die Untereinheit cox1 des Komplex IV der Atmungskette (Moreno *et al.* 2009).

4. Editierung: Die Editierung stellt in den Mitochondrien höherer Pflanzen einen häufigen posttranskriptionellen Prozess dar. Die Mitochondrien von *A. thaliana* und Reis umfassen beispielsweise mehrere hundert Editierungsstellen (Giege und Brennicke 1999; Notsu *et al.* 2002). Der Austausch eines Cytidins durch ein Uracil in der reifen mRNA wird durch PPR-Proteine mittels Bindung kurzer cis-Elemente aufwärts der Editierungsstelle realisiert (Schmitz-Linneweber und Small 2008). In *A. thaliana* wurden die beiden PPR-Proteine MEF9 und SLO2 als Faktoren für die Editierung von RNA identifiziert. MEF9 wird dabei für die Editierung des Transkripts für die Untereinheit ND7 von Komplex I und SLO2 wurde mit der Wirkung auf verschiedene Editierungsstellen, die für den

Energiemetabolismus benötigt werden, assoziiert (Takenaka 2010; Zhu *et al.* 2012). Die hohe Anzahl von RNA-Editierungsstellen stellt eine mögliche Erklärung für die Expansion der PPR-Proteine in Pflanzen dar (O'Toole *et al.* 2008).

5. Translationsinitiation: PPR-Proteine partizipieren an der Translation durch Bindung spezifischer Segmente in den 5'-untranslatierten Regionen der mRNA (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Die ersten beiden beschriebenen PPR-Proteine sind das Protein PET309 aus Hefe sowie sein Ortholog Cya-5 aus *N. crassa*, welche als essentielle Faktoren für die Translation des Transkripts für die Untereinheit *cox1* von Komplex IV fungieren. PET309 aktiviert die Initiation der Translation durch die 5'-Region der untranslatierten mRNA (Manthey und McEwen 1995; Coffin *et al.* 1997). Ein weiteres PPR-Protein, welches für die Translation als akzessorischer Initiationsfaktor benötigt wird, stellt das Protein AEP3 aus *S. cerevisiae* dar (Lee *et al.* 2009).

6. Ribosomenassoziation: In Säugetieren wurde eine Assoziation von PPR-Proteinen und der kleinen ribosomalen Untereinheit identifiziert (Koc und Spremulli 2003). In *S. cerevisiae* wurde für das PPR-Protein PET309 zusätzlich eine Assoziation mit Nam1 nachgewiesen, welches seinerseits mit der mitochondrialen RNA Polymerase interagiert. Demnach wird eine Verbindung von Transkriptions- und Translationsmaschinerie durch PPR-Proteine postuliert (Naithani *et al.* 2003). Generell wird eine funktionelle Verbindung von Transkription und Translation vermutet, welche durch PPR-Proteine vermittelt wird. Die mitochondriale mRNA wird dabei an der inneren Membran translatiert und die synthetisierten Proteine werden direkt zur Assemblierung der Komplexe der oxidativen Phosphorylierung in die Membran integriert (Krause *et al.* 2004b; Shadel 2004).

Tabelle 2.1 stellt noch einmal die beschriebenen PPR Gene und ihre Funktionen sortiert nach den unterschiedlichen Organismen dar.

Tabelle 2.1 PPR Gene in unterschiedlichen Organismen und ihre Funktion

Spezies	Name	Funktion im RNA-Metabolismus	Quelle
<i>A. thaliana</i>	GRP23	Transkription (1)	Ding <i>et al.</i> 2006
	MTSF1	Stabilität (2)	Haili <i>et al.</i> 2013
	OTP43	Spleißen (3)	de Longevialle <i>et al.</i> 2007
	MEF9	Editierung (4)	Takenaka 2010
	SLO2	Editierung (4)	Zhu <i>et al.</i> 2012
Hefe (<i>S. cerevisiae</i>)	PET309	Translation (5), Transkription (1)	Manthey und McEwen 1995 Naithani <i>et al.</i> 2003
	AEP3	Translation (5)	Lee <i>et al.</i> 2009
	GRP23	Transkription (1)	Ding <i>et al.</i> 2006
	CCM1	Spleißen (3)	Moreno <i>et al.</i> 2009
Maus (<i>M. musculus</i>)	LRPPRC	Stabilität (2)	Xu <i>et al.</i> 2012
<i>N. crassa</i>	cya-5	Translation (5)	Coffin <i>et al.</i> 1997
Reis (<i>O. sativa</i>)	RF1A und RF1B	RNA-Spaltung (2)	Wang <i>et al.</i> 2006
Weizen	p63	Transkription (1)	Ikeda und Gray 1999

Die bei der Funktion in Klammern angegebenen Zahlen entsprechen der Nummerierung aus Abbildung 2.8.

Bisher wurden den PPR-Proteinen keine katalytischen Fähigkeiten zugeordnet. Dies legt die Vermutung nahe, dass PPR-Proteine nur einen indirekten Einfluss ausüben und zusätzliche Faktoren für die korrekte Funktion benötigt werden. Dies gilt besonders vor dem Hintergrund, dass bei vielen PPR-Proteinen keine katalytischen Domänen identifiziert werden konnten. Eine Assoziation von weiteren Proteinen mit dem PPR-RNA-Komplex wird demnach für die Funktion in der RNA-Prozessierung vermutet (Delannoy *et al.* 2007; Schmitz-Linneweber und Small 2008). Bisher wurden nur eine geringe Anzahl von Proteinen als Interaktionspartner von PPR-Proteinen über *Yeast Two-Hybrid* Systeme identifiziert. Darunter die bereits beschriebenen Proteine GRP23, welches mit einer Untereinheit der RNA-Polymerase II interagiert (Ding *et al.* 2006) sowie LRPPRC, für das gleich mehrere Interaktionspartner beschrieben wurden (Liu

und McKeehan 2002). Für das PPR-Protein Mss51 aus *S. cerevisiae* wurde sowohl eine RNA- als auch Protein-bindende Funktion ermittelt. Mss51 bindet ähnlich wie das PET309 sowohl an untranslatierte Regionen der mRNA des Transkripts für die Untereinheit *cox1* des Komplex IV als auch an das neu translatierte, nicht assemblierte Protein (Perez-Martinez *et al.* 2003). Eine Koordination von Translation und Insertion in die Membran durch das PPR-Protein zur Assemblierung des Komplex IV wird vermutet.

Einen Gegensatz zu den bisher ermittelten Funktionen von PPR-Proteinen bildet die Proteinbindende Aktivität des Proteins CIA84 aus *N. crassa*, welches kürzlich als PPR-Protein identifiziert wurde (Solotoff *et al.* 2014). CIA84 übt seine Funktion in vielen Zyklen der Formation des Membranarms als spezifisches Chaperon aus und ist dabei an der korrekten Assemblierung des Atmungskettenkomplex I beteiligt (Kuffner *et al.* 1998). Demnach stellt CIA84 das erste PPR-Protein dar, für das bisher ausschließlich eine Interaktion mit Protein anstelle von RNA nachgewiesen wurde. Eine zusätzliche RNA-bindende Funktion des Proteins ähnlich zu Mss51 kann jedoch vermutet werden (Solotoff *et al.* 2014). Die hier ermittelte Funktion im Assemblierungsprozess steht im Einklang mit der Theorie der Funktion von PPR-Proteinen zur Verbindung von Transkription, Translation und Assemblierung der Komplexe, die in die oxidative Phosphorylierung involviert sind (Krause *et al.* 2004b; Shadel 2004).

2.5 PPR-Proteine aus *Neurospora crassa*

Basierend auf dem von Small und Peeters (2000) beschriebenen Motiv der PPR-Proteine wurden das Prosite Motiv PS51375, TIGRFam Motiv TIGR00756 und die Pfam Motive PF01535, PF12854, PF13041, PF13812 zur Identifikation von PPR-Proteinen entwickelt. In *Neurospora crassa* wurden anhand dieser Motive neun PPR identifiziert, bei denen die Anzahl der konservierten Motive von vier bis 17 reicht (Tabelle 2.2). Innerhalb der filamentösen Ascomyceten zeigte sich dabei eine hohe Verwandtschaft der Gene, welche außerhalb in anderen Organismen nicht besteht (Solotoff *et al.* 2014).

Tabelle 2.2 PPR Motive in Proteinen aus *Neurospora crassa*

Gen	Pfam Motive	TIGR00756	PS51375	Konservierte Motive
ncu02674	0 (2)	4	0	4
ncu03342	1 (1)	4	4	4
ncu07684	1 (1)	3	0	8
ncu07871	1 (1)	3	3	4
ncu08674	3 (3)	12	17	17
ncu08692	1 (3)	6	7	12
ncu20322	0 (2)	3	3	6
ncu20711	2 (1)	4	6	8
ncu21875	2 (0)	4	0	4

Die Anzahl der Pfam Motive resultiert aus den Motiven PF01535, PF12854, PF13041 und PF13812. Insignifikante Motive sind in Klammern angegeben. Die Anzahl der konservierten Motive bezieht sich auf Motive, die in mindestens zwei Mitgliedern der Proteinfamilie zu finden sind. Modifiziert nach (Solotoff *et al.* 2014)

Da die Funktion von PPR-Proteinen der Genexpression in den Mitochondrien zugeordnet wird und das mitochondriale Genom hauptsächlich für Untereinheiten der Atmungskette kodiert, ist ein Einfluss der PPR-Proteine auf die mitochondriale Atmungskette zu vermuten. Der Einfluss der PPR Gene auf die Komplexe der Atmungskette wurde über ihre zugehörigen Deletionsmutanten untersucht, die im Rahmen des *Neurospora Genome Project* (Colot *et al.* 2006) generiert wurden. Zusätzlich zu der Bezugsmöglichkeit von Deletionsmutanten eignet sich *N. crassa* aufgrund seiner verzweigten Atmungskette besonders zur Charakterisierung der PPR-Proteine, da Gendefekte der Komplexe I oder III und IV keine letalen Auswirkungen haben (Nehls *et al.* 1992; Duarte und Videira 2009). Für die drei Gene ncu02674, ncu07871 und ncu20322 konnten jedoch keine Deletionsmutanten erstellt werden, sodass ein essentieller Einfluss auf die Synthese des Komplex V oder ein genereller Effekt auf die mitochondriale Genexpression vermutet wird (Solotoff *et al.* 2014).

Die zwei PPR-Proteine *cya-5* (*ncu08692*) und *CIA84* (*ncu21875*) wurden bereits funktionell charakterisiert (Coffin *et al.* 1997; Kuffner *et al.* 1998). Von den vier verbleibenden Genen *ncu03342*, *ncu08674*, *ncu07684* und *ncu20711* wurden die Mitochondrien isoliert und ihre Protein- sowie Cytochromkomposition analysiert (Abbildungen 2.9 und 2.10).

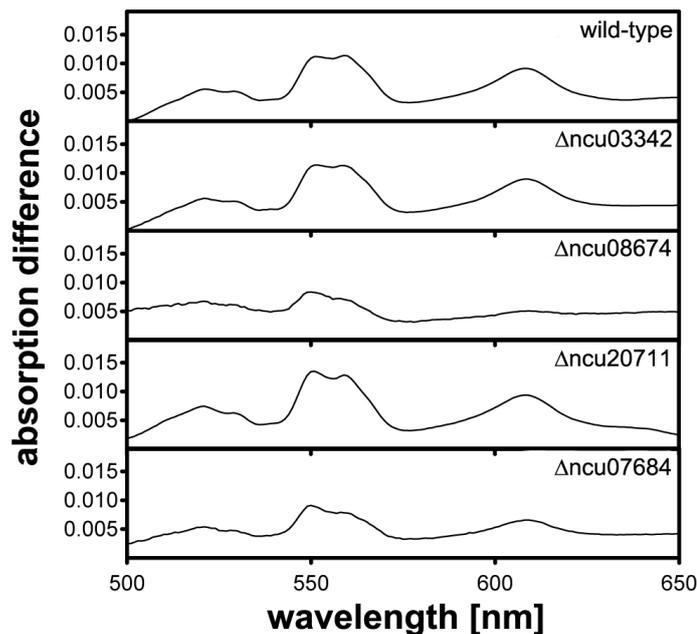


Abbildung 2.9 Absorptionsdifferenzspektren. Mitochondrien wurden unter nativen und mittels Natriumdithionit reduzierten Bedingungen gemessen. Die Absorptionsmaxima entsprechen 605 nm für Cytochrom a, 560 nm für Cytochrom b und 550 nm für Cytochrom c (Solotoff *et al.* 2014)

Die Mutante $\Delta\text{ncu03342}$ zeigt sowohl in der Blau Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) als auch bei der Bestimmung der Cytochromgehalte mittels Absorptionsdifferenzspektren ein gleichwertiges Ergebnis zu dem Wildtyp, sodass kein Defekt der Atmungskettenkomplexe ermittelt wurde. Im Gegenzug dazu weist die Mutante $\Delta\text{ncu08674}$ geringere Mengen aller Komplexe der Atmungskette auf. Es wird eine pleiotrope Wirkung des Proteins vermutet, die jedoch keine Defekte in der Assemblierung einzelner Atmungskettenkomplexe beinhaltet. Die Abwesenheit der PPR-Proteine *ncu20711* (FGSC 20112) und *ncu07684* (FGSC 20449) in den entsprechenden

Deletionsmutanten führt zu einem nicht vollständig assemblierten Komplex I, bei dem nur der periphere Arm in der BN-PAGE nachgewiesen wird und über die Abwesenheit des Membranarms spekuliert werden kann.

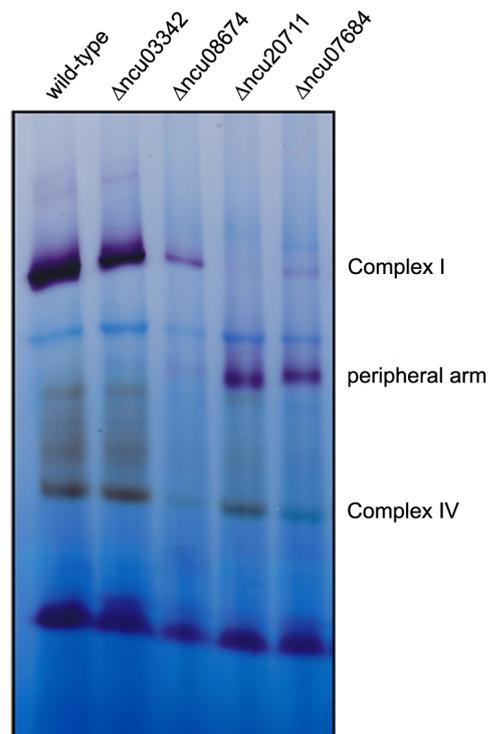


Abbildung 2.10 Blau Nativ-PAGE mit spezifischer Aktivitätsfärbung der Komplexe I und IV (Solotoff *et al.* 2014).

Die weiteren Komplexe der Atmungskette sind nicht essentiell betroffen, da im Vergleich mit dem Wildtyp keine beziehungsweise nur geringe Abweichungen in den Cytochromgehalten auftreten, demnach wird ein spezifischer Einfluss auf die Assemblierung des Membranarms von Komplex I vermutet.

Da für die PPR-Proteine ein Einfluss auf den RNA-Metabolismus der Mitochondrien postuliert wird, wurde der Einfluss der Gendeletion der PPR-Proteine auf die Transkripte von Untereinheiten des Komplex I mittels Northern-Blot-Analyse untersucht (Abbildung 2.11). Die Visualisierung der Transkripte erfolgte mittels radioaktiv markierter PCR-Produkte (Solotoff *et al.* 2014).

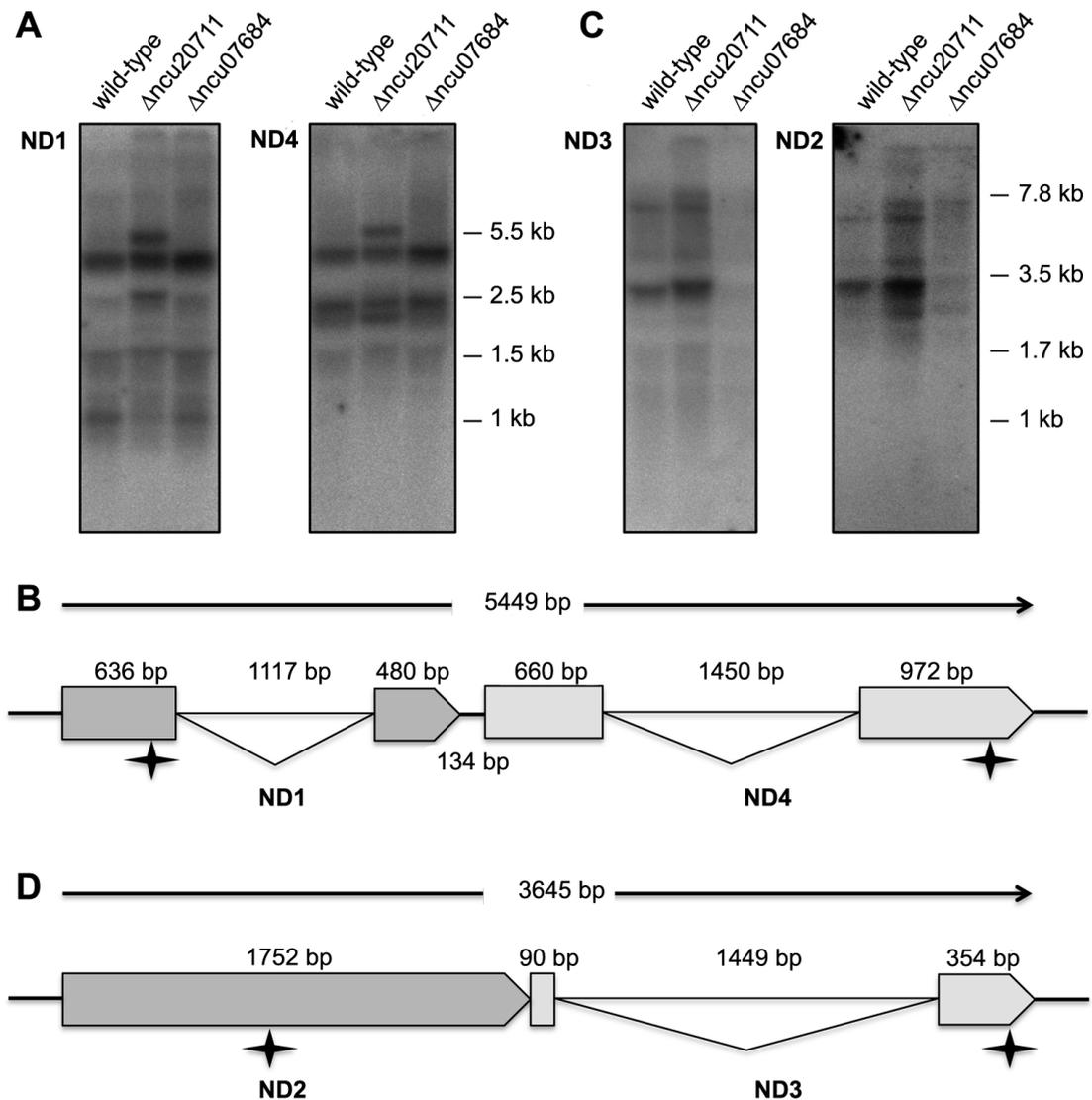


Abbildung 2.11 Northern-Blot-Analyse von mitochondrial kodierten Untereinheiten von Komplex I. Die Gesamt-RNA von Wildtyp und den beiden Deletionsmutanten wurde isoliert, mittels denaturierender Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und auf eine Nylon-Membran übertragen. Es wurden vier verschiedene radioaktiv markierte PCR-Produkte als Sonden verwendet. A. Autoradiogramm mit Sonden gegen benachbarte Gene ND1 und ND4. B. Schematische Darstellung der Gene ND1 und ND4. Exons sind grau und Introns als Dreiecke dargestellt. Die Sterne geben die Positionen der verwendeten Sonden an. Die Pfeile geben die Orientierung der Gene an. C. Autoradiogramm mit Sonden gegen benachbarte Gene ND2 und ND3. D. Schematische Darstellung der Gene ND2 und ND3 (Solotoff *et al.* 2014).

Die Northern-Blot-Analyse der Transkripte für die Untereinheiten ND1 und ND4 zeigt in der Mutante Δ ncu20711 Veränderungen in der Prozessierung dieser Transkripte auf (Abbildung 2.11 A). Zusätzliche Banden in der Größe von 5,4 kb mit beiden Sonden sowie in der Größe von 2,5 kb mit der Sonde für ND1 werden in der Deletionsmutante Δ ncu2077 sichtbar, während diese Banden im Wildtyp und in der weiteren Deletionsmutante nicht erscheinen. Die Auswertung des Bandenmusters lässt eine bicistronische Transkription von ND1 und ND4 vermuten, welche in Abwesenheit des Gens ncu20711 verzögert ist. Ein Einfluss des Proteins auf die Spleißvorgänge der Introns wurde postuliert. Dennoch werden die Spleiß- und Spaltvorgänge der RNA fortgesetzt, sodass eine verzögerte, aber nicht aufgehobene Prozessierung geschlussfolgert wird. Die verzögerten Spleißvorgänge der Introns legt die Vermutung nahe, dass auch die Synthese der Untereinheiten ND1 und ND4 drastisch reduziert ist, welche den Komplex-I-Defekt verursacht.

Reduzierte Signale der polycistronischen mRNA der Transkripte ND2 und ND3 in der Deletionsmutante des Gens ncu07684 lassen die Essentialität des Gens für den RNA Metabolismus in Mitochondrien vermuten (Abbildung 2.11 C). Der Einfluss des Proteins auf die Transkription der Gene oder die Stabilität der transkribierten RNA kann spekuliert werden. Zudem stellt die Degradierung der RNA aufgrund von fehlender Prozessierung durch die Abwesenheit des Gens eine zusätzliche Möglichkeit dar (Solotoff *et al.* 2014).

Aufgrund des manifestierten spezifischen Einflusses der beiden Gene ncu20711 und ncu07684 erfolgte die Fokussierung auf die funktionelle Charakterisierung der zwei Proteine in der folgenden Arbeit.

2.6 Ziel der Arbeit

Seit der Entdeckung des PPR-Motivs verdichten sich die Hinweise, dass die Mitglieder dieser Proteinfamilie in die Expression mitochondrialer Genome involviert sind. Genetische Daten implizieren einen Einfluss von PPR-Proteinen auf diverse Aspekte des mitochondrialen RNA Metabolismus. Dabei wird eine

direkte Interaktion zwischen den PPR-Proteinen und ihrer Ziel-RNA vorgeschlagen (Lurin *et al.* 2004; Schmitz-Linneweber und Small 2008).

Für die beiden Proteine *ncu07684* sowie *ncu06461* aus *N. crassa* wurde in vorangegangenen Arbeiten über die Untersuchung von Deletionsmutanten ein Einfluss auf die Prozessierung von mitochondrialen Transkripten für Untereinheiten des Atmungskettenkomplex I postuliert (Solotoff 2011). Ziel dieser Arbeit war die *in-vitro*-Charakterisierung beider Proteine zur weiterführenden Bestimmung ihrer Rolle im mitochondrialen RNA-Metabolismus. Die Resultate dieser biochemischen Analysen lassen möglicherweise detaillierte Einblicke in die bisher lediglich in geringen Maßen verstandene Funktion und Struktur dieser neuartigen Proteinfamilie erwarten.

In einem ersten Schritt sollten Komplementationsmutanten erstellt werden, um die Relevanz der Gendeletionen im Hinblick auf den Defekt der Genexpression von Untereinheiten von Komplex I zu verifizieren.

Des Weiteren sollten Analysen zur Struktur und Funktion der Proteine durchgeführt werden. Dazu sollten die Proteine heterolog als Fusionsproteine mit Hexahistidin-*tag* in *E. coli* in ausreichenden Mengen exprimiert und über chromatographische Methoden homogen isoliert werden. Informationen über die Stabilität und den Oligomerisierungszustand der Proteine sollten mittels Größenausschlusschromatographie in Kombination mit statischer Lichtstreuung gewonnen werden. Die Ermittlung der Proteinstruktur durch Röntgenbeugungsanalyse setzte als essentielles Zwischenziel die Kristallisation der Proteine voraus.

Final sollte der spezifische Einfluss der PPR-Proteine auf die Prozessierung der mitochondrialen RNA sowie die direkte Interaktion zwischen den Proteinen und den Transkripten für die Untereinheiten des Komplex I *in vitro* mittels Retardierungsanalysen untersucht werden, um die Bindestelle der PPR-Proteine aufzuklären.

3. Material und Methoden

3.1 Mikroorganismen

N. crassa Wildtyp SL 74-OR23-1A (FGSC 987)
FGSC 20112
FGSC 20449

E. coli XL-1 Blue® Stratagene
BL21 (DE3) Novagen
DH5α Invitrogen
SCS110 Agilent Technologies

3.2 Plasmide

N. crassa pMYX2 (Campbell *et al.* 1994)
E. coli pET-28b Novagen
pUC18-T7 Derivat des pUC18, enthält zusätzlich die Promotorsequenz des T7-Phagen und anschließende Stul Schnittstelle; Freundliche Gabe von Dr. Ümit Pul

3.3 Oligonukleotide

Alle im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon bezogen und nach Herstellerangaben mit Wasser für mikrobiologische Zwecke auf eine Endkonzentration von 100 pmol/µl eingestellt. Die verwendeten Oligonukleotide sind in folgenden Tabellen 3.1 – 3.3 aufgeführt.

Tabelle 3.1: Allgemein verwendete Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
T7 Promotor	taatacgcactcactataggg
T7 Terminator	gctagttattgctcagcgg
qa-2l	agctcaatcgacggaccggc

Tabelle 3.2: Oligonukleotide für die Deletions-PCR

Name	Sequenz (5' → 3')
20b-SP-mt-for	ccgcggtacctctccttcttaaagtt
20b-oSP-rev	gtcgatatgacactgctg
20b-omt-rev	atcgcatatgtatcgggcaaa
Kan-for	cactgccagcgcatacaaaa
Kan-rev	ttcctgcgccggttgcatcggatt
omt-His-rev	ggatatctccttcttaaagttaaacaaaa
omt95His-forNeu	atgcatgctgctgctcatccgt

Die Abkürzungen for (*forward*) und rev (*reverse*) beziehen sich jeweils auf die Orientierung des Zielgens von 5' → 3'

Tabelle 3.3: Oligonukleotide zur Erzeugung von DNA Vorlagen für die *In-vitro*-Transkription von RNA

Name	Sequenz (5' → 3')
A-for	acgactcactatagggggtcgattcttcatctcgatcttc
A-rev	cctgtggatccaaggcctgcatcagcaaatgcttgcaaaagtcc
B-for	acgactcactataggaagattgggtccgaatgccgtaggtt
B-rev	cctgtggatccaaggccttgggctgcacttcttaatgacccta
C-for	acgactcactataggtagggtcattaagaagtgcagccca
C-rev	cctgtggatccaaggccttgcctagcctcaaaggagttccag
D-for	acgactcactataggtgctggaaactccttgaggc
D-rev	cctgtggatccaaggcctaaaatccttggcacttccga
E-for	acgactcactataggtcggaagtccaaggatgtt
E-rev	cctgtggatccaaggcctcctagtgccttctcagtatgagtttacc
G-for	acgactcactataggtcctatgtttgtaaaactcactactg
G-rev	cctgtggatccaaggcctactaccatactcggctaaga

H-for	acgactcactataggtcttagccgagtatgtagt
H-rev	cctgtggatccaaggcctagaacgccattaccctca
I-for	acgactcactataggggagagcatctttccctagaatagc
I-rev	cctgtggatccaaggcctcttcaacatacaagaatttgctcctctg
K-for	acgactcactataggaaagtgggtataacagaaggagcaa
K-rev	cctgtggatccaaggcctctactttaggggcagtttcg
L-for	acgactcactataggcgaaactgccctaaagtagttgc
L-rev	cctgtggatccaaggccttaccgggtttggctcttt
M-for	acgactcactataggatccttaagtgtaaaagagccaaacaccg
M-rev	cctgtggatccaaggcctatctcctggcaccttactcgatt
O-for	acgactcactataggaaatcgagtgaagggtccaggaga
O-rev	cctgtggatccaaggcctacctaaccagatattgtaatgtagttccc
P-for	acgactcactataggggaaactacattacaatatctggttagg
P-rev	cctgtggatccaaggcctaccgcatccaagagtagataactaacg
R-for	acgactcactataggcgtagtatctactcttgatgcgg
R-rev	cctgtggatccaaggcctaggatcccaatacgttcacat
S-for	acgactcactataggtaataggctgccggttagccggtatga
S-rev	cctgtggatccaaggcctccacctaaggtgattctacgtgagc
T-for	acgactcactataggggtattgaaagctcacgtagaatcacct
T-rev	cctgtggatccaaggcctaaagcggggctgtaaagcca
U-for	acgactcactataggtggctttacaagccccgctta
U-rev	cctgtggatccaaggcctgaaaagcttctccaaaagctaccct
X-for	acgactcactataggaccctattaggtctgctggctagtt
X-rev	cctgtggatccaaggcctcatgaatgcttccactcgctacc

Die Abkürzungen for (*forward*) und rev (*reverse*) beziehen sich jeweils auf die Orientierung des Zielgens von 5' → 3'

3.4 Medien und Lösungen

Spurenelementlösung (Davis et al., 1970)	50 g/l Zitronensäure 50 g/l $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,5 g/l $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l H_3BO_3 10 g/l $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,5 g/l MnSO_4
50 x Vogelsmedium (Vogel 1956)	150 g/l Natriumcitrat 250 g/l KH_2PO_4 100 g/l NH_4NO_3 10 g/l $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5 g/l $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5 ml/l Spurenelementlösung 0,25 mg/l Biotin
Kultivierungsagar (Schrägagarröhrchen)	1,6 % Agar 2 % Saccharose 1 x Vogelsmedium 0,1 % Chinasäure (pH 6,8) (optional) 0,5 µg/ml Benomyl (optional)
Agarböden	1 x Vogelsmedium 1 % Glycerin 1 % Saccharose 0,25 % Hefeextrakt 0,1 % Caseinhydrolysat 0,1 % Chinasäure (pH 6,8) (optional) 0,5 µg/ml Benomyl (optional)
Flüssigmedium	15 g/l Saccharose 1 x Vogelsmedium 0,1 % Chinasäure (pH 6,8) (optional)

Elektroporationslösung	1 M Sorbitol 1 % Polyethylenglykol 3350
Regenerationslösung	1 x Vogelsmedium 2 % Saccharose 1 M Sorbitol
Sorboseagar	1 x Vogelsmedium 1 M Sorbitol 2 % Saccharose 2 % Sorbose 0,5 µg/ml Benomyl (optional) 2 % Agar
Topagarose	1 x Vogelsmedium 1 M Sorbitol 2 % Saccharose 2 % Sorbose 0,7 % <i>Low Melting</i> Agarose
Isolationspuffer	50 mM Tris/Acetat (pH 7,0) 15 % Saccharose (optional) 0,2 mM Phenylmethylsulfonylfluorid
LB-Medium	10 g/l Trypton/Pepton aus Casein 5 g/l Hefeextrakt 5 g/l NaCl 16 g/l Agar (optional für Agarplatten) 100 mg/l Ampicillin oder 30 mg/l Kanamycin
50 x TAE-Puffer	2 M Tris/Acetat (pH 7,5) 50 mM EDTA

6 x DNA-Probenpuffer	6 x TAE Puffer 0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol FF 60 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8) 1 mM EDTA
10 x TB-Puffer	108 g/l Tris 55 g/l Borsäure
YT-Medium (2x)	16 g/l Bacto Trypton 10 g/l Bacto Hefeextrakt 5 g/l NaCl
RF1-Puffer (Hanahan 1983)	100 mM Rubidiumchlorid 50 mM Manganchlorid 30 mM Kaliumacetat pH 5,8 10 mM Calciumchlorid 15 % (w/v) Glycerin
RF2-Puffer (Hanahan 1983)	10 mM MOPS 10 mM Rubidiumchlorid 75 mM Calciumchlorid 15 % (w/v) Glycerin
5 x Ribomax-Puffer	400 mM HEPES-KOH pH 7,5 120 mM MgCl ₂ 10 mM Spermidin 200 mM DTT (Dithiothreitol)

5 % Harnstoff-Gel	7 M Harnstoff 5 % Acrylamid/Bisacrylamid (19:1) 1 x TAE 500 µl/l TEMED 5 ml/l APS (10 %)
Fixierlösung I (Beidler <i>et al.</i> 1982)	10 % Ethanol 0,5 % Essigsäure
Silbernitratlösung (Beidler <i>et al.</i> 1982)	0,19 % Silbernitrat
Entwicklerlösung (Beidler <i>et al.</i> 1982)	15 g/l NaOH 0,08 g/l Natriumborhydrid 4 ml/l Formaldehyd
Fixierlösung II (Beidler <i>et al.</i> 1982)	0,75 % Natriumcarbonat
Formamid-Probenpuffer (2x)	0,025 % (w/v) Bromphenolblau 0,025 % (w/v) Xylencyanol 25 mM EDTA pH 8 95 % (v/v) Formamid, deionisiert
LBSB-Medium (Oganesyan <i>et al.</i> 2007)	10 g/l Trypton/Pepton aus Casein 5 g Hefeextrakt 5 g NaCl 0,114 g/l Betain 91,1 g Sorbitol

LBNB-Medium (Oganesyan <i>et al.</i> 2007)	10 g/l Trypton/Pepton aus Casein 5 g/l Hefeextrakt 30 g/l NaCl 0,114 g/l Betain 2 g/l Glucose
LBN-Medium (Oganesyan <i>et al.</i> 2007)	10 g/l Trypton/Pepton aus Casein 5 g/l Hefeextrakt 30 g/l NaCl
Resuspensionspuffer für Arbeiten mit ncu07684	10 mM Tris/HCl (pH 8) 300 mM NaCl
Equilibrierungspuffer für Arbeiten mit ncu07684	50 mM Glycin (pH 9) 1M NaCl
Elutionspuffer für Arbeiten mit ncu07684	50 mM Glycin (pH 9) 1M NaCl 250 mM Imidazol
Resuspensionspuffer für Arbeiten mit ncu06461	20 mM Tris/HCl (pH 7,9) 300 mM NaCl
Elutionspuffer für Arbeiten mit ncu06461	20 mM Tris/HCl (pH 7,9) 300 mM NaCl 250 mM Imidazol
Biuret-Reagenz	5 g/l Kaliumtartrat 3 g/l Kupfersulfat • 5 H ₂ O 5 g/l Kaliumiodid 8 g/l NaOH
10 x <i>Native PAGE</i> [™] Laufpuffer	500 mM BisTris 500 mM Tricine

4 x Native PAGE™ Probenpuffer	200 mM BisTris 24 M HCl 200 mM NaCl 40 % w/v Glycerin 0.004 % Ponceau S
20 x Native PAGE™ Kathodenpuffer	0,4 % Coomassie. G-250
Solubilisierungspuffer (Marques <i>et al.</i> 2007)	50 mM NaCl 50 mM Imidazol/HCl (pH7,0) 10 % (w/v) Glycerin 5 mM 6-Amino-Caprone
Komplex-I-Färbelösung (Krause <i>et al.</i> 2004a)	100 mM Tris/HCl (pH 7,4) 768 mM Glycin 0,04 % (w/v) 4-Nitroblau- Tetrazoliumchlorid 0,1 mM NADH
Trenngelpuffer	1,5 M Tris/HCl (pH 8,8) 4 g/l SDS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris/HCl (pH 6,8) 4 g/l SDS
5 x SDS-Probenpuffer	225 mM Tris/HCl (pH 6,8) 250 mM DTT 0,025 % Bromphenolblau 5 % SDS 50 % Glycerin
10 x Laufpuffer	250 mM Tris/HCl, pH 8,3 10 g/l SDS 1,9 M Glycin

Coomassie-Färbelösung	0,25 % (w/v) Coomassie R-250 10 % Essigsäure 40 % (v/v) Methanol
Coomassie-Entfärbelösung	10 % Essigsäure 40 % (v/v) Methanol
Blotpuffer	20 % (v/v) Methanol in 1 x Laufpuffer
TBS-Puffer	20 mM Tris/HCl (pH 8,0) 250 mM NaCl
TBS-T-Puffer	20 mM Tris/HCl (pH 8,0) 250 mM NaCl 0,1 % (v/v) Tween 20
Block-Lösung	5 % (w/v) Milchpulver in TBS-T 0,05 % (w/v) NaN ₃

3.5 Methoden für *Neurospora crassa*

3.5.1 Kultivierung von *N. crassa*

Die Kultivierung von *N. crassa* erfolgte ausgehend von benomyl- oder hygromycinhaltigen Schrägagarröhrchen. Über einen sterilen Zahnstocher wurden die Hyphen der entsprechenden Stämme auf das frische Medium überführt und für mehrere Tage bei 28°C unter konstantem Lichteinfluss inkubiert. Größere Mengen wurden auf Agarböden in 300 ml Weithalskolben gewonnen, welche für zwei Tage bei 25°C ohne Lichzufuhr und anschließend bei 28°C im Licht kultiviert wurden. Das Animpfen von Agarböden oder Flüssigkulturen erfolgte mittels wässriger Konidien suspensionen, welche durch Zugabe von sterilem Wasser zu den Schrägagarröhrchen bzw. Agarböden und starkes Schütteln gewonnen wurden. Die Anzucht von Flüssigkulturen erfolgte

in 100 ml Flüssigmedium im 300 ml Weithalskolben unter Schütteln bei 180 UpM (Umdrehungen pro Minute) für zwei bis drei Tage bei 28°C. Die Hyphen wurden durch Filtration geerntet und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

3.5.2 Transformation von *N. crassa*

Die Transformation der Deletionsmutanten erfolgte unter sterilen Bedingungen ausgehend von jeweils drei Agarböden, welche mit insgesamt 20 ml einer 1 M Sorbitlösung und starkem Schütteln geerntet wurden. Die somit hergestellte Konidiensuspension wurde anschließend zur weiteren Verarbeitung durch Glaswolle filtriert und in 40 ml Zentrifugenröhrchen bei 4000 UpM für 5 min (Megafuge 1.0R Heraeus) zentrifugiert. Das Sediment wurde erneut in etwas 1 M Sorbitlösung resuspendiert. Mittels Neubauer Zählkammer wurde die Zellkonzentration bestimmt und auf $6 \cdot 10^8$ Zellen pro ml eingestellt. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei 28°C und leichtem Schütteln mit 20 mg/ml *Lysing Enzyme*. Die Makrokonidien wurden für 5 min bei 3000 UpM sedimentiert (Eppendorf 5417 R) und zweimal mit 1 ml der 1 M Sorbitlösung gewaschen. Das Konidensediment wurde in 500 µl Elektroporationslösung aufgenommen, erneut gezählt und auf eine Konzentration von $2 \cdot 10^8$ Zellen pro ml eingestellt. Anschließend erfolgte die Inkubation von 400 µl der Konidiensuspension mit 4 µg der entsprechenden linearisierten DNA für 20 min auf Eis. Die Elektroporation erfolgte im Multiporator bei 750 V und 250 µs in drei Wiederholungen. Direkt im Anschluss wurden die Zellen mit 1 ml Regenerationslösung versetzt und für 10 bis 20 min auf Eis gestellt. Die Regeneration der Konidien erfolgte bei 28°C für eine Stunde und leichtem Schütteln. Der Transformationsansatz wurde mit ca. 10 ml handwarmer Topagarose versetzt und homogen auf Sorboseagar verteilt. Nach vier- bis zehntägiger Inkubation bei 28°C konnten die ersten sichtbaren Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher abgenommen und auf Schrägagarröhrchen mit Benomyl übertragen werden.

3.5.3 Mitochondrienisolierung aus *N. crassa*

Ungefähr 2 bis 4 g Hyphen aus der 100 ml Flüssigkultur wurden mittels Mörser und Pistill in 40 ml eiskaltem Isolationspuffer homogen zerkleinert. Der Aufschluss der Zellen erfolgte anschließend mittels Glasperlen in einer Duranglasflasche im Zellhomogenisator (Braun, Melsungen) durch starkes Schütteln für 12 s. Hyphenreste und nicht aufgeschlossene Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 7000 UpM und 4°C in einem SS-34 Rotor sedimentiert. Die Mitochondrien wurden anschließend durch Zentrifugation des Überstands bei 18000 UpM für 20 min gewonnen, in 200 µl zuckerfreiem Isolationspuffer resuspendiert und bei -20°C gelagert.

3.6 Methoden für *Escherichia coli*

3.6.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte auf Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium. Dazu wurden kleine Mengen einer Bakteriensuspension aus Glycerinkulturen mithilfe einer sterilen Impföse entnommen und mittels Vereinzelausstrichs auf Agarplatten übertragen. Nach Inkubation über Nacht im Brutschrank bei 37°C wurden einzelne Kolonien mit einem sterilen Zahnstocher aufgenommen und in 4 ml LB-Medium überführt. Die Kultivierung erfolgte über Nacht bei 37°C unter Schütteln bei 180 UpM. Zur Kultivierung im größeren Maßstab wurden Flüssigmedien mit einer Übernachtskultur im Verhältnis 1/1000 beimpft und bei 37°C und 180 UpM geschüttelt. Zur langfristigen Erhaltung wurden die Bakteriensuspensionen mit 40 % Glycerin bei -70°C gelagert.

3.6.2 Herstellung kompetenter Zellen nach Hanahan (1983)

Die Herstellung chemisch kompetenter Zellen erfolgte nach der Rubidiumchlorid-Methode (Hanahan 1983). Dazu wurde eine einzelne Kolonie

über Nacht in 20 ml 2 x YT-Medium bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden zwei 2l Schikanekolben mit 2,5 ml der Übernachtskultur angeimpft und bis zum Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,5 geschüttelt. Die Bakterien wurden anschließend in eiskalte, sterile Zentrifugenbecher überführt und mittels zehnmütiger Zentrifugation bei 5000 UpM bei 4°C im Rotor JA-10 gewonnen. Die Sedimente wurden in 83 ml RF1 resuspendiert, für eine Stunde auf Eis inkubiert und erneut für 10 min zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 20 ml RF2 resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden anschließend in Aliquots von 100 μ l mit flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

3.6.3 Transformation kompetenter Zellen von *E. coli*

Zur Transformation von *E. coli* wurden chemisch kompetente Zellen auf Eis aufgetaut, mit 1-50 ng der entsprechenden Plasmid-DNA vermengt und für 30 min aus Eis inkubiert. Es folgte ein Hitzeschock für 20 s bei 42°C und eine zweiminütige Inkubation der Zellen auf Eis. Anschließend wurden die Zellen mit 900 μ l LB-Medium versetzt und für eine Stunde bei 37°C und leichtem Schütteln inkubiert. Im Falle der Transformation mit superspiralierter DNA wurden ca. 20 μ l des Transformationsansatzes auf Agarplatten ausplattiert. Bei geringerer Transformationseffizienz mit DNA aus Ligationsansätzen oder aus Ansätzen der *In-Fusion* Klonierung wurden die transformierten Zellen für 2 min bei 14.000 UpM (Eppendorf 5417 R) zentrifugiert, in ca. 20 μ l LB-Medium resuspendiert und vollständig auf Agarplatten ausplattiert.

3.7 Präparationen von Nukleinsäuren

Die Präparation von DNA sowie RNA erfolgte mittels kommerziell erwerblicher Kits nach Herstellervorgaben. Die Aufreinigung von den Nukleinsäuren erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Zur Qualitätskontrolle und präparativen Aufreinigung wurden Agarose-Gelelektrophoresen durchgeführt. Bei der Arbeit

mit RNA wurde stets eine vorherige Inaktivierung von RNasen bei allen Materialien und Lösungen durchgeführt. Dazu wurden Glasflaschen und Lösungen mit 0,1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Inaktivierung von DEPC erfolgte durch Autoklavieren bei 20 psi für 20 min. Gebrauchsmaterialien wurden in 0,1 M NaOH und 1 mM EDTA behandelt und mit DEPC-Wasser nachgewaschen. Reaktionsansätze wurden in RNase-freien 1,5 ml Reaktionsgefäßen durchgeführt.

3.7.1 Agarose-Gelelektrophorese

Die analytische Auftrennung von Nukleinsäure-Fragmenten erfolgte mittels 1-2 %igen Agarosegelen in 1 x TAE Puffer. Zur präparativen Aufreinigung wurden 0,7 %ige hochreine *Low Melting* Agarosegele verwendet. Die Gellösung wurde nach dem Aufkochen handwarm abgekühlt und in einen flachen Gelschlitten gegossen. Die Proben wurden jeweils mit TAE-Probenpuffer (1x) versetzt. Als Größenstandard dienten der *GeneRuler 1kb DNA Ladder* bzw. *RiboRuler Low Range RNA Ladder* (beides Thermo Scientific). Die Elektrophorese erfolgte bei 80 bis 150 V in 1x TAE Puffer. Im Falle von RNA wurden dem Puffer 0,5 µg/ml Ethidiumbromid hinzugefügt. Die Visualisierung der DNA-Banden erfolgte durch 30 minütige Inkubation des Gels in Ethidiumbromid-Lösung (1µg/ml in 1 x TAE). Zur Analyse der Banden wurde das *Bio Imaging System ChemiGenius2* (Syngene) verwendet. Für die präparative Aufreinigung wurden die entsprechenden Banden aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion oder kommerziell erwerblicher Kits von der Agarose getrennt.

3.7.2 Phenol-Chloroform-Extraktion

Zur Extraktion von Nukleinsäuren aus Agarosegelen bzw. zur Trennung von Nukleinsäuren und Proteinen aus Reaktionsansätzen wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Dazu wurden die Ansätze mit dem gleichen

Volumen TE-Puffer gesättigter Roti®-Phenol-Lösung (Roth) versetzt, auf dem Vortex vermischt und für 5 min bei 14.000 UpM zentrifugiert (Eppendorf 5417 R). Ausgeschnittene Gelstücke wurden zuvor bei 65°C geschmolzen und mit TE-Puffer auf eine Agarosekonzentration von 0,5 % verdünnt. Die obere, wässrige Phase, welche die Nukleinsäuren enthält, wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur Entfernung von Nukleinsäuren aus der Interphase bei Geextraktionen wurde die organische Phase mit dem gleichen Volumen TE-Puffer versetzt, erneut vermischt und zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Extraktionsschritte aus der wässrigen Phase mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Lösung (Roti®-P/C/I, Roth) sowie Chloroform-Isoamylalkohol (im Verhältnis 24:1). Die zuletzt erhaltene wässrige Phase wurde direkt weiter verarbeitet oder mittels Ethanolfällung präzipitiert.

3.7.3 Ethanolfällung von Nukleinsäuren

Zur Konzentrierung von Nukleinsäuren wurde eine Ethanolfällung durchgeführt. Dazu wurde die Nukleinsäurelösung mit 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung, pH 5,5 vermischt und mit dem 2,5 bis 3fachen Volumen Ethanol (*abs.*) versetzt. Die Fällung erfolgte für 30 min bei -20°C oder bei geringen Nukleinsäurekonzentrationen bei -70°C über Nacht. Nach der Fällung wurde die Probe für 30 min bei 14.000 UpM und 4°C sedimentiert (Eppendorf 5417 R). Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Sediment mit 80 % Ethanol gewaschen. Das luftgetrocknete Sediment wurde anschließend im gewünschten Puffer und Volumen aufgenommen.

3.7.4 Präparation von DNA

Die Isolierung von Plasmid-DNA erfolgte mittels *NucleoBond®* Plasmidisolierungskits nach Herstellervorgaben (Macherey-Nagel). Die Klonierung von Vektoren für die Genexpression erfolgte über inverse PCR und anschließende Ligation, während die Fragmente für die Transkription von RNA

mittels *In-Fusion* Klonierung erstellt wurden. Zur Restriktionsspaltung wurden die Plasmide gemäß Herstellerangaben mit den entsprechenden Puffern versetzt und inkubiert (NEB). Die Verifizierung der Plasmidsequenz erfolgte mittels Sequenzierung durch die Firma GATC Biotech.

3.7.4.1 Klonierung von Vektoren für die Genexpression von ncu06461 und ncu07684 ohne mitochondriale Präsequenz

Die Klonierung der Vektoren für die Genexpression von ncu06461 und ncu07684 ohne mitochondriale Präsequenz erfolgte ausgehend von pET28b-Konstrukten, welche in vorangegangenen Arbeiten erstellt und untersucht wurden. Zur Verkürzung der Fragmente wurde eine inverse Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt, bei der das gesamte Plasmid mit Ausnahme der Sequenzen, die für die Präsequenz kodieren, amplifiziert wurde. Für die Klonierung des Vektors für die Genexpression von ncu06461 ohne mitochondriale Präsequenz wurden zur Reduzierung der Größe der amplifizierten Fragmente zwei zusätzliche Primer verwendet. Diese binden in dem Gen, welche Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Kanamycin verleiht. Die erfolgreiche Ligation wurde durch die Selektion auf kanamycinhaltigen Agarplatten überprüft. Die Klonierungsstrategien sind schematisch in Abbildungen 3.1 und 3.2 dargestellt.

Die Primer für die Verkürzung des Gens ncu07684 wurden so hergestellt, dass nach der Deletion ein Startcodon sowie eine KpnI-Schnittstelle am 5'-Terminus des Gens vorlag. Die KpnI-Schnittstelle ermöglicht mit der bereits vorhandenen NotI-Schnittstelle am C-Terminus des Gens die Überführung in den Pichia-Expressionsvektor pPICZ. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.2 angegeben. Da die anschließende Ligation des PCR-Produkts zum zirkulären Vektor die Phosphorylierung der 5'-Termini voraussetzt, wurden die Primer vor der PCR mittels T4 Polynukleotidkinase (NEB) nach Herstellervorgaben phosphoryliert.

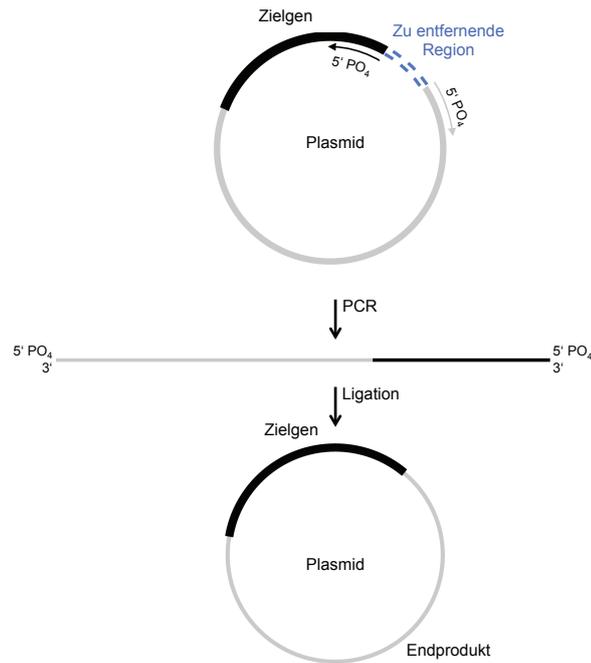


Abbildung 3.1 Klonierungsstrategie von $\Delta 21\text{-ncu07684-His}$ sowie $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$

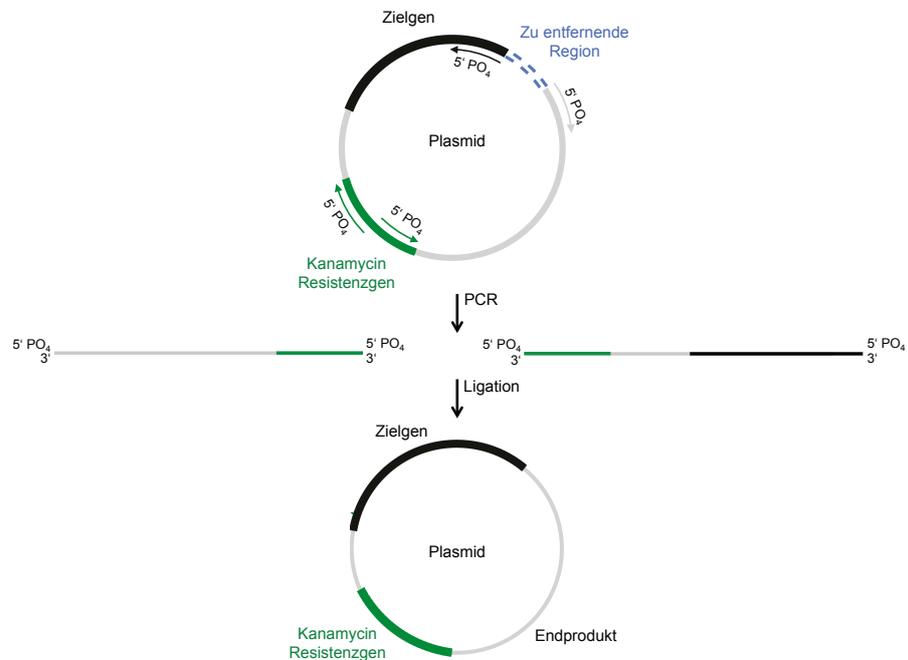


Abbildung 3.2 Klonierungsstrategie von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$

Dazu wurden 3 μl der Primer in einem Reaktionsansatz mit 5 μl

Reaktionspuffer, 1 µl des Enzyms sowie zusätzlich 1 mM ATP vereint und auf 50 µl mit Wasser aufgefüllt. Nach Inkubation bei 37°C erfolgte eine 20 minütige Hitzeinaktivierung der Kinase bei 65°C. Die PCR erfolgte mit 40 ng der Ausgangsvektoren und 8 µl der phosphorylierten Primer in einem 50 µl Reaktionsansatz nach Herstellervorgaben der *Phusion™ High Fidelity* DNA Polymerase (Finnzymes). Die Amplifikation erfolgte nach folgendem Programm, wobei die Schritte zwei bis vier in insgesamt 30 Zyklen durchgeführt wurden:

1	98°C	30 s	
2	98°C	10 s	Denaturierung
3	52°C	20 s	<i>Annealing</i>
4	72°C	2 min	Elongation
5	72°C	7 min	
6	4°C	∞	

Nach erfolgreicher Verifizierung der PCR-Produkte in entsprechender Größe durch Agarose-Gelelektrophorese folgte eine Aufreinigung der Fragmente mittels *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben.

Die anschließende Ligation der PCR-Produkte erfolgte mittels T4 DNA Ligase nach Herstellerangaben (NEB) mit 50 ng der DNA in einem 20 µl Reaktionsansatz. Zusätzlich wurde 1 mM ATP hinzugefügt. Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 16°C und eine zehnmünütige Hitzeinaktivierung der Ligase bei 65°C. Zur Entfernung der Ligase, welche die anschließende Transformation beeinträchtigen könnte, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt. Es wurden jeweils 1, 5 und 10 µl des Reaktionsansatzes für die Transformation von *XL-1 Blue®* kompetenten Zellen verwendet. Die Klonierung des Vektors zur Expression von *ncu06461* ohne mitochondriale Präsequenz erfolgte analog und in Zusammenarbeit mit Nguyen (2013).

3.7.4.2 Klonierung von DNA-Vorlagen für die RNA Transkription

Die *in-vitro*-Transkription von RNA erfolgte ausgehend von einem Derivat des pUC18, welcher zusätzlich über die Promotorsequenz des T7-Phagen und eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *Stu*I verfügt. Die entsprechenden DNA-Fragmente wurden über die *Stu*I-Schnittstelle hinter die Promotorregion so eingefügt, dass das Plasmid anschließend unmittelbar hinter dem DNA-Fragment mit dem Restriktionsenzym linearisiert werden konnte.

Die Klonierung von DNA-Vorlagen für die RNA-Transkription erfolgte mittels *In-Fusion HD® Cloning Kit* (Clontech) nach Herstellerangaben. Dieses realisiert die direkte Integration von PCR Fragmenten in den Vektor durch überlappende Sequenzen aus 15 bp. Dazu wurden die entsprechenden DNA-Bereiche mittels PCR aus mitochondrialer DNA amplifiziert. Über die Primer wurden die zum Plasmid überlappenden 15 bp an die PCR-Fragmente angehängt. Die PCR erfolgte mit 250 ng mitochondrialer DNA und 10 pmol der entsprechenden Primer in einem 20 µl Reaktionsansatz nach Herstellervorgaben der *Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase* (Finnzymes) nach folgendem Programm, wobei die Schritte zwei bis vier in insgesamt 30 Zyklen durchgeführt wurden:

1	98°C	2 min	
2	98°C	10 s	Denaturierung
3	56-72 °C	30 s	<i>Annealing</i>
4	72°C	15 s	Elongation
5	72°C	7 min	
6	4°C	∞	

Für den *Annealing*-Vorgang wurde ein Temperaturgradient von 56 bis 72°C durchgeführt. Die jeweiligen *Annealing*-Temperaturen wurden mittels *NEB Tm Calculator*¹ bestimmt. Die Aufreinigung der PCR-Fragmente und die Entfernung von Primern aus dem Reaktionsansatz, welche die anschließende *In-Fusion* Klonierung beeinträchtigen, wurde mittels Gelextraktion realisiert. Die

¹ <http://tmcalculator.neb.com/#/>

² RC = *Reliability Class* reicht von 1 bis 5 mit 1 als sicherster Vorhersage

Gelextraktion erfolgte mittels *QIAquick Gel extraction Kit* nach Herstellerangaben (Qiagen). Die *In-Fusion* Klonierung wurde mit 50 ng des mittels *StuI* linearisierten Plasmids in einem molaren Verhältnis von Fragment zu Vektor von 2:1 in einem 5 µl Reaktionsansatz durchgeführt. Nach Inkubation bei 50°C für 5 min wurden *DH5αTM* kompetente Zellen mit dem Reaktionsansatz transformiert.

Für die Transkription von RNA wurden die Plasmide aus SCS110 Zellen isoliert. Diese ermöglichen die Präparation von nicht-methylierter DNA, welche die anschließende Linearisierung mittels methylierungs-sensitiver *StuI* Restriktionsendonuklease realisiert (Agilent Technologies, SCS110 Kompetente Zellen Spezifikation; NEB, *StuI* Spezifikation). Die Linearisierung von 50 µg DNA erfolgte mit 1 µl des Restriktionsenzym im entsprechenden Puffer über Nacht bei 37°C. Zur Entfernung des Restriktionsenzym sowie von RNasen, welche bei der Plasmidisolierung eingesetzt werden, wurde eine Phenol-Chloroform-Extraktion durchgeführt.

3.7.5 Präparation von RNA

Die Herstellung von RNA erfolgte mittels *in-vitro*-Transkription. Zur Analyse der Fragmente wurde eine denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung der Nukleinsäuren durchgeführt. Die Markierung von RNA für anschließende Retardierungsanalysen erfolgte durch eine 3'-Endmarkierung mittels radioaktivem 5'-32[P]pCp.

3.7.5.1 *In-vitro*-Transkription

Die *in-vitro*-Transkription der gewünschten RNA Fragmente erfolgte nach dem *RiboMAXTM* System von Promega. Als Vorlage dienten die mittels *StuI* linearisierten pUC18-T7-Fragmente. Die T7 Polymerase bindet spezifisch an die Promotorregion und initiiert die Transkription. Die Termination erfolgt durch das 5'-Ende des linearisierten Vektors (Arnaud-Barbe *et al.* 1998).

In einem 30 µl Reaktionsansatz wurden 4 µg der DNA mit 0,15 u anorganischer Pyrophosphatase, 30 u RNase Inhibitor, 200 mM DTT, jeweils 80 µmol NTPs und 20 u der RNA Polymerase in 1 x Ribopuffer versetzt und für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 1 x TAE-Probenpuffer wurde die Reaktion beendet. Anschließend wurde die RNA von der DNA und den NTPs mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aus dem Agarosegel separiert. Nach Ethanolfällung wurde das Sediment im entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen.

3.7.5.2 Denaturierende Polyacrylamid-gelelektrophorese mit anschließender Silberfärbung nach Beidler *et al.* (1982)

Die strukturunabhängige Analyse von RNA-Fragmenten erfolgte in einem 5 %igen Harnstoff-Gel mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese (dPAGE). Die Elektrophorese wurde bei ca. 50°C durchgeführt, um die dauerhafte Denaturierung der RNA zu realisieren. Für die gleichmäßige Wärmeverteilung wurde eine Metallplatte vor die Gelplatten gespannt. Es folgte zuerst eine Präelektrophorese für 10 min bei 10 Watt, 10 min bei 25 Watt und 10 min bei 40 Watt. Die Proben wurden währenddessen 1:1 mit Formamid-Probenpuffer versetzt, für 3 min bei 90°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer bei einer Leistung von 40 Watt.

Nach beendeter Elektrophorese erfolgte die Silberfärbung der Nukleinsäuren nach Beidler *et al.* (1982) Dazu wurde das Gel für 5 min in Fixierlösung I und anschließend für 10 min in Silbernitratlösung geschwenkt. Es folgten drei Waschschriffe für jeweils 1 min in Wasser. Anschließend wurde das Gel bis zur Sichtbarkeit der Banden in frischer Entwicklerlösung geschwenkt. Die Intensivierung der Bandenfärbung sowie die Beendigung der Reaktion erfolgte durch 5-10 minütiges Schwenken in Fixierlösung II.

3.7.5.3 3' Endmarkierung von RNA mit 5'-32[P]pCp

Die radioaktive Endmarkierung von RNA erfolgte durch Addition eines 5'-32P markierten Cytidin 3',5'-bisphosphats an den 3'-Terminus der RNA (Bruce und Uhlenbeck 1978). Die Markierung von 1 µg RNA erfolgte in einem 30 µl Reaktionsansatz nach Herstellerangaben der T4 RNA Ligase (NEB) über Nacht bei 4°C. Nach der Inkubation wurden 1 µl Glycogen (RNA *grade*, Thermo Scientific) hinzugefügt und die RNA wie in Kapitel 3.7.3 beschrieben gefällt. Die Analyse der Markierungseffizienz erfolgte durch Messung der Radioaktivität in Sediment und Überstand mittels eines Kontaminationsmonitors (Berthold LB 122).

3.8 Proteinbiochemische Methoden

3.8.1 Genexpression

Die heterologe Genexpression von den Genen *ncu07684* sowie *ncu06461* jeweils in modifizierter Form erfolgte in BL21 (DE3) Zellen im Expressionsvektor pET28b unter Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock (Chen *et al.* 2002; Oganessian *et al.* 2007).

3.8.1.1 Genexpression von $\Delta 65$ -*ncu07684*-10xHis

Für die Expression von $\Delta 65$ -*ncu07684*-10xHis wurden sechs Vorkulturen à 25 ml LBN-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin in 100 ml Erlenmeyerkolben bei 37°C und 180 UpM über Nacht geschüttelt. Es wurden sechs 5l Schikanekolben mit jeweils zwei Litern LBNB-Medium mit 30 µg/ml Kanamycin mit den Übernachtskulturen angeimpft und bei 37°C bis zu Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,9 bei 180 UpM geschüttelt. Es folgte ein Hitzeschock bei 47°C für eine Stunde. Nach Induktion mit 0,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) wurden die Kolben für weitere 30 min bei 47°C geschüttelt und anschließend auf 37°C

auf Eis abgekühlt. Die Expression erfolgte anschließend bei 37°C für 2,5 Stunden. Zur Gewinnung der Bakterien wurden die Expressionskulturen für 20 min bei 6000 UpM im Rotor SLC-6000 zentrifugiert. Das Sediment wurde in Resuspensionspuffer gewaschen, auf drei sterile 50 ml Zentrifugenröhren (Sarstedt) aufgeteilt und bei -70°C bis zur weiteren Verarbeitung gelagert.

3.8.1.2 Genexpression von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$

Für die Expression von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ wurden sechs Vorkulturen aus 50 ml LB-Medium mit 30 $\mu\text{g/ml}$ Kanamycin über Nacht bei 37°C und 180 UpM geschüttelt. Die sechs Hauptkulturen bestehend aus 2 Litern LBSB-Medium in 5l Schikanekolben wurden mit den Vorkulturen auf eine OD_{600} von 0,05 angeimpft und bei 42°C bis zu Erreichen einer OD_{600} von 0,4 bei 42°C und 180 UpM kultiviert. Die Expression erfolgte nach Induktion mit 1 mM IPTG für 4 Stunden bei 25°C. Die Gewinnung und Lagerung der Bakterien erfolgte analog zu der Genexpression von $\Delta 65\text{ncu-07684-10xHis}$. Die Aufteilung des Sediments erfolgte auf sechs sterile 50 ml Zentrifugenröhren (Sarstedt).

3.8.2 Proteinisolierung

Die Proteinisolierung von $\Delta 65\text{-ncu07684-10xHis}$ und $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ erfolgte in einem einstufigen Prozess mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC) an 5 ml *HiTrapTM Chelating HP* Säulen mittels *Äkta* Systemen (GE Life Sciences) bei 4°C. Die Dokumentation der Proteine erfolgte über die UV-Absorption bei 280 nm.

Die Zellen aus einer 50 ml Zentrifugenröhre wurden in 10 ml Resuspensionspuffer pro Gramm Bakterien resuspendiert und in Portionen von ca. 40 ml mittels Ultraschallwellen bei einer Leistung von 50 % für 5 min in drei Zyklen mit dem Makrotip aufgeschlossen (Bandelin Sonopuls HD 2200). Die Bakteriensuspensionen wurden dabei dauerhaft in 100 ml Bechergläsern auf Eis gekühlt. Zur Gewinnung der löslichen Proteine erfolgte eine

Ultrazentrifugation bei 125.000 x g für eine Stunde bei 4°C.

3.8.2.1 Proteinisolierung von $\Delta 65\text{-ncu07684-10xHis}$

Die Proteinisolierung von $\Delta 65\text{-ncu07684-10xHis}$ erfolgte an einer mit Kobalt-Ionen beladenen 5 ml *HiTrapTM Chelating HP* Säule. Der Probenauftrag erfolgte mit einer Geschwindigkeit von 2 ml/min in Gegenwart von 20 mM Imidazol zur Reduzierung von unspezifischen Wechselwirkungen von Fremdproteinen mit dem Säulenmaterial. Anschließend wurden ungebundene Proteine mittels Resuspensionspuffer in Gegenwart von 20 mM Imidazol aus der Säule herausgespült. Ein Waschschrift mit Resuspensionspuffer in Gegenwart von 50 mM Imidazol diente zur weiteren Entfernung von Fremdproteinen. Die Entfernung von möglich gebundenen Chaperonen erfolgte durch einen weiteren Waschschrift mit 10 mM Magnesiumchlorid und 1 mM ATP. Die Waschschrift wurden jeweils bis zum Erreichen der Basislinie durchgeführt. Nach dem Equilibrieren der Säule mit Equilibrierungspuffer (pH 9), erfolgte die Stufenelution des Proteins mit Elutionspuffer mit einer Imidazolkonzentration von 250 mM. Die Analyse der Proteine und des Reinheitsgrads erfolgte mittels SDS-PAGE.

3.8.2.2 Proteinisolierung von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$

Für die Proteinisolierung von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ wurde der flüssige Überstand nach der Ultrazentrifugation auf eine mit Nickel-Ionen beladene 5 ml *HiTrapTM Chelating HP* Säule in Gegenwart von 25 mM Imidazol (90 % Probe, 10 % des Elutionspuffers) mit einer Flussgeschwindigkeit von 2 ml/min aufgetragen. Ungebundene Proteine wurden mittels Resuspensionspuffers in Gegenwart von 25 mM Imidazol einem Volumen von 50 ml aus der Säule herausgespült. Die Elution erfolgte durch einen linearen Gradienten von 25 mM Imidazol auf 250 mM Imidazol innerhalb von 135 ml. Für nachfolgende Retardierungsanalysen wurde ein Puffertausch mittels PD10 Säule nach

Herstellervorgaben auf 100 mM Bicine pH 9, 50 mM NaCl und 0,2 M Xylitol durchgeführt. Die Analyse der Proteine und des Reinheitsgrads erfolgte mittels SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).

3.8.2.3 Optimierung der Puffer für chromatographische Methoden

Die Optimierung der Puffer für die chromatographische Proteinisolierung erfolgte durch Verdünnung von konzentrierten Proteinlösungen im Verhältnis von 1/10 in die zu testenden Pufferbedingungen oder durch Immobilisierung des Proteins an 1 ml *HiTrapTM Chelating HP* Säulen unter den gewohnten Bedingungen und direkter Elution mit den zu testenden Puffern. Dazu wurden Puffer mit pH-Werten von 4 bis 10, sowie Natriumchlorid-Konzentrationen von 50, 100, 300 und 500 mM verwendet. Die verwendeten Puffer sind in Tabelle 3.4 angegeben.

Tabelle 3.4 Verwendete Puffersysteme

pH-Wert	Puffer
4	100 mM Citrat
5	100 mM Acetat
6	100 mM MES
7	100 mM Phosphat
8	100 mM Tris oder HEPES
9	100 mM Bicine oder Glycin
10	100 mM CAPS

Neben den unterschiedlichen Puffersystemen wurden ebenfalls verschiedene Additive getestet, welche die Löslichkeit und die Stabilität von Proteinen fördern sollen. Dazu wurde in Zusammenarbeit mit der *Crystal and X-Ray Facility* der Heinrich-Heine Universität in einer Mikrotiterplatte ein Löslichkeits- und Stabilitäts-*Screening* (Hampton Research) durchgeführt. Das hoch konzentrierte Protein wurde dazu 1/1 mit den einzelnen Lösungen vermischt

und unter dem Mikroskop auf visuelle Präzipitationen untersucht. Additive, die klare Tropfen unter dem Mikroskop zeigten wurden als Zusätze in verschiedenen Puffersystemen detailliert untersucht. Die Stabilität der Proteine in den einzelnen Pufferbedingungen wurde durch die Anwesenheit von sichtbaren Präzipitaten, die Bestimmung der Konzentration sowie das Elutionsprofil in Größenausschlusschromatographien analysiert.

3.8.3 Proteinanalyse und –charakterisierung

3.8.3.1 Proteinbestimmung nach Biuret

Die Bestimmung des Proteingehalts von Mitochondrien erfolgte nach der Biuret-Methode. Dazu wurden jeweils zweifach 10 µl Aliquots von den Mitochondriensuspensionen sowie 0, 10, 20, 40, 60, 80 und 100 µl einer Rinderserumalbumin-Lösung (BSA) mit einer Konzentration von 10 mg/ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Es folgte eine Präzipitation mittels 6 %iger Trichloressigsäure-Lösung für 10 min bei 4°C. Nach Zentrifugation bei 14.000 UpM (Tischzentrifuge Eppendorf 5415 C) für 5 min wurden die Sedimente mit 1 ml Biuret-Reagenz versetzt und für mindestens 30 min geschüttelt. Nach erneuter fünfminütiger Zentrifugation wurde die Absorption der Überstände bei 546 nm vermessen. Zur Vermeidung von verfälschten Ergebnissen aufgrund von Trübung durch Membranlipide wurde die Lösung durch Zugabe von 10 bis 20 µl einer gesättigten Kaliumcyanidlösung entfärbt und erneut vermessen. Der Proteingehalt wurde durch die Differenz beider Messwerte auf Basis des Lambert-Beerschen Gesetzes bestimmt.

3.8.3.2 Blau Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Für die Blau Nativ Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) wurden 150 µg der aus *N. crassa* isolierten Mitochondrien abgenommen und mit Solubilisierungspuffer auf ein einheitliches Volumen aufgefüllt. Die

Solubilisierung der Proben erfolgte in 50 µl Solubilisierungspuffer mit 1 % n-Dodecyl-β-D-Maltosid (DDM) für 10 min auf Eis. Nach Zentrifugation bei 14.000 UpM (Tischzentrifuge Eppendorf 5417 R) für 5 min bei 4°C wurden 7,5 µl der Proben abgenommen und mit 3,5 µl 4 x *Native PAGE*[™] Probenpuffer sowie 0,5 µl 20 x *Native PAGE*[™] Kathodenpuffer versetzt. Es wurden jeweils 10 µl der Proben in die Taschen eines kontinuierlichen 4-16 %igen Bis-Tris-Gels eingefüllt. Zum Beladen der Proteine erfolgte eine Präelektrophorese für ca. eine Stunde bei 150 V und 4°C in 1 x *Native PAGE*[™] Laufpuffer mit 1 x *Native PAGE*[™] Kathodenpuffer. Nachdem die Lauffront des Gels zu einem Drittel in das Gel migriert war, wurde der Puffer auf 1 x *Native PAGE*[™] Laufpuffer mit 0,1 x *Native PAGE*[™] Kathodenpuffer gewechselt und die Elektrophorese bei 250 V fortgesetzt. Die spezifische Visualisierung der Banden erfolgte durch Schwenken des Gels in Komplex-I-Färbelösung.

3.8.3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteinlösungen wurden in einer diskontinuierlichen SDS-PAGE analysiert. Dabei bestand das SDS-Gel aus einem Sammelgel mit einem Acrylamidgehalt von 4,5 % und einem Trenngel aus 10 % Acrylamid jeweils mit einer Vernetzung von Acrylamid zu Bisacrylamid von 37,5:1. Die Gele wurden in einem Block von neun Gelen hergestellt. Die Komposition der Gele ist in Tabelle 3.5 angegeben.

Tabelle 3.5 Komposition für neun SDS-Polyacrylamid-Gele

	Sammelgel 4,5 %	Trenngel 10 %
Rotiphorese® Gel 30	5,25 ml	25 ml
Sammelgel-Puffer	5 ml	
Trenngel-Puffer		18,75 ml
Wasser	21 ml	31,25 ml
APS (10 %)	210 µl	300 µl
TEMED	70 µl	70 µl

Dazu wurde in einem ersten Schritt das Trenngel in die Gelkammer eingefüllt und mit ca. 300 µl Isopropanol pro Gel beschichtet. Nach dem Auspolymerisieren wurde das Isopropanol dekantiert, das Sammelgel eingefüllt und die einzelnen Gele mit den entsprechenden Teflon-Kämmen zur Erstellung der Geltaschen bestückt.

Die Proteinproben wurden mit SDS-Probenpuffer (1x) versetzt, bei 95°C für 5 min denaturiert und in die Taschen des Gels eingefüllt. Als Größenstandard dienten der *PageRuler Prestained Protein Ladder* sowie *PageRuler Unstained Protein Ladder* (beides Thermo Scientific). Die Elektrophorese erfolgte in 1 x Laufpuffer bei 80-150 V. Zur Visualisierung der Banden wurden die Gele anschließend in Coomassie-Färbelösung für eine Stunde geschwenkt. Überschüssige Färbelösung wurde durch mehrfaches Schwenken in Coomassie-Entfärbelösung entfernt.

3.8.3.4 Western Blot-Analyse

Zur Detektion von Proteinen, welche einen His-*tag* enthalten, wurde eine Immundetektion mittels Western Blot-Analyse durchgeführt. Dazu wurden die Proteine, welche mittels SDS-PAGE aufgetrennt wurden, in einem *Semidry-Blot*-Verfahren auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran für eine Stunde bei 0,1 A pro Gel und maximal 25 V übertragen. Zur Hintergrundabdeckung wurde die Membran für eine Stunde in Blocklösung geschwenkt. Es folgten zwei fünfminütige Waschschrte mit TBS-T und ein Waschschrte mit TBS. Die Membran wurde für eine Stunde im primären Antikörper (Penta His, Qiagen) in einer 1:1000 Verdünnung in TBS-Puffer, 3 % BSA und 0,05 % Natriumazid geschwenkt und nach dem analogen Procedere gewaschen. Nach einstündiger Inkubation der Membran mit dem sekundären Meerrettichperoxidase-konjugierten Antikörper (α -Maus-Meerrettichperoxidase) in einer 1:20.000 Verdünnung in TBS mit 10 % Milchpulver erfolgten die letzten analogen Waschschrte. Die Visualisierung der Proteine mit His-*tag* erfolgte über Detektion der Chemilumineszenz mittels kommerziell erwerblicher Kits nach Herstellervorgaben.

3.8.3.5 Massenspektrometrie

Die Flugzeit-massenspektrometrische Analyse von Proteinen erfolgte mittels Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation (MALDI-TOF) durch das Biologisch-Medizinische Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Die untersuchten Proben wurden entweder nach der IMAC über Nacht gegen Wasser dialysiert oder mit einem Skalpell aus dem SDS-Gel ausgeschnitten und isoliert. Zur Sequenzierung wurde das Protein einem tryptischen Verdau unterzogen. Vorbereitung, Durchführung und Auswertung der Daten erfolgten durch das BMFZ.

3.8.3.6 Statische Lichtstreuung

Die Bestimmung der molekularen Masse erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie in Kombination mit statischer Lichtstreuung. Das mit polarisiertem Licht bestrahlte Protein verursacht dabei eine Streuung des eingestrahlten Lichts in Abhängigkeit der molekularen Masse. Die Größenausschlusschromatographie des Proteins $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ wurde mittels Superose 6 10/300 Säule in 20 mM Tris/HCl pH 7,9 und 300 mM NaCl an einer *Äkta Purifier* durchgeführt. Das eluierte Protein wurde mittels dreifach-Winkel Lichtstredetektor (miniDAWNTM Treos, Wyatt Technology) und einem Brechungsindexdetektor (Optilab[®] rEXTM, Wyatt Technology) analysiert. Die Analyse der Daten erfolgte mittels *ASTRA Software* (Wyatt Technology).

3.8.3.7 Retardierungsanalysen

Die Interaktionsstudien zwischen dem Protein $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ und RNA-Fragmenten der Transkripte für die Untereinheiten ND1 und ND4 wurden mittels Retardierungsanalysen durchgeführt. Zur Identifikation von Interaktionen zwischen Protein und RNA wurden jeweils 15 nM radioaktiv markierter RNA mit

0 bis 5 bzw. 2,3 μM Protein in 100 mM Bicine pH 9, 50 mM NaCl und 200 mM Xylitol in 11 bis 15 Reaktionsansätzen von je 15 μl für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Vermeidung unspezifischer Wechselwirkungen wurden den Reaktionsansätzen 20 ng/ μl Heparin hinzugefügt und weitere 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die verwendeten RNA- und Proteinkonzentrationen der einzelnen Reaktionsansätze sind in Tabelle 3.6 angegeben.

Tabelle 3.6 Verwendete Konzentrationen der Reaktionsansätze für Retardierungsanalysen

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	
RNA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	nM
Protein	0,00	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,8	1,0	2,3	3,6	5,0	μM

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
RNA	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	15	nM
Protein	0,00	0,04	0,06	0,08	0,1	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0	2,3	μM

Die Proben wurden mit 0,5 x TB Puffer mit jeweils 0,005 % Xylencyanol und Bromphenolblau versetzt und die Komplexe unter nativen Bedingungen in 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt. Dabei migrieren die Komplexe im Vergleich zur freien RNA verzögert im Gel. Als Gel- und Laufpuffer diente 0,5 x TB-Puffer. Die Elektrophorese erfolgte bei 4°C und 250 V für vier bis sechs Stunden bzw. bei 70 V über Nacht. Das Gel wurde anschließend über Nacht mithilfe eines Geltrockners getrocknet und für wenige Stunden bis zu mehreren Tagen auf eine Phosphor-Imaging-Platte in Expositionskassetten exponiert. Die Visualisierung der RNA und die Auswertung des Autoradiogramms erfolgte mittels Fluorescent Image Analyzer (BFLA 3000, Fujifilm)

4. Ergebnisse

4.1 Sequenzanalyse der PPR-Proteine ncu07684 und ncu06461

Das Gen ncu07684 kodiert auf einem Exon in der Länge von 1926 bp ein konserviertes hypothetisches Protein, bestehend aus 641 Aminosäuren mit einem kalkulierten Molekulargewicht von 72 kDa und einem isoelektrischen Punkt von 6,3. Es können keine Transmembranregionen identifiziert werden, sodass das Protein vermutlich in löslicher Form synthetisiert wird. Mit einer geringen Verlässlichkeit ($RC = 5^2$) wird mittels TargetP für das Protein ein Sekretionssignal in der Länge von 21 Aminosäuren vorhergesagt (Emanuelsson *et al.* 2007).

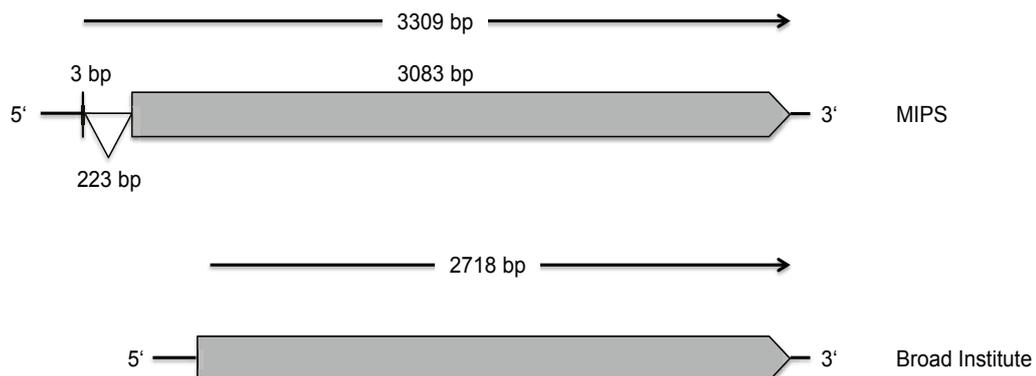


Abbildung 4.1 Schematische Darstellung des Gens ncu20711 bzw. ncu06461 von MIPS und dem Broad Institute. Exons sind grau und Introns als Dreiecke dargestellt.

Das Protein ncu06461 (alternative Bezeichnung ncu20711) ist bisher als konserviertes, hypothetisches Protein klassifiziert, dessen offener Leserahmen durch das *munich information center for protein sequences*³ (MIPS) und der

² RC = *Reliability Class* reicht von 1 bis 5 mit 1 als sicherster Vorhersage

³ MIPS Neurospora crassa Genome Database, <http://www.helmholtz-muenchen.de/en/ibis/institute/groups/fungal-microbial-genomics/resources/mncdb/index.html>

Neurospora crassa Database des Broad-Instituts⁴ unterschiedlich vorhergesagt wird. Abbildung 4.1 zeigt schematisch die vorhergesagten offenen Leserahmen des Gens ncu20711 bzw. ncu06461. Laut dem *munich information center for protein sequences* kodiert das Gen ncu20711 ein 3309 bp DNA-Fragment mit zwei Exons und einem Intron, wobei das erste Exon nur aus 3 bp besteht.

Tabelle 4.1 Sequenzanalyse von ncu20711 im Vergleich zu ncu06461

	MIPS	Broad-Institute
Transkriptionseinheit	2 Exons, 1 Intron, insgesamt 3309 bp	1 Exon aus 2718 bp
Länge der Proteinsequenz	1028 Aminosäuren	906 Aminosäuren
Molekulargewicht	115 kDa	102 kDa
Isoelektrischer Punkt	9,99	8,92
Hydrophobizität	Keine TMD	Keine TMD
Lokalisierung	unbekannt (RC=2)	Mitochondrien (RC=2)

TMD = Transmembrandomäne

Tabelle 4.1 stellt die Sequenzanalyse beider Versionen vergleichend dar. Das translatierte Protein besitzt mit 1028 Aminosäuren ein Molekulargewicht von ca. 115 kDa und einen isoelektrischen Punkt von 9,99. Dieses Protein wird vom Broad-Institut mit der Bezeichnung ncu06461 als hypothetisches Protein mit einem Exon von 2718 bp angegeben, welches als Produkt ein Protein aus 906 Aminosäuren bildet. Das Molekulargewicht und der isoelektrische Punkt können mittels ProtParam auf 102 kDa und 8,92 bestimmt werden (Wilkins *et al.* 1999). Im Vergleich beider Proteinsequenzen ergibt die MIPS Version eine Verlängerung des N-Terminus um 122 Aminosäuren im Vergleich zur Version des Broad Instituts, wobei der C-Terminus in beiden Versionen übereinstimmt. Da es sich bei den offenen Leserahmen von MIPS und dem Broad-Institut nur um Vorhersagen handelt, kann die Proteinsequenz nicht eindeutig verifiziert werden. Es können keine potenziellen Transmembrandomänen identifiziert werden, sodass von einem löslichen Protein ausgegangen werden kann. Nur

⁴ Broad Institute *Neurospora crassa* Database,
<http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/neurospora/MultiHome.html>

für die kürzere Broad-Version kann mittels TargetP mit einer hohen Verlässlichkeit (RC=2) eine mitochondriale Präsequenz mit einer Länge von 70 Aminosäuren vorausgesagt werden, während die Anwesenheit einer mitochondrialen oder chloroplastidären Präsequenz oder eines Sekretions-signals mit der gleichen Verlässlichkeit für die lange MIPS-Version ausgeschlossen wird (Emanuelsson *et al.* 2007).

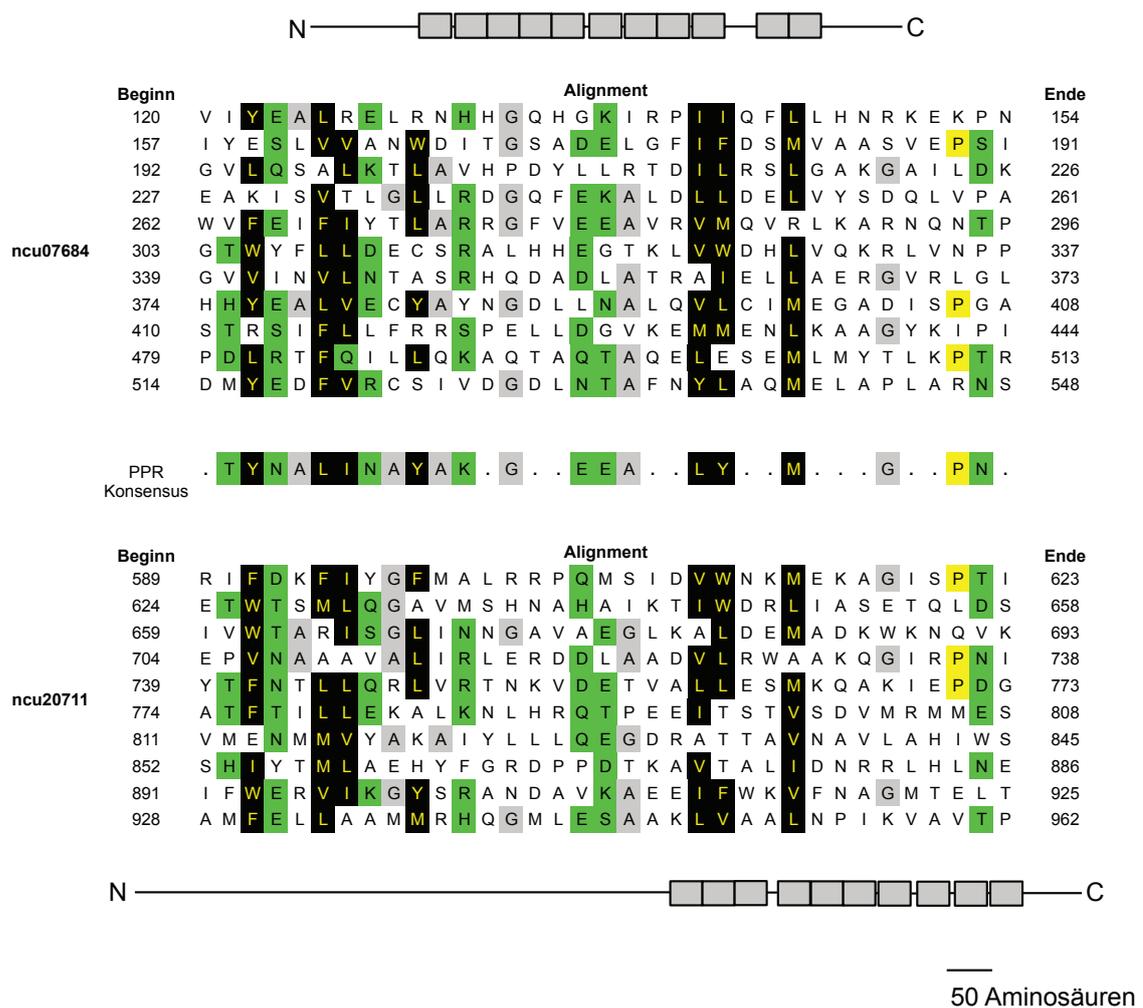


Abbildung 4.2 Alignment der PPR-Motive von ncu07684 und ncu20711. Die PPR Konsensussequenz wurde aus 1303 putativen PPR-Proteinen aus *A. thaliana* ermittelt. Die Konsensussequenz und die zur Konsensussequenz ähnlichen Aminosäuren aus den angegebenen PPR-Motiven sind farblich nach der Art der Aminosäure markiert: hydrophob grau, hydrophil grün, kleine Seitenkette grau, Prolin gelb (Small und Peeters 2000). Die PPR-Motive in den Proteinsequenzen sind als graue Rechtecke dargestellt.

Sowohl für *ncu07684* als auch für *ncu20711* bzw. *ncu06461* kann die Zugehörigkeit zu den PPR-Proteinen der P-Untergruppe nachgewiesen werden (Solotoff *et al.* 2014). Abbildung 4.2 zeigt die mittels TPRpred mit hoher Signifikanz identifizierten PPR Domänen im Vergleich zu der von Small und Peeters definierten Konsensussequenz (Small und Peeters 2000; Karpenahalli *et al.* 2007). Das Protein *ncu07684* weist über das gesamte Protein verteilt elf PPR Domänen auf. Davon gruppieren sich die ersten neun und die letzten beiden Motive jeweils in Tandemanordnung.

Im Protein *ncu20711* lassen sich zehn PPR Domänen bestimmen, welche sich ausschließlich im C-Terminus des Proteins befinden. Dabei liegen die Motive mit kleinen Unterbrechungen in Tandemanordnung vor

4.2 Komplementation der Deletionsmutanten 20112 und 20449

In vorangegangenen Arbeiten wurde der Einfluss der zwei Gene *ncu06461* (alternative Bezeichnung *ncu20711*) und *ncu07684* der PPR-Proteinfamilie auf die Komplexe der mitochondrialen Atmungskette über Deletionsmutanten untersucht. In einem Screening wurden die vom Fungal Genetics Stock Center⁵ (FGSC) erworbenen Deletionsmutanten mittels verschiedener Verfahren auf ihre Cytochrom- und Proteinkomposition untersucht. Die Abwesenheit der Gene *ncu20711* bzw. *ncu06461* (FGSC 20112) und *ncu07684* (FGSC 20449) zeigte einen spezifischen Einfluss auf die Assemblierung des Atmungskettenkomplex I, während alle weiteren Komplexe der Atmungskette nicht betroffen waren. Beide Mutanten zeigten die Anwesenheit des peripheren Arms, der Membranarm konnte nicht nachgewiesen werden (Solotoff *et al.* 2014).

Um nachzuweisen, dass der in den Mutanten identifizierte Komplex-I-Defekt eindeutig durch das fehlende Gen verursacht wurde, wurden Komplementationsmutanten erstellt. Die Komplementation erfolgte durch heterologe Rekombination in das Genom der Deletionsmutanten. Ausgangspunkt war der pET28b-Vektor, welcher die kodierenden Gensequenzen von *ncu20711* sowie *ncu07684* bereits enthielt. Mittels Polymerase-

⁵ Fungal Genetics Stock Center, <http://www.fgsc.net/>

Kettenreaktion (PCR) wurden die Gensequenzen amplifiziert und um Sequenzen ergänzt, die für einen C-terminalen His-tag in Kombination mit einem Strep-tag kodieren, die zur späteren Anreicherung und zum Nachweis der Proteine dienen sollten. Anschließend erfolgte eine Insertion in den pMYX2-Vektor. Dieser enthält zwei Gene, die Resistenz gegenüber dem Antibiotikum Ampicillin und dem Fungizid Benomyl verleihen, sowie den chinasaure-induzierbaren qa-2 Promotor aus *N. crassa* und den trpC Terminator aus *Aspergillus nidulans*. Die Verwendung dieses Vektors hat den Vorteil, dass er direkt sowohl zur Klonierung in *E. coli* als auch zur anschließenden Expression in *N. crassa* genutzt werden kann (Campbell *et al.* 1994). Die Plasmide wurden in Zusammenarbeit mit der *Protein Production Facility* der Heinrich-Heine-Universität erstellt und nach Linearisierung mit der Restriktionsendonuklease Scal mittels Elektroporation ektopisch in das Genom der Deletionsmutanten integriert.

Die erfolgreiche Proteinsynthese wurde durch die Komplementation des Komplex-I-Defekts und der wiederhergestellten Enzymaktivität mittels Blau Nativ-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) überprüft. Dazu wurden die Multienzymkomplexe der Atmungskette aus isolierten Mitochondrien solubilisiert. Die Solubilisierung der Komplexe in enzymatisch aktiver Form wurde durch Solubilisierungspuffer mit n-Dodecyl- β -Maltosid (DDM) als nichtionisches Detergenz und 6-Amino-Caprinsäure erreicht. Durch Bindung von Coomassie® G-250 an die solubilisierten Proteinkomplexe wurde die für die Elektrophorese benötigte negative Ladung erreicht (Schagger und von Jagow 1991). Die Auftrennung der Enzymkomplexe erfolgte in einem kontinuierlichen, 4-16 %igen Bis-Tris-Polyacrylamid-Gel. Anschließend wurde die Anwesenheit und eindeutige Identifizierung des Komplex I mittels spezifischer Färbung überprüft, welche einen Aktivitätsnachweis im Gel erlaubt. Die Komplex-I-Färbung beruht dabei auf der Präzipitation von Formazan als blau-violette Kristalle, welche von der Reduktion von Nitrotetrazoliumblau (NBT) herrühren. Die Reduktion ist gekoppelt an die Oxidation von in der Färbelösung enthaltenem NADH + H⁺, welche durch den aktiven Komplex I im Gel katalysiert wird, NBT dient dabei als Wasserstoffakzeptor. Somit kann anhand der Färbung des Komplex I nicht nur qualitativ, sondern eingeschränkt auch quantitativ Aktivität nachgewiesen werden (Sabar *et al.* 2005).

Die nachfolgende Abbildung 4.3 zeigt die BN-PAGE der komplementierten Mutanten sowie einen Ausschnitt aus der Abbildung der Dissertation von Solotoff (2011) mit dem Wildtyp und den Deletionsmutanten zum Vergleich.

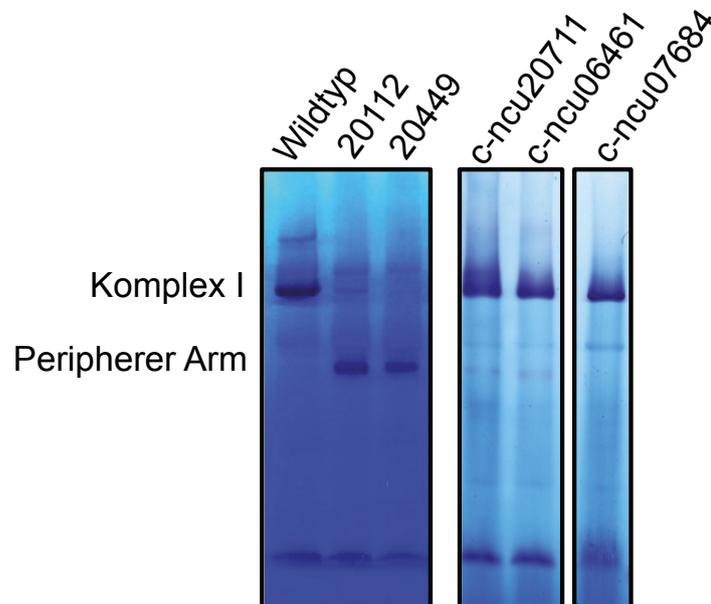


Abbildung 4.3 BN-PAGE komplementierter Deletionsmutanten 20112 und 20449 mit Komplex-I-Aktivitätsfärbung. Abbildung links entnommen aus Solotoff (2013), rechts: komplementierte Mutanten. DDM solubilisierte Mitochondrien von *N. crassa* wurden mittels *NativePAGE*TM Novex® 4-16 % Bis-Tris Gel nach Herstellerangaben aufgetrennt. Die Identifizierung des Komplex I erfolgte mittels spezifischer Aktivitätsfärbung.

Das Gel aus der Dissertation von Solotoff (2011) zeigt eindeutig die beeinträchtigte Synthese des Komplex I. Anstelle eines reifen Komplex I, wie er im Wildtyp zu sehen ist, zeigt sich in den Mutanten 20112 und 20449 nur der periphere Arm, in dem die für die Färbung benötigten Redoxreaktionen stattfinden. Aufgrund der geringeren Größe, migriert dieser weiter im Gel als der vollständige Komplex I (Nehls *et al.* 1992).

In den beiden weiteren Gelen der Abbildung wird das BN-Gel von Mutanten gezeigt, in denen die Komplementierung erfolgreich stattgefunden hat. In allen drei Spuren lässt die Färbung eine wiederhergestellte Aktivität des reifen Komplex I erkennen, die darauf schließend lässt, dass der Defekt durch die Integration der modifizierten Gene wieder komplementiert wird. Interessanter-

weise kann sowohl die Version ncu20711 als auch die verkürzte Version ncu06461 den Komplex-I-Defekt wieder komplementieren. Zusätzlich weisen beide Mutanten gleichermaßen Reste des peripheren Arms auf, welche als zarte Banden im Gel sichtbar sind.

4.3 Heterologe Expression von PPR-Proteinen

Um den Einfluss der PPR-Proteine auf den RNA-Metabolismus *in vitro* zu untersuchen, sollten die Proteine in ausreichender Menge hergestellt und bis zur Homogenität isoliert werden. In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits Versuche zur heterologen Expression der PPR-Gene ncu20711 und ncu07684 durchgeführt. Die Expression erfolgte als Hexahistidin-Fusionsproteine im Expressionsvektor pET28b im *E. coli* Stamm BL21 (DE3). Dabei wurde festgestellt, dass eine erfolgreiche Expression zwar möglich ist, jedoch erfolgte die Expression von ncu20711 in nur sehr geringen Mengen und ausschließlich in unlöslicher Form. Das Gen ncu07684 wurde zwar in höheren Mengen exprimiert (Vgl. dazu auch Abbildung 4.4), lag jedoch hauptsächlich zu Einschlusskörpern aggregiert vor. Der geringe Anteil des löslich exprimierten Proteins wies darüber hinaus eine hohe Neigung zur Aggregation auf. Die Variation der Expressionsparameter sowie der Pufferbedingungen beim Aufschluss führten zu keinen signifikanten Verbesserungen (Albrandt 2011), sodass im Rahmen dieser Arbeit eine geänderte Expressionsstrategie entwickelt wurde.

In der Literatur sind einige Maßnahmen beschrieben, um die Menge von inaktivem, unlöslichem Protein in aktives und lösliches Protein zu überführen. Dabei zielen die Maßnahmen hauptsächlich auf die Kontrolle des zellulären Milieus bei der Expression, die Rückfaltung der Proteine aus Einschlusskörpern und die Modifizierung des Zielproteins als Fusionsprotein ab (Sahdev *et al.* 2008).

4.3.1 Expression von ncu07684

Um den Anteil an löslichem Protein ncu07684 bei der Expression zu erhöhen, wurden einige Strategien verfolgt, welche in Tabelle 4.2 zusammengefasst wurden. Die Verringerung der Expressionsrate, die Variation des Nährmediums, die Koexpression von Chaperonen sowie Versuche zur Sekretion führten zu keinen signifikanten Verbesserungen. Es wurden nur minimale Mengen des Proteins im löslichen Überstand nach Zellaufschluss und Ultrazentrifugation detektiert, während der Hauptteil des Proteins im unlöslichen Sediment vorlag. Die Zugabe von Triton X-100 zu dem Aufschlusspuffer führte geringfügig zu höheren Proteinmengen im Überstand (Ergebnisse nicht gezeigt).

Da für die hier zu untersuchenden Proteine keine validierten Aktivitätstests vorlagen, wurde auf die Rückfaltung der Proteine aus Einschlusskörpern verzichtet.

Tabelle 4.2 Strategien zur Erhöhung der Proteinlöslichkeit und deren Umsetzung

Strategie	Umsetzung
Verringerung der Expressionsrate	<ul style="list-style-type: none"> • Verringerung der Expressionstemperatur mit dem Expressionsstamm <i>ArcticExpress RIL</i> (DE3) • Verwendung des <i>Low-Copy</i>-Plasmids pJOE • Verringerung der Induktorkonzentration
Variation des Nährmediums	<ul style="list-style-type: none"> • 2 x LB +/- Spurenelemente • SOC +/- Glycylglycin • <i>Terrific Broth</i> +/- 2 % Glycerin • <i>Super Broth</i> +/- 2 % Glycerin • M9 +/- Glucose • Selbstinduzierendes Medium (Studier 2005)
Koexpression von Chaperonen	<ul style="list-style-type: none"> • Expressionsstamm <i>ArcticExpress RIL</i> (DE3)
Sekretion	<ul style="list-style-type: none"> • Sekretion als Fusionsprotein über einen bakteriellen ABC-Transporter

Eine weitere Strategie, um die Löslichkeit des Proteins zu erhöhen, war die Verkürzung des Proteins um seine Signalsequenz. Unter der Annahme, dass das Protein in den RNA Metabolismus der Mitochondrien involviert ist, sollte eine mitochondriale Präsequenz identifiziert werden können, die nach dem Import abgespalten wird und für die Aktivität des Proteins nicht relevant ist. Gekürzt um die in Kapitel 4.1 ermittelte Signalsequenz von 21 Aminosäuren, lässt sich mit einer hohen Verlässlichkeit ($R=2$) mittels TargetP eine mitochondriale Präsequenz von 43 Aminosäuren bestimmen (Emanuelsson *et al.* 2007). Das Programm MitoProt II bestimmt den Import in die Mitochondrien sogar mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % und einer Länge der Präsequenz von 44 Aminosäuren.

Mittels inverser PCR und anschließender Ligation wurde das Expressionsplasmid um die Gensequenzen verkürzt, die entweder für die ersten 21 oder 65 Aminosäuren kodieren. In beiden Fällen wurden die Proteine mit einem C-terminalen Hexahistidin-*tag* synthetisiert. Durch Sequenzierung wurden die korrekten Sequenzabfolgen und die Abwesenheit von Mutationen verifiziert. Nach der Expression ergeben sich für das Protein ncu07684 in voller Länge inklusive N-terminalem Hexahistidin-*tag* (ncu07684-oS) ein Molekulargewicht von 73 kDa, für die um 21 Aminosäuren verkürzte Version $\Delta 21$ -ncu07684-His wurde ein Molekulargewicht von 70 kDa und für die um 65 Aminosäuren verkürzte Version $\Delta 65$ -ncu07684-His von 66 kDa mittels ProtParam bestimmt (Wilkins *et al.* 1999).

Abbildung 4.4 zeigt die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse einer Testexpression von jeweils drei Kolonien beider verkürzter Versionen im *E. coli* Stamm BL21 (DE3). Zum Vergleich wurde eine Expression mit dem Konstrukt in voller Länge unter gleichen Konditionen durchgeführt. Abbildung 4.4 zeigt oben die SDS-PAGE der Ganzzellanalyse, wobei eine gleichmäßige Auftragung der Zellmenge deutlich wird. Nur in Spur zwei, welche die Zellen des Proteins in voller Länge drei Stunden nach der Expression zeigt, lässt sich eine intensiv gefärbte Bande auf der gewünschten Höhe von ca. 73 kDa feststellen.

In der Western Blot-Analyse zeigt sich unter Verwendung eines Antikörpers, der gegen den Hexahistidin-*tag* gerichtet ist, hingegen in allen Spuren nach Induktion eine deutliche Bande jeweils in der entsprechenden Höhe. Mit allen Konstrukten ist somit eine erfolgreiche Expression möglich.

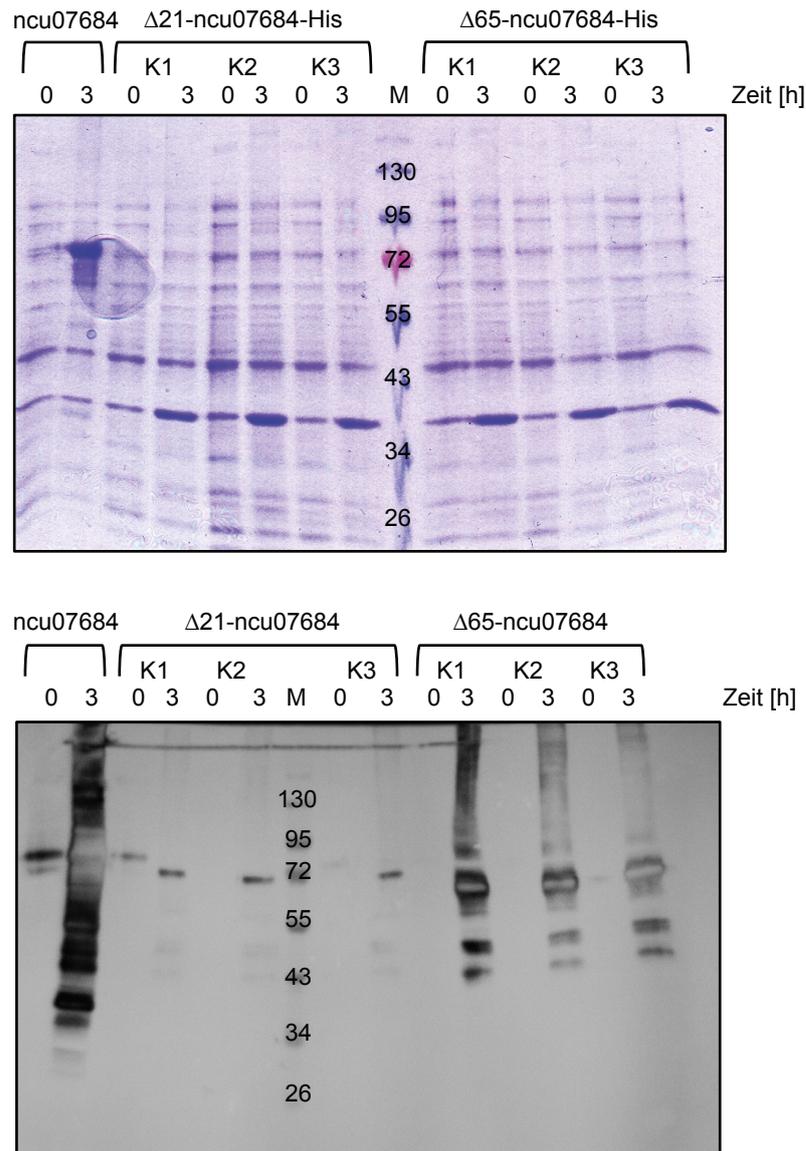


Abbildung 4.4 SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Testexpression von ncu07684, $\Delta 21$ -ncu07684-His und $\Delta 65$ -ncu07684-His. Oben: Coomassie gefärbte SDS-PAGE. Unten: Western Blot unter Verwendung eines His-tag-Antikörpers. Die Expression erfolgte mit drei Kolonien jedes verkürzten Fragments jeweils in 700 ml LB-Medium bei 37°C und 180 μ M. Nach Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,4 wurde mit 1 mM IPTG die Expression induziert. Vor und nach 3 Stunden der Induktion wurden Ganzzelllysate (10^7 Zellen) untersucht. M = Größenstandard, K = Kolonie

Die Probe des Konstrukts in voller Länge zeigt ein fast durchgängiges Signal in der gesamten Spur des Western Blots, was auf unvollständig synthetisierte und

zu Einschlusskörpern aggregierte Proteine hinweist. Die Western Blot-Analyse untermauert noch einmal das Ergebnis der SDS-PAGE-Analyse, in dem verdeutlicht wird, dass die Proteinmenge in der Version in voller Länge deutlich höher ist als in den verkürzten Versionen. Die geringsten Proteinmengen sind in der einfach verkürzten Version um 21 Aminosäuren zu sehen. Neben den gewünschten Proteinen lassen sich viele Banden im Bereich kleinerer Proteingrößen in allen Spuren detektieren. Da diese auch mit dem His-tag-Antikörper interagieren, ist von kleineren Fragmenten der Zielproteine auszugehen. Die Probe von ncu07684 sowie die erste Kolonie von $\Delta 21$ -ncu07684-His zeigen in der Western Blot-Analyse bereits vor Induktion eine Bande, was auf Basalexpression hindeuten könnte. Da jedoch die Größe dieses Proteins im Falle der verkürzten Variante der Größe des Proteins in voller Länge entspricht, ist hier eher von präparativen Ungenauigkeiten auszugehen. Die Expressionsrate der einzelnen Kolonien beider verkürzter Versionen zeigt keine signifikanten Unterschiede.

Um den Einfluss der Genverkürzung auf die Menge des löslichen Proteins zu untersuchen, wurde eine weitere Expression durchgeführt, bei der nach einer, zwei und drei Stunden jeweils eine Probe abgenommen und ein Zellaufschluss durchgeführt wurde. Es wurde jeweils eine Probe des Überstandes von 100 μ g sowie ein äquivalentes Volumen des resuspendierten Sediments nach Ultrazentrifugation mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert (Abbildung 4.5). Dabei kann das Sediment neben unlöslichen Proteinen zudem unaufgeschlossene Zellen enthalten.

Die SDS-PAGE-Analyse zeigt den erfolgreichen Aufschluss in allen Proben sowie die Auftragung von vergleichbaren Proteinmengen. Die Western Blot-Analyse zeigt in beiden verkürzten Versionen Banden in der Höhe der jeweiligen Zielproteine und zusätzlich kleinere Fragmente in allen Spuren. Die höchste Menge an löslichem Protein wird bereits eine Stunde nach Induktion detektiert. Während sich bei der einfach verkürzten Version zu vorherigen Versuchen mit dem Protein in voller Länge keine Verbesserung zeigte, konnte die Menge an löslichem Protein durch Deletion der Signalsequenz von 65 Aminosäuren eine deutliche Steigerung verzeichnen (vgl. Albrandt 2011). Der größte Teil des Proteins liegt jedoch weiterhin unlöslich im Sediment vor. Für

folgende Versuche erfolgte die Fokussierung auf das Protein $\Delta 65$ -ncu07684-His.

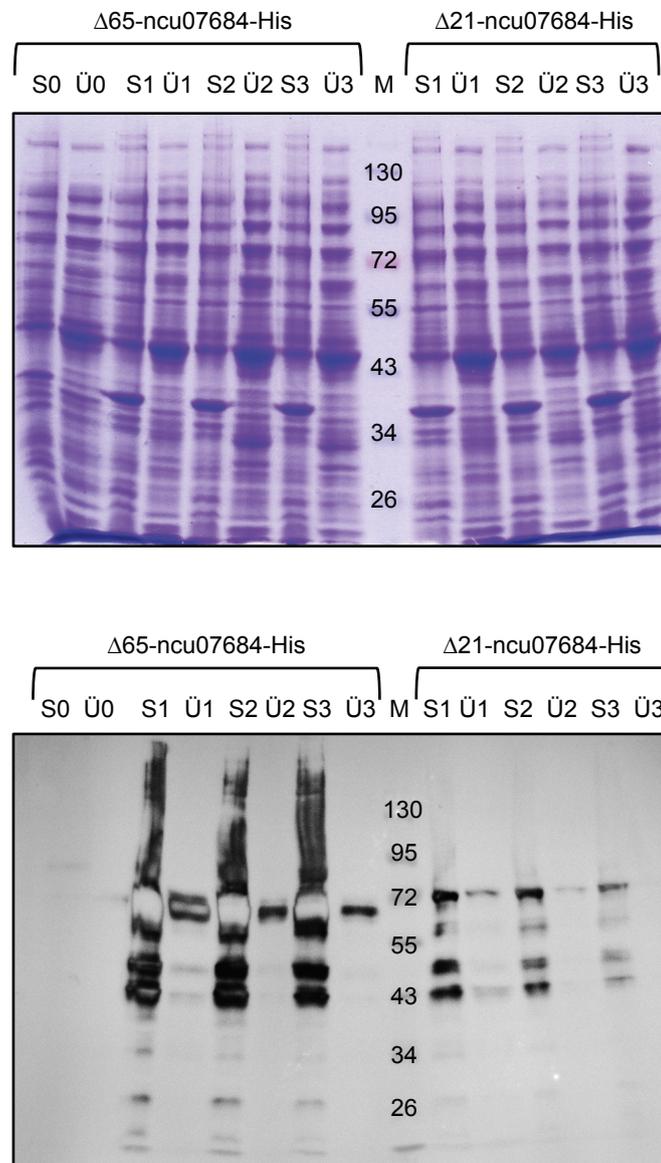


Abbildung 4.5 SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse aufgeschlossener Zellen von $\Delta 21$ -ncu07684-His und $\Delta 65$ -ncu07684-His. Oben: Coomassie gefärbte SDS-PAGE. Unten: Western Blot unter Verwendung eines His-tag-Antikörpers. Es wurden Proben vor sowie nach ein, zwei und drei Stunden nach Induktion abgenommen, aufgeschlossen und zentrifugiert. S = Sediment, Ü = Überstand, M = Marker

Um das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein zu erhöhen, wurde die Expression in Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen, von Sorbitol und Betain, sowie mittels Hitzeschock durchgeführt. Diese Strategie bewirkt durch erhöhte Osmolyt- sowie Chaperonkonzentration eine Erhöhung der Expression rekombinanter Proteine in löslicher Form (Oganesyan *et al.* 2007). Dazu wurden Expressionen in LBNB- sowie LBSB-Medium mit und ohne Anwendung des Hitzeschocks durchgeführt.

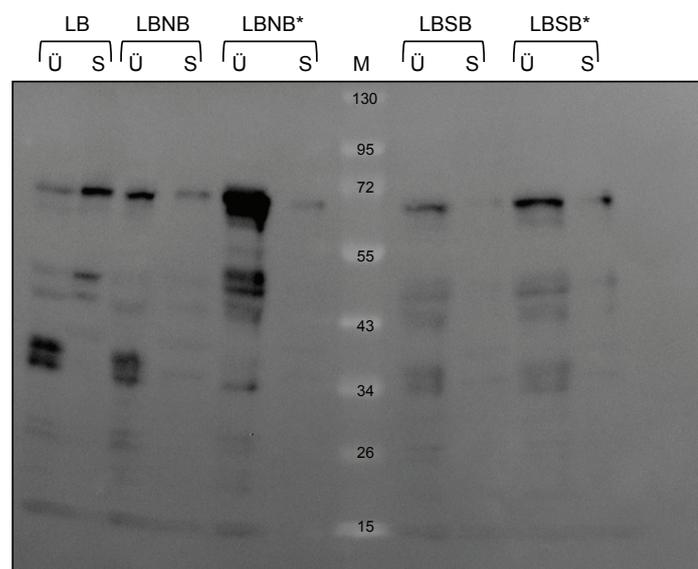


Abbildung 4.6 Western Blot-Analyse aufgeschlossener Zellen von $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ unter Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock während der Expression. Die Zellen wurden bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0,9 kultiviert. Anschließend wurden die Zellen auf 47°C erhitzt, die Genexpression mittels 0,5 mM IPTG induziert und die Kolben für eine weitere halbe Stunde bei 47°C belassen. Nach dem Hitzeschock wurde die Expression bei 20°C über Nacht fortgeführt. Zur Visualisierung wurde ein His-tag-Antikörper verwendet. LBNB = LB-Medium mit erhöhter NaCl-Konzentration und Zusatz von Betain und Glucose. LBSB = LB-Medium unter Zusatz von Sorbitol und Betain. S = Sediment, Ü = Überstand, M = Marker, * Anwendung des Hitzeschocks vor Induktion.

LBNB- unterscheidet sich von LB-Medium durch eine erhöhte Natriumchlorid-Konzentration und durch Zusatz von Betain und Glucose. LBSB enthält zusätzlich Sorbitol und Betain. Der Zusatz von Osmolyten soll die Stabilisierung von Proteinen in ihrer nativen Form unterstützen. Durch die Anwendung eines Hitzeschocks vor der Induktion werden möglicherweise Chaperone induziert, welche den Faltungsprozess der Proteine fördern bzw. die Proteinaggregation verhindern (Oganesyan *et al.* 2007).

Abbildung 4.6 zeigt die Western Blot-Analyse der aufgeschlossenen Zellen in den unterschiedlich verwendeten Medien mit und ohne Anwendung eines Hitzeschocks. Während der Anteil des unlöslichen Proteins die Menge des löslichen Proteins in LB-Medium deutlich übersteigt, so zeigt sich sowohl in LBNB- als auch LBSB-Medium eine Umkehrung des Verhältnisses. In beiden Medien wirkt der Hitzeschock sich positiv auf die lösliche Proteinmenge aus. Die größte Ausbeute an löslichem Protein lässt sich in LBNB-Medium unter Anwendung des Hitzeschocks verzeichnen. Auch hier sind viele kleinere Fragmente des Zielproteins in allen Spuren zu erkennen. Aus Abbildung 4.4 wird ersichtlich, dass die kleineren Fragmente bereits bei der Expression entstehen und nicht durch den Zellaufschluss verursacht werden.

Zur Optimierung wurden Expressionen mit unterschiedlichen Temperaturen und Expressionszeiten nach dem Hitzeschock durchgeführt. Abbildung 4.7 zeigt in der Western Blot- Analyse der aufgeschlossenen Zellen die höchsten Proteinausbeuten bei einer Expression bei 37°C und 30°C. Die Proteinmenge verringert sich bei einer Expression bei geringerer Temperatur. Verglichen mit Abbildung 4.6 ist die Gesamtproteinausbeute sowie das Verhältnis von löslichem zu unlöslichem Protein verschlechtert, jedoch sind auch deutlich geringere Mengen an kleineren Fragmenten zu detektieren. Für folgende Versuche wurde die Expression bei 37°C durchgeführt, dabei wurde auf die Ausbeute verzichtet, um eine höherwertige Proteinqualität zu erhalten.

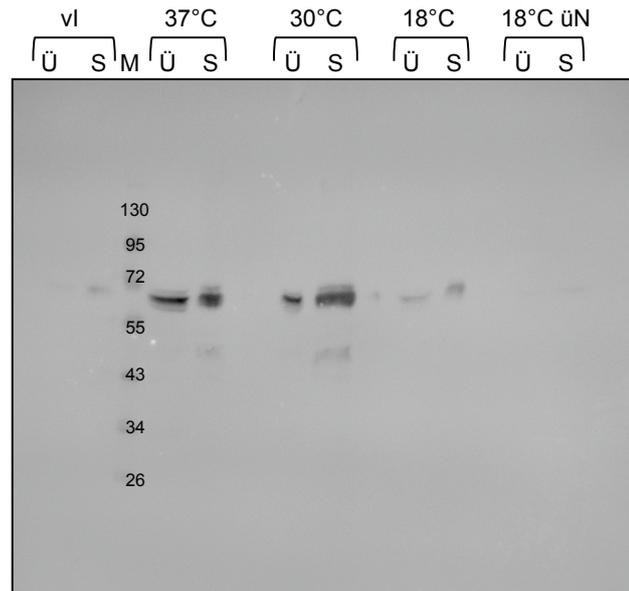


Abbildung 4.7 Western Blot-Analyse aufgeschlossener Zellen von $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ unter Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock während der Expression bei unterschiedlichen Temperaturen. Nach Anwendung des Hitzeschocks wurde die Expression bei 37°C für 2,5 Stunden, bei 30°C für 4 Stunden, bei 18°C für 4 Stunden und über Nacht fortgeführt. Es wurden jeweils 100 μg Protein des Überstands und 1/10 Volumen eines in äquivalentem Volumen resuspendierten Sediments aufgetragen. Zur Visualisierung wurde ein His-tag-Antikörper verwendet. vl = vor Induktion, S = Sediment, Ü = Überstand, üN = über Nacht, M = Marker.

Zur Vervollständigung wurde abschließend eine weitere Expression unter osmotischem Stress und Hitzeschock mit dem Konstrukt in voller Länge durchgeführt, deren SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse in Abbildung 4.8 zu sehen sind. In der SDS-PAGE-Analyse zeigt sich der erfolgreiche Zellaufschluss in allen Proben. Verglichen mit den Proben des Sediments deuten intensivere Banden in den jeweiligen Überständen auf ungleichmäßig aufgetragene Proteinmengen hin. Sowohl im Überstand als auch in den Sedimenten lassen sich keine Banden in der entsprechenden Größe eindeutig den Zielproteinen zuordnen. Die Expression über das Konstrukt in voller Länge zeigt in der Western Blot-Analyse das gewohnte Muster aus vielen Banden in unterschiedlichsten Größen, die vermutlich auf die Bildung von Einschlusskörpern zurückzuführen sind. Zwar liegt ein Teil des Proteins im löslichen

Überstand vor, jedoch ist dies mit vielen fehlerhaften Nebenprodukten verbunden. Im Vergleich dazu zeigt die Expression mit dem verkürzten Produkt ein Hauptprodukt in der erwarteten Größe von 66 kDa mit einer geringen Menge an kürzeren Fragmenten. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Kombination aus Verkürzung und Anwendung der Expressionsmethode unter osmotischem Stress und Hitzeschock zu verbesserten Proteinmengen in löslicher Form und hoher Homogenität geführt hat.

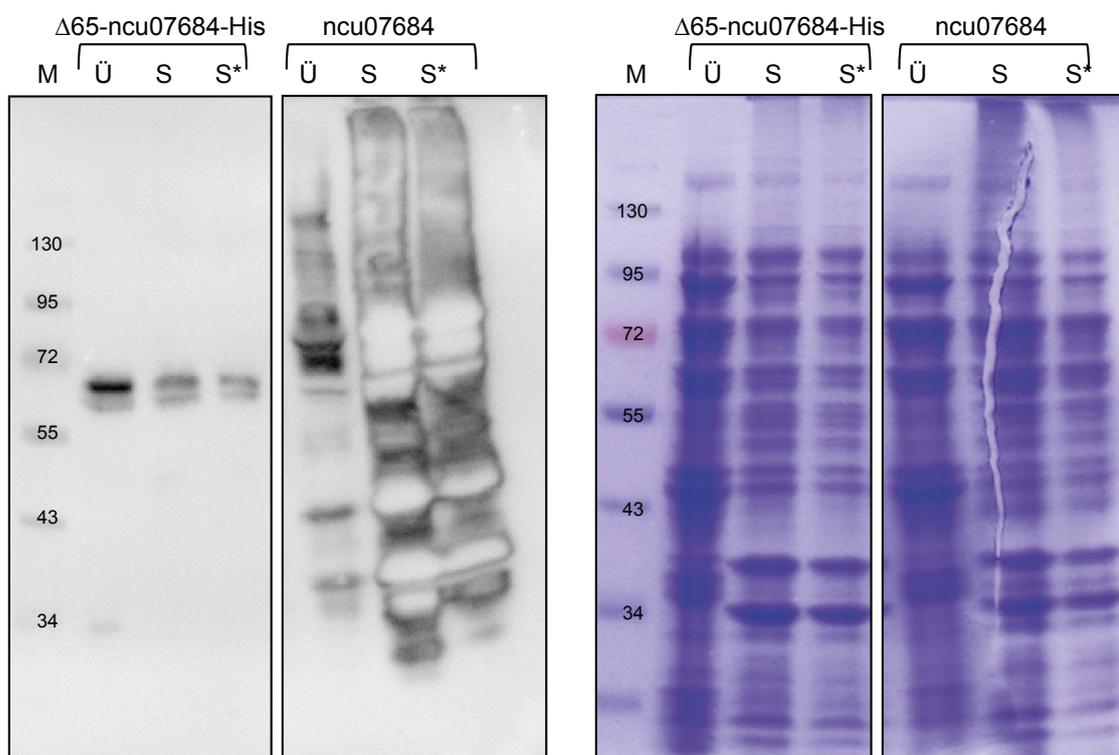


Abbildung 4.8 SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse aufgeschlossener Zellen von $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ und ncu07684 unter Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock während der Expression. Links: Western Blot unter Verwendung eines His-tag-Antikörpers. Rechts: Coomassie gefärbte SDS-PAGE. LBNB = LB-Medium mit erhöhter NaCl-Konzentration und Zusatz von Betain und Glucose. S = Sediment, S* = Sediment in halber Menge, Ü = Überstand

4.3.2 Expression von ncu06461

Auf die Problematik der unterschiedlich vorhergesagten Proteinsequenz von ncu20711 (MIPS) bzw. ncu06461 (Broad-Institute) wurde bereits in Kapitel 4.1 eingegangen. Die vorangegangenen Expressionsversuche beruhten auf der langen Version ncu20711 und zeigten sehr geringe Expressionslevel und darunter geringe Mengen an löslichem Protein. Bei den Versuchen wurden die Erkenntnisse, die mittels Expressionstests des Gens ncu07684 gewonnen wurden, auf die Expression von ncu06461 transferiert und angewandt. In Kapitel 4.2 wurde gezeigt, dass sowohl die lange als auch die kurze Version den Komplex-I-Defekt wieder komplementieren kann. Es ist zu vermuten, dass alle für die Aktivität notwendigen Informationen bereits in der kurzen Version enthalten sind, sodass im Rahmen dieser Arbeit die Expressionsversuche mit der kurzen Variante des Broad-Instituts durchgeführt wurden.

Die Klonierung sowie heterologe Expression des Proteins mit C-terminalem His-*tag* erfolgte ohne Präsequenz ($\Delta 95$ -ncu06461-His) in Zusammenarbeit mit Nguyen (2013) und Galle (2013) im pET28b Vektor im Expressionsstamm BL21 (DE3). Mit dem finalen Konstrukt wurde eine Testexpression durchgeführt. Vor sowie bis zu fünf Stunden nach Induktion wurden stündlich Proben abgenommen und als Ganzzellsate mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert und der Expressionsgrad ermittelt (Abbildung 4.9).

In der mit Coomassie gefärbten SDS-PAGE-Analyse zeigt sich eine leicht hervortretende Bande auf der Höhe des zu erwartenden Molekulargewichts des Proteins von 93 kDa in allen Spuren. Mittels Antikörper gegen den His-*tag* in der Western Blot-Analyse kann die ermittelte Proteinbande in der Höhe von 93 kDa als das Zielprotein identifiziert werden. Die Western Blot-Analyse zeigt bereits vor Induktion mit IPTG geringe Mengen des Proteins und ab der zweiten Stunde ist kein nennenswerter weiterer Anstieg der Expression festzustellen. Zusätzlich zu dem Zielprotein lässt sich deutlich ein weiteres Protein in Höhe von 55 kDa nachweisen, welches vermutlich einem kleineren Fragment des Zielproteins entspricht.

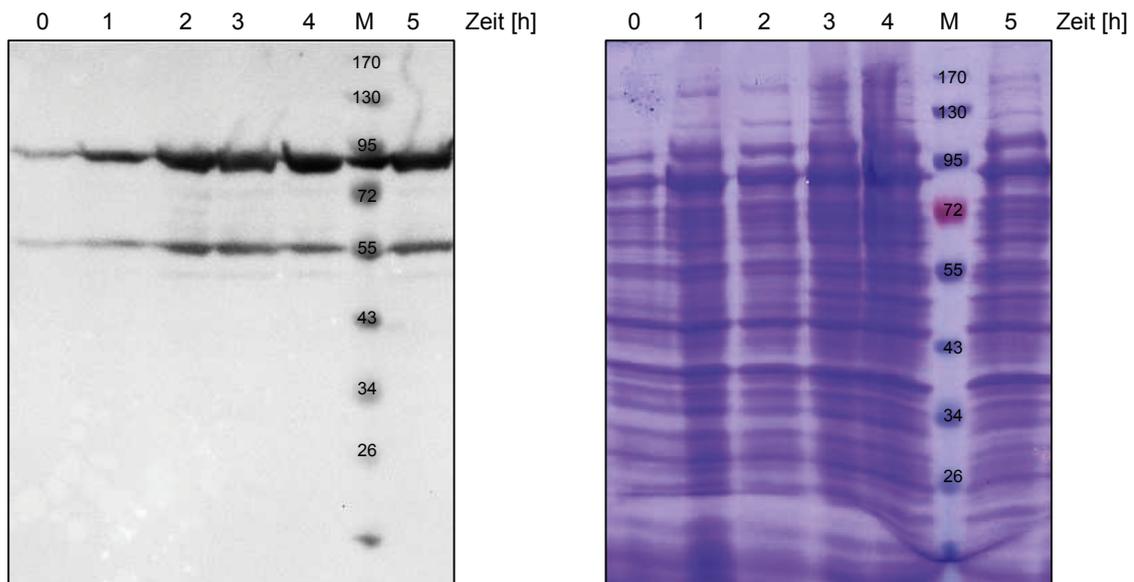


Abbildung 4.9 Expression von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$. Die Expression wurde in 100 ml LB-Medium bei 37°C und Induktion bei einer OD_{600} von 0,4 mit 1 mM IPTG durchgeführt. Es wurden jeweils vor (0) und bis zu fünf Stunden nach der Induktion Proben abgenommen und als Ganzzelllysate (10^7 Zellen) mittels SDS-PAGE und Western Blot analysiert. Links: Western Blot-Analyse unter Verwendung eines His-tag-Antikörpers, rechts: Coomassie gefärbte SDS-PAGE. M = Marker (Nguyen 2013)

Zur Überprüfung der Löslichkeit der Proteine wurde ein Zellaufschluss nach der Expression durchgeführt und mittels Zentrifugation wurden die löslichen Proteine von anderen Zellbestandteilen separiert. Mittels SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse wurde untersucht, welcher Anteil des Proteins im löslichen Überstand und unlöslichen Sediment vorlag (Abbildung 4.10).

SDS-PAGE- sowie Western Blot-Analyse zeigen intensiv gefärbte Banden in der Höhe des Zielproteins von 93 kDa sowohl im löslichen Überstand als auch im resuspendierten Sediment, wobei der Anteil des Proteins im unlöslichen Sediment überwiegt. Zusätzlich zeigt sich analog zur Abbildung 4.9 ein Protein in der Größe von ca. 55 kDa, welches vermutlich einem Fragment des gewünschten Proteins entspricht.

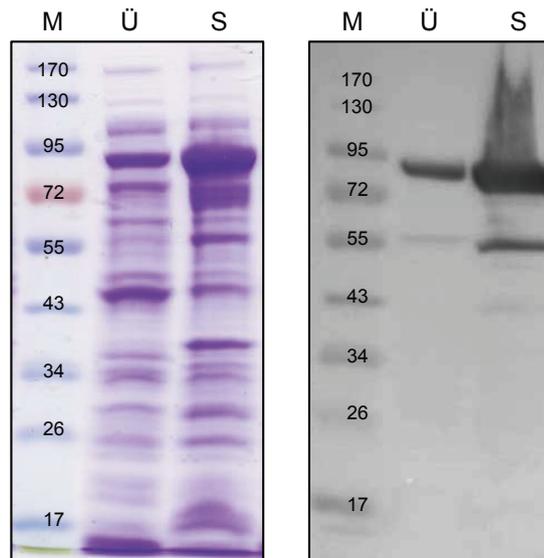


Abbildung 4.10 SDS-PAGE und Western Blot aufgeschlossener Zellen von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$. Die Expression wurde in LB-Medium bei 37°C und Induktion bei einer OD_{600} von 0,4 mit 1 mM IPTG durchgeführt. Links: Coomassie gefärbte SDS-PAGE, rechts: Western Blot-Analyse unter Verwendung eines His-tag-Antikörpers, M = Marker, Ü = Überstand, S = Sediment (Galle 2013)

Um den Anteil des Proteins in löslicher Form zu erhöhen, wurden Expressionsstudien unter unterschiedlichen Bedingungen durchgeführt. Dazu wurden in unterschiedlichen Versuchen die Expressions-temperaturen variiert und zusätzlich zur Induktion mit IPTG 3 % Ethanol zu einem Teil der Proben zugefügt. Nach Georgiou und Valax induziert die Zugabe von Ethanol zum Expressionsmedium die Expression von Hitzeschock-proteinen, welche einen förderlichen Effekt auf die lösliche Proteinexpression haben soll (Georgiou und Valax 1996). Da durch die Zugabe von Ethanol jedoch keine signifikanten Unterschiede zu der Expression in Abwesenheit von Ethanol zu verzeichnen sind, wird auf eine Darstellung der Ergebnisse verzichtet. Analog zu den Expressionsversuchen mit dem Gen $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ wurden Expressionen unter Anwendung eines Hitzeschocks durchgeführt. Dazu wurde in einem ersten Versuch auf ein Protokoll von Chen *et al.* (2002) zugegriffen, welches den Hitzeschock bei 42°C bereits bei der Kultivierung der Zellen bis zur gewünschten optischen Dichte, demnach vor Induktion mit IPTG vorsieht. So

wurde die Proteinaggregation bei hohen Temperaturen verhindert. Der Mechanismus der erhöhten Proteinlöslichkeit ist dabei nicht vollständig verstanden (Chen *et al.* 2002).

Abbildung 4.11 zeigt die SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der Expression von $\Delta 95$ -ncu06461-His bei 25 und 37°C jeweils mit und ohne vorangegangenen Hitzeschock.

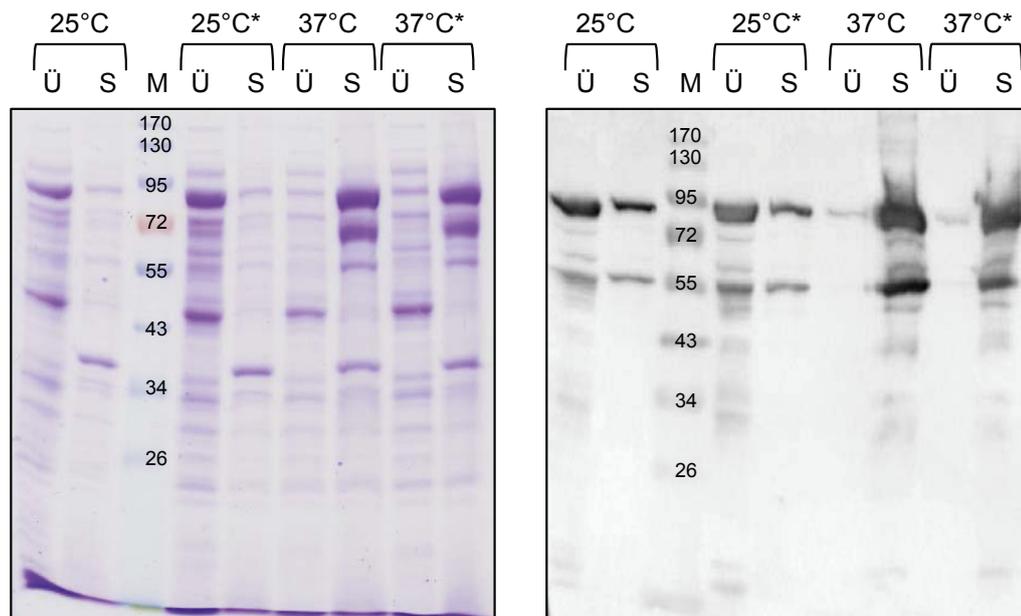


Abbildung 4.11 Expression von $\Delta 95$ -ncu06461-His bei 25°C und 37°C mit und ohne vorangegangenen Hitzeschock. Die Expression wurde in LB-Medium bei 25°C und 37°C mit und ohne Anwendung eines Hitzeschocks bei 42°C und Induktion bei einer OD_{600} von 0,4 mit 1 mM IPTG durchgeführt. Links: Coomassie gefärbte SDS-PAGE, rechts: Western Blot-Analyse unter Verwendung eines His-tag-Antikörpers. M = Marker, Ü = Überstand, S = Sediment, *Anwendung des Hitzeschocks (Galle 2013).

Beide Analysen zeigen einen deutlichen positiven Einfluss auf den Anteil an löslichem Protein durch die Temperatursenkung auf 25°C bei der Expression. Während bei der Expression bei 37°C der Großteil des Proteins im unlöslichen Sediment vorliegt, kann bei der Expression bei 25°C ein Verhältnis von 2:1 von löslichem zu unlöslichen Protein verzeichnet werden. Durch die Anwendung eines Hitzeschocks lassen sich bei gleicher Temperatur keine signifikanten

Unterschiede der Mengen an löslichem Protein detektieren, demnach kann kein eindeutiger positiver Effekt des Hitzeschocks auf die Löslichkeit des Proteins $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ nachgewiesen werden.

Der Einfluss der Zusammensetzung des Mediums wurde in einem kombinierten Protokoll nach Chen et. al (2002) und Oganesyanyan *et al.* (2007) überprüft. Dazu wurden Expressionsstudien unter osmotischem Stress in LBSB- sowie LBNB-Medium durchgeführt, bei dem der Hitzeschock vor Induktion erfolgte (Abbildung 4.12).

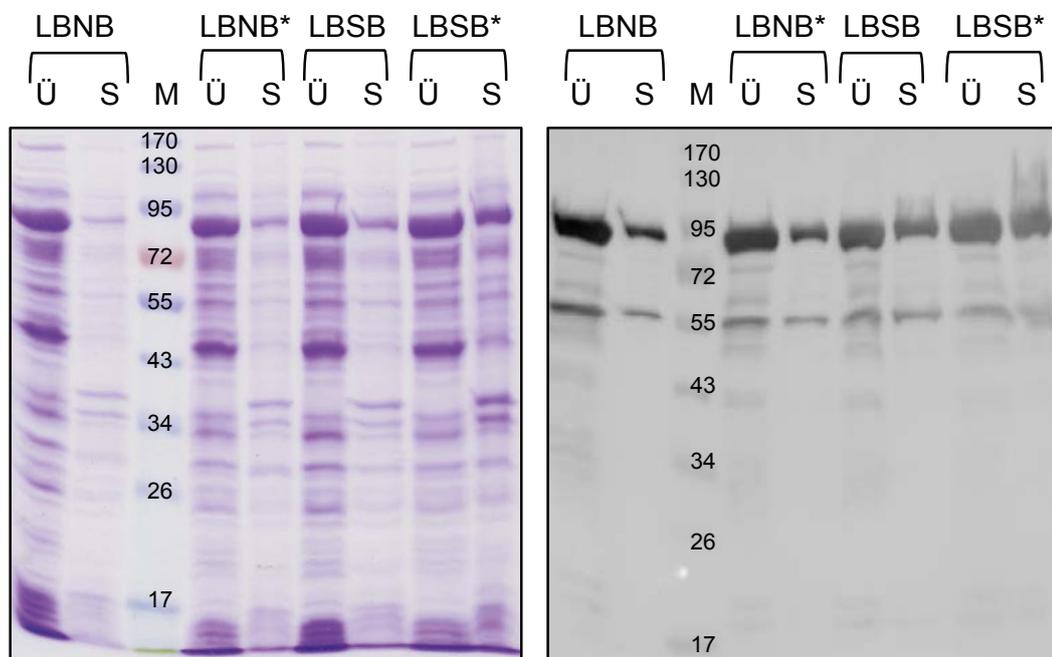


Abbildung 4.12 Expression von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ in LBNB- und LBSB-Medium bei 25°C mit und ohne vorangegangenen Hitzeschock. Die Kultivierung erfolgte in LBNB- bzw. LBSB-Medium bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,4. Nach Induktion mittels 1 mM IPTG wurde die Expression bei 25°C für vier Stunden fortgeführt. Links: Coomassie gefärbte SDS-PAGE, rechts: Western Blot-Analyse unter Anwendung eines His-tag-Antikörpers. M = Marker, Ü = Überstand, S = Sediment, *Anwendung des Hitzeschocks (Galle 2013).

Im Vergleich mit Abbildung 4.11 zeigen sich unter Anwendung von osmotischem Stress in LBNB- oder LBSB-Medium höhere Mengen an löslichem Protein. Dabei ist die Menge an löslichem Protein bei der Expression in LBSB-Medium möglicherweise geringfügig höher als bei der Expression in LBNB-Medium. Jedoch finden sich hier auch deutlich größere Mengen an unlöslichem Protein im Sediment. Der Einfluss des Hitzeschocks auf die Menge des exprimierten Proteins ist nur geringfügig größer als ohne Anwendung des Hitzeschocks. Aufgrund der nicht signifikanten Unterschiede und die eingeschränkte Möglichkeit von Quantifizierungen mittels Western Blot-Analyse, kann mit beiden Medien weitergearbeitet werden und auch die Anwendung des Hitzeschocks wirkt sich nicht negativ auf die Expression, das Zellwachstum und den Anteil an löslichem Protein $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ aus. Demnach wurden für die Expression von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ folgende Expressionsparameter festgesetzt: Die Zellen wurden unter Anwendung eines Hitzeschocks bei 42°C bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,4 in LBSB-Medium kultiviert und nach Zugabe von 1 mM IPTG bei 25°C für 4 Stunden exprimiert (Galle 2013).

4.4 Proteinisolierung

Für eine weitere *in-vitro*-Charakterisierung der Proteine war die Isolierung dieser aus dem Zellextrakt Voraussetzung. Die Isolierung der heterolog exprimierten Proteine erfolgte nach erfolgreichem Zellaufschluss mittels flüssigkeitschromatographischer Verfahren. Die Expression als Fusionsproteine ermöglicht eine gezielte Proteinisolierung über eine Affinitätschromatographie. Die Untersuchung der Homogenität und Stabilität der Proteine sollte anschließend mittels Größenausschlusschromatographie erfolgen.

4.4.1 Proteinisolierung von $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$

Die Isolierung des Proteins $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ erfolgte mittels immobilisierter Metallionen-Affinitätschromatographie (IMAC).

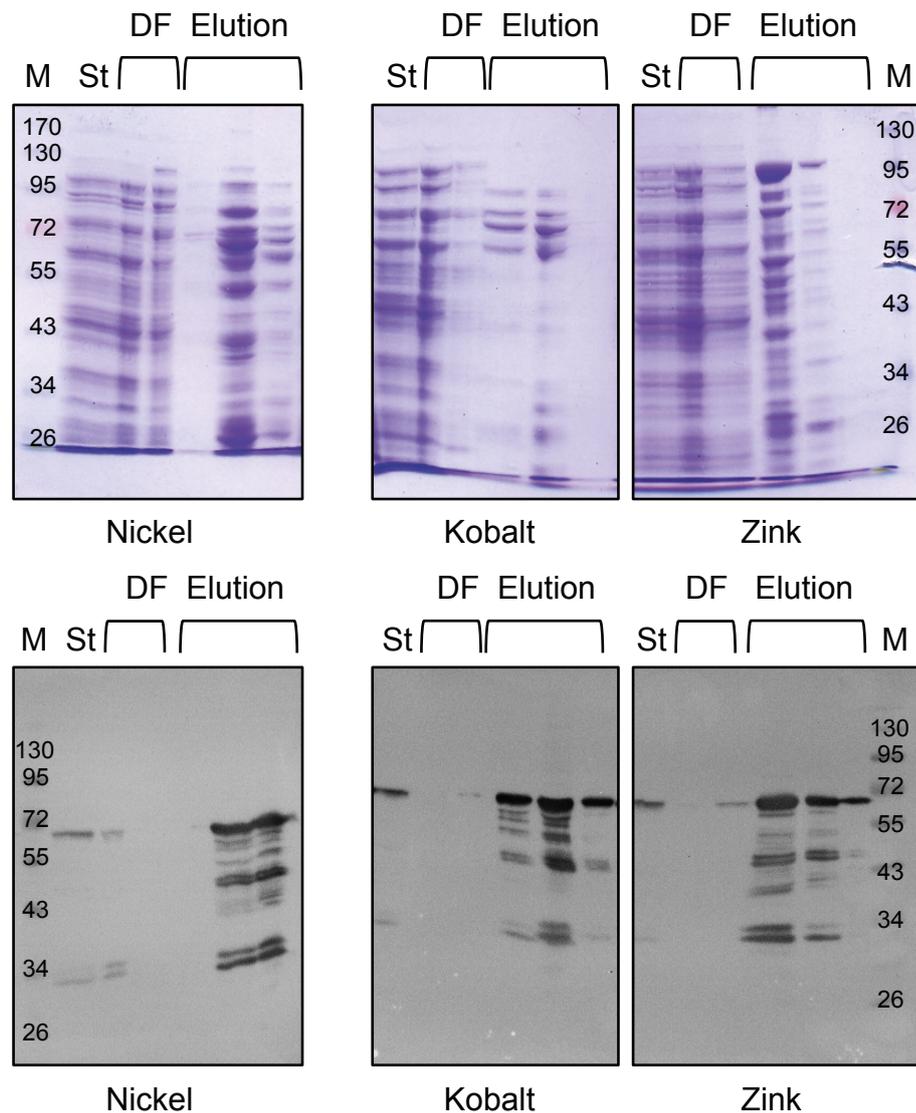


Abbildung 4.13 SDS-PAGE- und Western Blot Analyse der IMACs von $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ an mit Nickel-, Kobalt- und Zink-Ionen beladenen *HiTrapTM Chelating HP* Säulen. Die Zellen aus der Expression wurden in 10 mM Tris/HCl pH 8, 300 mM NaCl, 0,1 % Triton X-100, 20 % Glycerin und 1 mM PMSF resuspendiert und mittels Ultraschallwellen aufgeschlossen. Nach der Abtrennung der löslichen Proteine von den unlöslichen Zellbestandteilen und Proteinen mittels Ultrazentrifugation, wurden die Proteinrohextrakte (St) auf 1 ml *HiTrapTM Chelating HP* Säulen aufgetragen, die jeweils mit Nickel-, Kobalt- oder Zink-Ionen beladen wurden. Die Elution erfolgte in einer Stufe mit 250 mM Imidazol. M = Marker, DF = Durchfluss. Oben: Coomassie gefärbte SDS-PAGE, unten: Western Blot-Analyse unter Verwendung eines His-tag-Antikörpers.

Dazu wurden in einem ersten Schritt im kleinen Maßstab Chromatographien an 1 ml *HiTrapTM Chelating HP* Säulen durchgeführt, dessen Matrix jeweils mit Kobalt-, Nickel- und Zink-Ionen komplexiert wurde. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 250 mM Imidazol in einem Schritt. Die Bindekapazität und der Reinigungserfolg wurden anschließend mittels SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse ermittelt (Abbildung 4.13).

Die Startprobe entspricht einer Proteinmenge von 100 µg Gesamtprotein, zur Vergleichbarkeit wurde vom Durchfluss das gleiche Probenvolumen aufgetragen. Von allen weiteren Proben wurden 15 µl aufgetragen und analysiert. In der Western Blot-Analyse aller drei Chromatographien zeigen sich geringe Mengen des gewünschten Proteins im Durchfluss, sodass bei keiner Säule eine vollständige Bindung des Zielproteins an das Säulenmaterial stattfand. Auch die Intensitäten der Banden des Zielproteins in den Elutionsfraktionen ist bei allen verwendeten Säulen äquivalent. In Bezug auf gebundene Fremdproteine ergeben sich durch die verwendeten Säulen deutliche Unterschiede. Während die mit Nickel und Zink beladenen Säulen eine Reihe von Fremdproteinen in den Elutionsfraktionen ergaben, werden diese bei Beladung mit Kobalt-Ionen auf wenige Hauptproteine reduziert, es liegt demnach eine höhere Reinheit vor und die Proteinisolierung bietet mit dieser Säule einen deutlichen Vorteil gegenüber den anderen Säulen.

Um die Proteinisolierung weiter zu optimieren und die Anzahl der Fremdproteine zu reduzieren, wurde eine weitere IMAC mit einer mit Kobalt-Ionen beladenen 5 ml *HiTrapTM Chelating* Säule durchgeführt. Der Protein-auftrag erfolgte in Gegenwart von 10 mM Imidazol und die Elution des Proteins wurde stufenweise mit 50 mM, 125 mM und 250 mM Imidazol realisiert. Abbildung 4.14 zeigt das Ergebnis der SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der IMAC des Proteins $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt im Start und in den Durchflussproben ähnliche Bandenmuster. In der Western Blot-Analyse zeigt sich in der Startprobe eine Bande in der Höhe des Zielproteins von 66 kDa, im Durchfluss lässt sich kein Protein mittels His-tag-Antikörper detektieren. Demnach findet eine vollständige Bindung des Zielproteins an die Säule statt, während der Hauptteil der Fremdproteine nicht an die Säule bindet und somit bereits von dem Zielprotein getrennt wird. Bei der Elution mit 50 mM Imidazol zeigt sich eine geringe Menge von

$\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ in der Western Blot-Analyse, während in der SDS-PAGE-Analyse die Elution von vielen Fremdproteinen nachgewiesen wird.

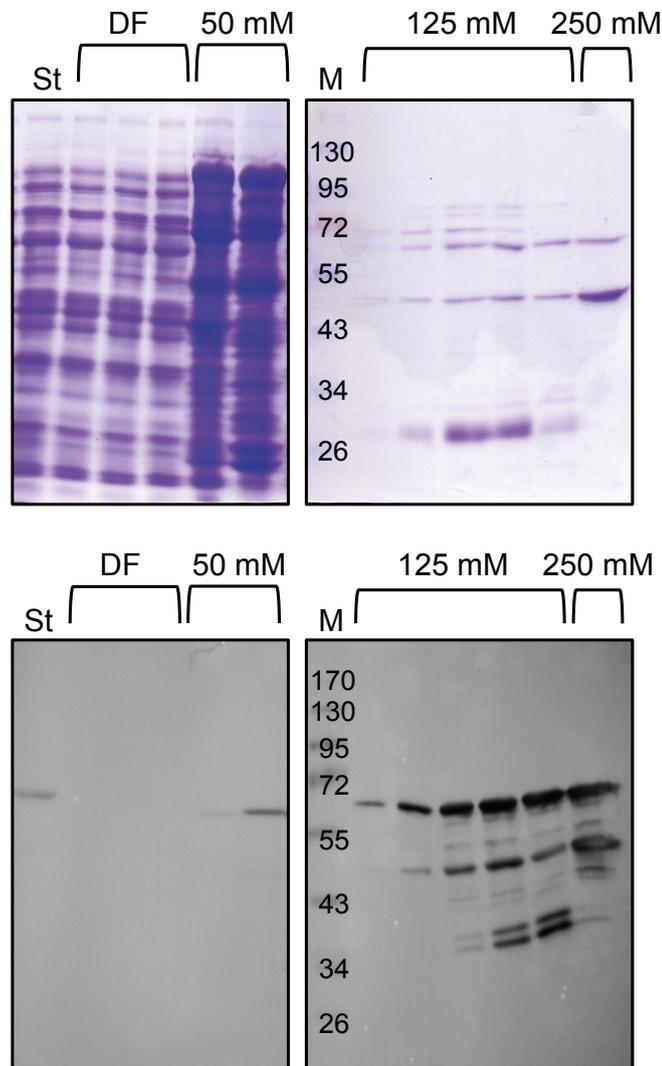


Abbildung 4.14 SDS-PAGE- und Western Blot-Analyse der IMAC von $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ an einer mit Kobalt-Ionen beladenen *HiTrapTM Chelating HP* Säule und Stufenelution. Das Protein wurde in Anwesenheit von 10 mM Imidazol auf das Säulenmaterial aufgetragen und in Stufen Eluiert. Die Angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Menge des für die Elution benötigten Imidazols. M = Marker, St = Startprobe, DF = Durchfluss. Oben: Coomassie gefärbte SDS-PAGE, unten: Western Blot-Analyse unter Verwendung eines His-tag-Antikörpers.

Zur Verbesserung der Reinheit wurde für folgende Versuche ein geringer Ausbeuteverlust mittels eines Waschschriffs mit 50 mM Imidazol hingenommen. Sowohl mit 125 mM als auch mit 250 mM Imidazol lassen sich Teile des Zielproteins eluieren, die Elution zeigt sich über einen großen Konzentrationsbereich von Imidazol. Während bei 125 mM Imidazol nur noch wenige Fremdproteine mittels SDS-PAGE-Analyse nachgewiesen werden, zeigt sich in der Elutionsfraktion mit höchster Imidazolkonzentration das homogene Protein $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ und vermutlich kleinere Fragmente in der Größe von ca. 50 kDa und 30 kDa.

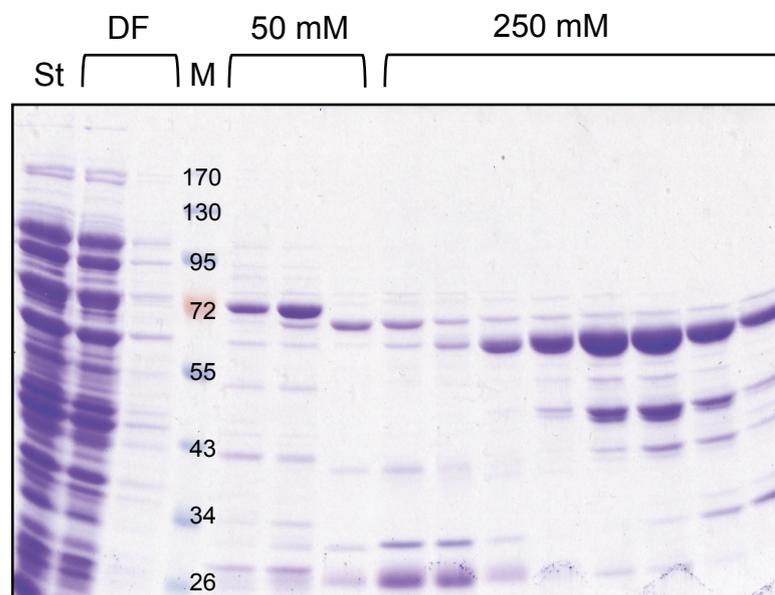


Abbildung 4.15 SDS-PAGE Analyse der IMAC von $\Delta 65\text{-ncu07684-10xHis}$ an einer mit Kobalt-Ionen beladenen *HiTrapTM Chelating HP* Säule und Stufenelution. Die Bakterienzellen wurden hier in 20 mM Tris/HCl, 300 mM NaCl und 0,1 % Triton X-100 resuspendiert und aufgeschlossen. Die stufenweise Elution erfolgte im gleichen Puffer mit Zugabe von 250 mM Imidazol. M = Marker, St = Startprobe, DF = Durchfluss. Die angegebenen Konzentrationen beziehen sich auf die Menge des für die Elution benötigten Imidazols.

Zur Optimierung der Reinheit und besseren Bindung des Proteins an die Affinitätssäule, wurde ein Konstrukt kloniert, das die Expression des Proteins

mit einem C-terminalen 10x-His-*tag* ermöglicht. Die Expression und Proteinisolierung erfolgte analog zu den hier bisher beschriebenen Protokollen. Abbildung 4.15 zeigt die SDS-PAGE-Analyse der Proteinisolierung von $\Delta 65\text{-ncu07684-10xHis}$. Der Probenauftrag erfolgte in Gegenwart von 20 mM Imidazol, sodass die Bindung eines Großteils der Fremdproteine aus dem Zelllysat verhindert wurde, wie sich beim Vergleich von Start- und Durchflussprobe zeigt. Mit einer Stufenelution mit 50 mM Imidazol können weitere Fremdproteine, die an die Säule gebunden haben, entfernt werden. Die abschließende Elution des Proteins mit 250 mM Imidazol zeigt eine intensive Bande in der Höhe von 67 kDa, was der Größe des Zielproteins entspricht. Zu dem Zielprotein lassen sich weitere Fremdproteine bzw. Fragmente des Proteins nachweisen.

Die anschließende Größenausschlusschromatographie unter den bisher verwendeten Pufferbedingungen zeigte den Großteil des Proteins im Ausschlussvolumen, sodass eine Neigung des Proteins zur Aggregation vermutet wurde. Zur Vermeidung der Aggregation sollten die Pufferbedingungen bei der Proteinisolierung optimiert werden. Da die Bindungsaffinität des Polyhistidin-*tags* an Metallionen bei pH 8 ($K_d = 10^{-13}$ für 6 x His mit Ni^{2+} -NTA) maximal ist (Schmitt *et al.* 1993), wurde von einer Änderung der Pufferbedingungen bei Bindung an die Säule abgesehen und nur bei Elution des Proteins ein anderer Puffer gewählt. Dazu wurden sieben unterschiedliche Puffer mit verschiedenen pH-Werten von 4 bis 10 jeweils mit 50 und 500 mM NaCl verwendet (Tabelle 4.3).

Bei der IMAC zeigten sich in der Western-Blot-Analyse erst ab einem pH-Wert von 7 sichtbare Mengen des Proteins, sodass davon ausgegangen wurde, dass das Protein in niedrigeren pH-Werten so instabil ist, dass es ausfällt. Die Elutionsfraktionen bei pH 9 und 10 zeigten nicht nur die größten Protein-ausbeuten, sondern auch eine Verringerung der Fremdproteine (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tabelle 4.3 zur Elution von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis verwendete Puffer

Puffer	pH-Wert	NaCl-Konzentration
20 mM Natriumacetat	4	50 mM
20 mM Natriumacetat	4	500 mM
20 mM Natriumcitrat	5	50 mM
20 mM Natriumcitrat	5	500 mM
20 mM MES	6	50 mM
20 mM MES	6	500 mM
20 mM Natriumphosphat	7	50 mM
20 mM Natriumphosphat	7	500 mM
20 mM Tris	8	50 mM
20 mM Tris	8	500 mM
20 mM Bicine	9	50 mM
20 mM Bicine	9	500 mM
20 mM CAPS	10	50 mM
20 mM CAPS	10	500 mM

Abbildung 4.16 zeigt die SDS-PAGE-Analyse und die zugehörige Western Blot-Analyse der IMAC von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis mit Elution bei pH 9. Zu den bisherigen Proteinisolierungen wurden einige Maßnahmen verändert. Aufgrund der Eigenabsorption und damit auftretenden Schwierigkeiten bei Proteinpräparationen sowie nachfolgenden Größenausschlusschromatographien wurde auf die Verwendung von Triton X-100 verzichtet. Da Bicine-Puffer Komplexe mit Metall-Ionen wie dem hier verwendeten Kobalt eingeht (Nakon und Krishnamoorthy 1983) und demnach ein störender Effekt bei der IMAC vermutet wurde, wurde der Puffer zu Glycin gewechselt. Zur Verhinderung der Bindung von Fremdproteinen aufgrund von ionischen Wechselwirkungen wurde die Menge des NaCl auf 1 M erhöht. Die SDS-PAGE-Analyse zeigt im Start und im Durchfluss eine Reihe von Proteinen mit einem ähnlichen Bandenmuster, sodass davon ausgegangen werden kann, dass ein Großteil der Fremdproteine nicht an die Säule bindet. In der zugehörigen Western Blot-Analyse ist nur eine Bande in der gesuchten Größe von 67 kDa in der Startprobe zu sehen, demnach findet eine vollständige Bindung des Proteins an die Säule statt.

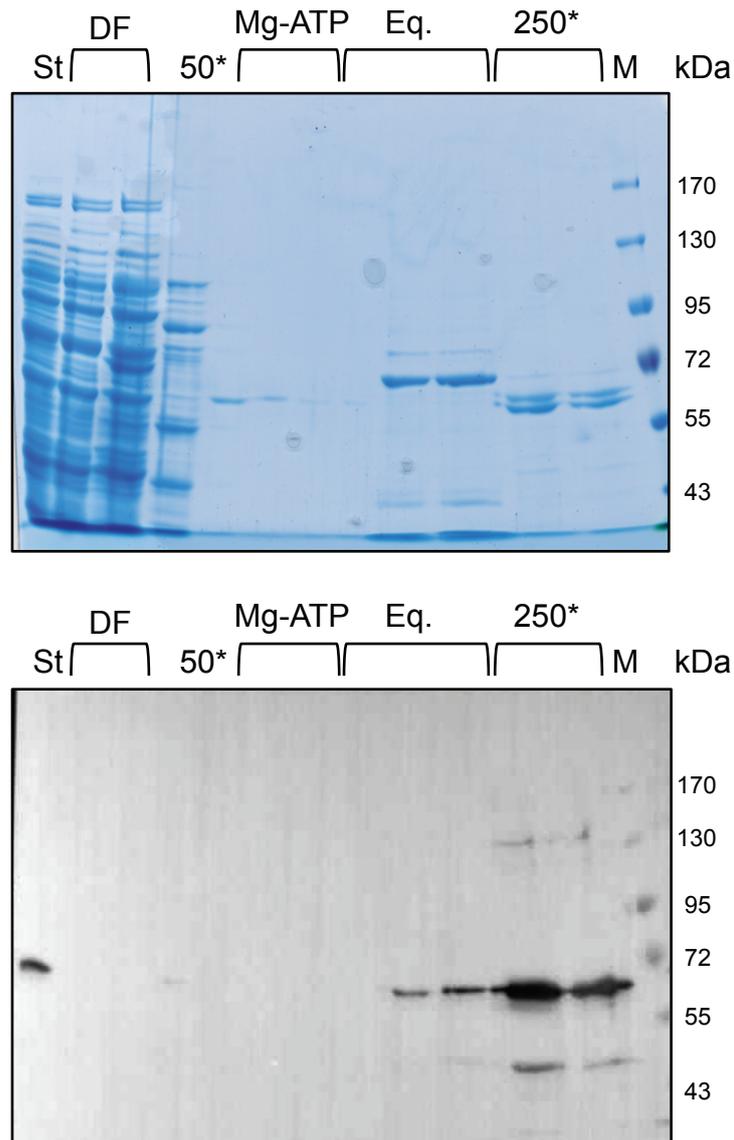


Abbildung 4.16 SDS-PAGE-Analyse und zugehöriger Western Blot der IMAC von $\Delta 65\text{-ncu07684-10xHis}$ mit Elution bei pH 9. Die Zellen wurden in 10 mM Tris/HCl pH 8 und 300 mM NaCl resuspendiert und mittels Ultraschallwellen aufgeschlossen. Nach Ultrazentrifugation wurde der lösliche Überstand auf eine 5 ml *HiTrapTM Chelating HP* Säule, die mit Kobalt-Ionen beladen wurde, in Gegenwart von 20 mM Imidazol aufgetragen. Es folgte ein Waschschrift mit 50 mM Imidazol und ein weiterer mit Magnesiumchlorid und ATP (Mg-ATP). Anschließend wurde die Säule mit 50 mM Glycin pH 9 und 1 M NaCl äquilibriert (Eq.) und im gleichen Puffer in Gegenwart von 250 mM Imidazol eluiert. Zur Visualisierung wurde ein His-*tag*-Antikörper verwendet. St = Startprobe, DF = Durchfluss, * Konzentration von Imidazol in mM, M = Marker

Ein Waschschrift mit 50 mM Imidazol sowie mit Magnesiumchlorid und ATP entfernt weitere Fremdproteine bzw. mögliche Chaperone. Bei 50 mM Imidazol ist in der Western Blot-Analyse eine zarte Bande zu erkennen, es gibt einen minimalen Verlust des Zielproteins. Durch die Äquilibrierung mit dem Puffer mit pH 9 werden sowohl Fremdproteine als auch geringe Mengen des Zielproteins eluiert, sodass mit 250 mM Imidazol das Zielprotein mit einem weiteren Protein in ungefähr gleich großen Anteilen eluiert wird. Mittels Massenspektrometrie durch das Biologisch-Medizinische-Forschungs-zentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität wurde die obere Bande als das Zielprotein $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis verifiziert und die untere Bande als Chaperonin GroEL aus *E. coli* identifiziert.

Obwohl durch die optimierte Proteinisolierung eine erhöhte Reinheit des Proteins erzielt werden kann, so bleiben die Probleme bei der anschließenden Größenausschlusschromatographie auch unter den neuen Pufferbedingungen bestehen, sodass der Hauptteil des Proteins im Ausschlussvolumen eluiert (Ergebnisse nicht gezeigt).

Die Elutionsfraktionen aus der IMAC wurden vereinigt und zur Analyse der Proteine in nativer Form wurde eine Blau Nativ-PAGE-Analyse mit einem kontinuierlichen 4-16 % Bis-Tris Gel durchgeführt (Abbildung 4.17). Die Visualisierung der Banden erfolgte mittels Coomassie-Färbung.



Abbildung 4.17 Blau Nativ-PAGE der Elutionsfraktionen der IMAC

Die Blau Nativ-PAGE-Analyse zeigt drei dominante Banden im oberen Bereich des Gels, welches Proteine mit großen Molekulargewichten enthält. Da kein

Protein in den Taschen des Gels zurückgeblieben ist, kann die Aggregation eines der Proteine ausgeschlossen und die Oligomerisierung der einzelnen Proteine zu Homo- oder Heterooligomeren vermutet werden.

4.4.2 Proteinisolierung von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$

Die Proteinisolierung von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ erfolgte in Zusammenarbeit mit Galle (2013) an einer 5 ml *HiTrapTM Chelating HP* Säule, die zuvor mit Nickel-Ionen beladen wurde.

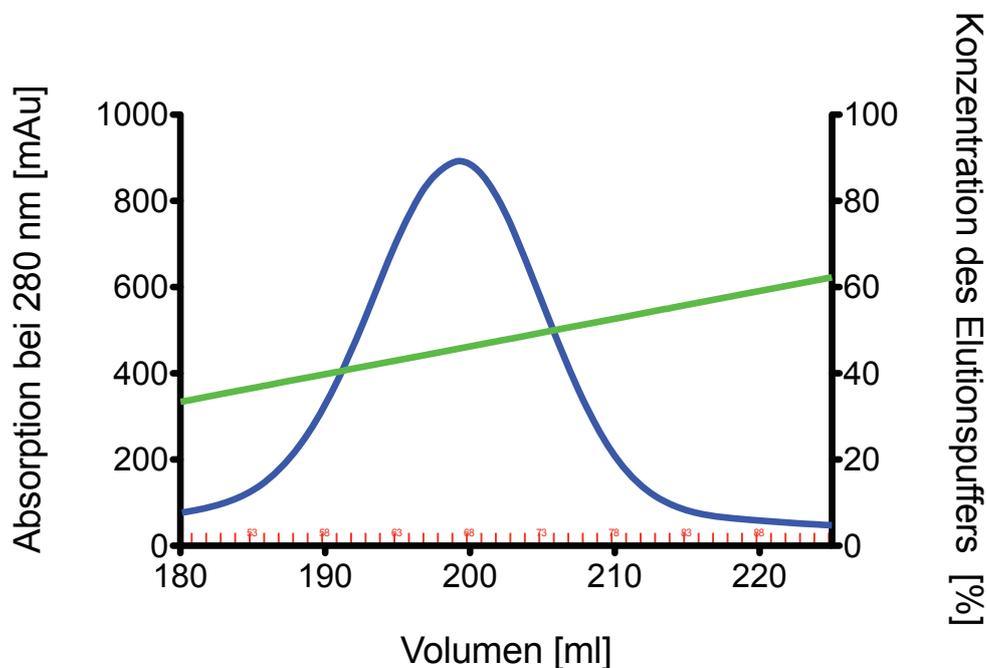


Abbildung 4.18 Auszug aus dem Chromatogramm der IMAC von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ an einer mit Nickel-Ionen beladenen *HiTrapTM Chelating HP* Säule und Gradientenelution. Die Bakterienzellen wurden in 10 mM Tris/HCl pH 7,9 und 300 mM NaCl resuspendiert, mittels Ultraschallwellen aufgeschlossen und mittels Ultrazentrifugation wurden die löslichen Proteine von den unlöslichen Zellbestandteilen separiert. Der Probenauftrag erfolgte in Anwesenheit von 25 mM Imidazol. Anschließend wurde die Elution des Proteins mittels Gradienten auf 100% innerhalb von 140 ml realisiert. Blau = UV-Absorption bei 280 nm in mAu, grün = Konzentration des Elutionspuffers in %, rot = Fraktionseinteilung

Abbildung 4.18 zeigt ein repräsentatives Elutionsprofil der IMAC von $\Delta 95$ -ncu06461-His. Die blaue Kurve stellt den spektrometrischen Nachweis der Proteine mittels UV-Absorption dar und die grüne Kurve gibt die Konzentration des Elutionspuffers an. In rot ist die Fraktionierung der Elutionsproben angegeben. Die Gradientenelution des Proteins erzeugte ein einheitliches und reproduzierbares Profil mit einem homogenen und symmetrischen Proteingipfel. Das Absorptionsmaximum von 892 mAU erscheint bei einer Konzentration des Elutionspuffers von 46 % und entspricht einer Imidazolkonzentration von 115 mM.

Die in dem Chromatogramm angegebenen Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE-Analyse auf ihre Proteinkomposition untersucht (Abbildung 4.19). Die zugehörige SDS-PAGE-Analyse zeigt eine deutliche Proteinbande in der Größe des Zielproteins von 93 kDa. Die intensivsten Signale treten im Bereich des Proteingipfel-Maximums auf, sodass der Proteingipfel eindeutig dem Protein $\Delta 95$ -ncu06461-His zugeordnet werden kann. Es zeigen sich nur wenige zusätzliche Banden in geringen Mengen.

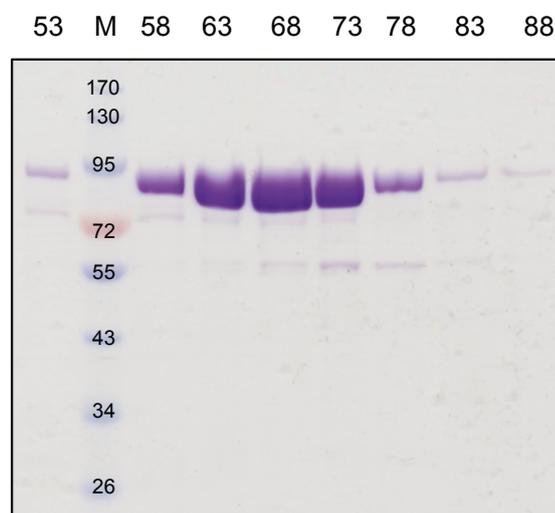


Abbildung 4.19 Coomassie gefärbte SDS-PAGE der IMAC von $\Delta 95$ -ncu06461-His an einer mit Nickel-Ionen beladenen *HiTrapTM Chelating HP* Säule und Gradientenelution. M = Marker

Die meisten Techniken zur Proteincharakterisierung erfordern eine hohe Homogenität des Proteins. Die Analyse der Proteinhomogenität erfolgte in unterschiedlichen Puffern mit verschiedenen pH-Werten und Natriumchlorid-Konzentrationen.

Dazu wurde das isolierte Protein im Anschluss an die IMAC einem Stabilitätstest unterzogen. Die Proteinanalyse erfolgte anschließend mittels Größenausschlusschromatographie. Tabelle 4.4 zeigt das Ergebnis des Stabilitätstest in den verschiedenen Pufferbedingungen nach 12-tägiger Lagerung der Proben bei 4°C.

Tabelle 4.4 Stabilitätstest von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ in unterschiedlichen Pufferbedingungen und Lagerung bei 4°C für 12 Tage

Puffer	NaCl-Konzentration	Konzentration nach Zentrifugation [mg/ml]
100 mM MES pH 6	50 mM	0,96
100 mM MES pH 6	300 mM	1,95
100 mM Phosphat pH 7	50 mM	2,27
100 mM Phosphat pH 7	300 mM	2,24
100 mM Tris pH 8	50 mM	2,29
100 mM Tris pH 8	300 mM	2,3
100 mM Bicine pH 9	50 mM	2,31
100 mM Bicine pH 9	300 mM	2,4

Das Proteine wurde in Aliquots von 200 μl mit den verschiedenen Puffern im Verhältnis 1/10 verdünnt. Nach Lagerung bei 4°C wurden die Proben bei 14.000 rpm für mindestens 30 Minuten zentrifugiert (Tischzentrifuge Eppendorf 5417 R) und die Proteinkonzentration im Überstand bestimmt.

Es lassen sich minimal geringere Proteinkonzentrationen mit Verringerung des pH-Wertes erkennen, wobei die bestimmte Proteinkonzentration bei pH 6 mit geringer Salzkonzentration am geringsten ist. Ein genereller Salzeffekt lässt sich nicht feststellen.

Die Überstände wurden mittels analytischer Größenausschlusschromatographie über das Elutionsprofil auf ihre Homogenität untersucht (Abbildung 4.20).

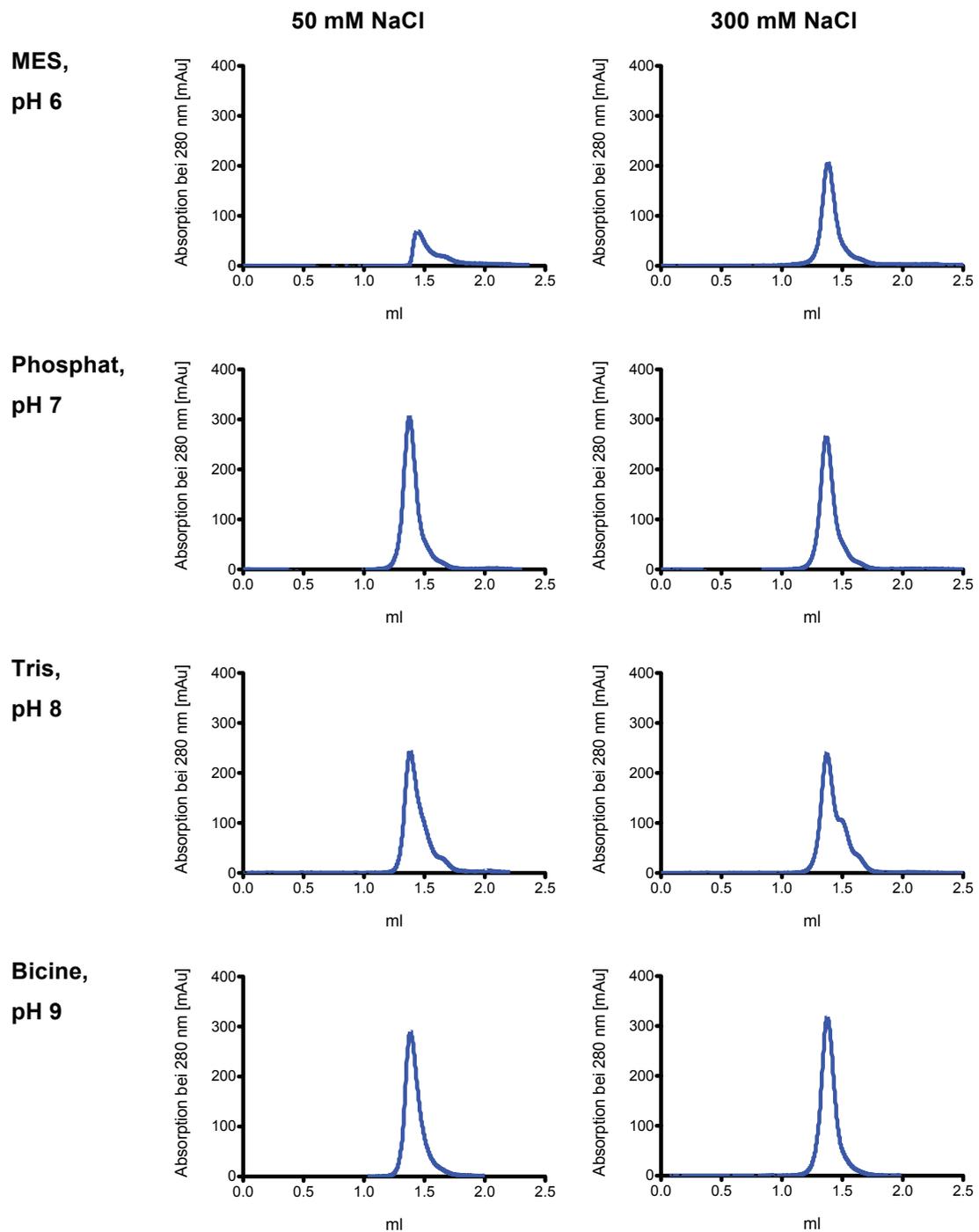


Abbildung 4.20 Analytische Größenausschlusschromatographie von $\Delta 95$ -ncu06461-His in unterschiedlichen Pufferbedingungen. Dazu wurden die Überstände aus dem Stabilitätstest nach Lagerung der Proteine bei 4°C für 12 Tage verwendet und auf eine Superdex 200 PC 3.2/30 Säule aufgetragen und analysiert.

Die Analyse zeigte mit fast allen pH-Werten und Puffern symmetrische Proteingipfel, mit Ausnahme von pH 6 und 50 mM NaCl sowie pH 8 mit geringer und hoher NaCl-Konzentration, die jeweils Schultern im Bereich kleinerer Proteingrößen aufwiesen. Die Retentionsvolumina unterschieden sich nur geringfügig und lagen zwischen 1,37 und 1,38 ml. Das Chromatogramm des Puffers bei pH 6 und geringer NaCl-Konzentration bildete dabei wiederholt eine Ausnahme, hier wurde das Protein erst mit einem Retentionsvolumen von 1,44 ml eluiert. In keinem der Chromatogramme wurden Aggregate im Ausschlussvolumen detektiert, vermutlich wurden diese durch die Zentrifugation bereits als unlösliche Präzipitate abgetrennt.

Die Absorptionsmaxima spiegeln grundsätzlich die gemessenen Proteinkonzentrationen wieder, mit steigendem pH-Wert, lassen sich auch höhere Absorptionsmaxima detektieren. Die Ausnahme bilden beide Chromatogramme mit pH 8. Es ist zu vermuten, dass das Protein in diesem Puffer zu kleineren Fragmenten abgebaut wird. Die Gesamtproteinkonzentration bleibt ähnlich und es zeigt sich eine Schulter im Chromatogramm. Die Verschiebung des Retentionsvolumens und die Abnahme des Absorptionsmaximums bei pH 6 und geringer NaCl-Konzentration spricht für das gleiche Phänomen.

Parallel zur Variation der pH- und Salzbedingungen wurden unterschiedliche Additive untersucht. Dabei zeigte sich ein positiver Einfluss auf die Proteinstabilität bei Zugabe von Xylitol zu allen Puffern (Ergebnisse nicht gezeigt).

Für nachfolgende Versuche wurde im Anschluss an die IMAC mittels PD10-Säule ein Puffertausch in 100 mM Bicine pH 9, 50 mM NaCl und 0,2 M Xylitol durchgeführt und das Protein in Aliquots bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert. Abbildung 4.21 zeigt die analytische Größenausschlusschromatographie von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ in dem oben genannten Puffer einer aufgetauten Probe. Das Chromatogramm zeigt einen symmetrischen Proteingipfel mit einem Retentionsvolumen von 1,41 ml und keine Hinweise auf aggregierte Proteine im Ausschlussvolumen von ca. 0,9 ml, die Lagerung des Proteins bei -70°C hat somit keinen negativen Effekt auf die Stabilität des Proteins.

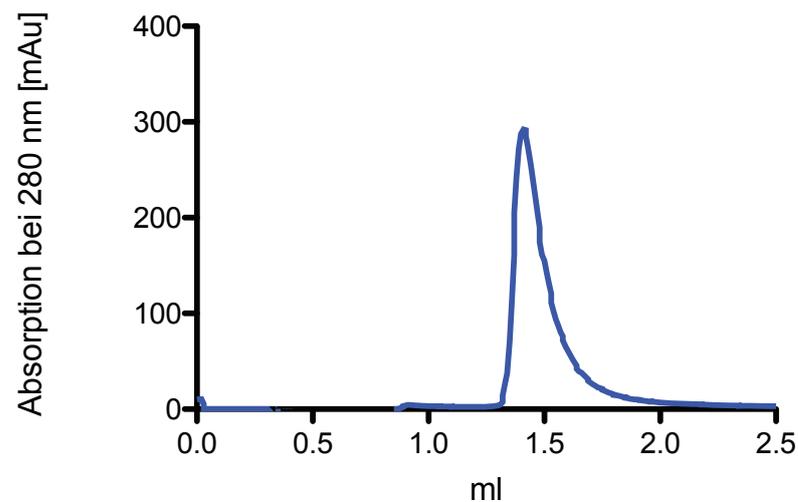


Abbildung 4.21 Analytische Größenausschlusschromatographie von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ in 100 mM Bicine pH 9, 50 mM NaCl und 0,2 M Xylitol. Die Analyse erfolgte mit einer Superdex 200 PC 3.2/30 Säule.

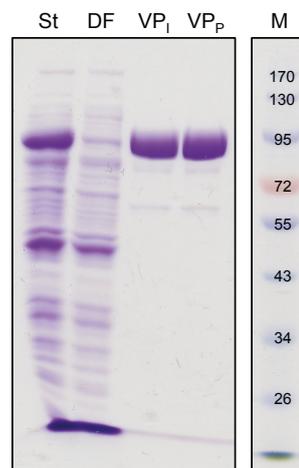


Abbildung 4.22 SDS-PAGE-Analyse der Proteinisolation von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ im Überblick. St = Startprobe, DF = Durchfluss der IMAC, VP_I = Vereinte Proben nach IMAC, VP_P = Vereinte Proben nach PD10 Säule, M = Marker

Abbildung 4.22 zeigt abschließend eine SDS-PAGE-Analyse des Proteins nach den einzelnen Isolierungsschritten. Während das Zelllysat in der Startprobe neben dem Zielprotein im Überschuss eine Vielzahl von Fremdproteinen aufweist, so wird ein Großteil der Fremdproteine bei der IMAC bereits im

Durchfluss entfernt. Die vereinten Proben nach der IMAC weisen nahezu homogen isoliertes Protein auf, das nur geringe Mengen an weiteren Proteinen in der Größe von ca. 60 kDa und ca. 80 kDa enthält.

4.5 Charakterisierung von $\Delta 95$ -ncu06461-His

Nach erfolgreicher Präparation, sollte die Charakterisierung der PPR-Proteine erfolgen. Aufgrund von ungenügender Homogenität und Stabilität des Proteins $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis wurde die Charakterisierung des PPR-Proteins $\Delta 95$ -ncu06461-His bevorzugt und weiter verfolgt. Die Charakterisierung des Proteins erfolgte mittels verschiedener Verfahren. Dabei sollten insbesondere Informationen über Größe, Struktur und Funktion ermittelt werden.

4.5.1 Bestimmung der molekularen Masse

Die Bestimmung der molekularen Masse in nativer Form erfolgte mittels Größenausschlusschromatographie in Kombination mit statischer Lichtstreuung und Massenspektrometrie. Aus den Gesamtmassen lassen sich Informationen auf die Homogenität und die nichtkovalente Assoziation von Proteinen zu Komplexen ableiten, welche wichtige Hinweise für Stabilität und Funktion haben können.

Die Größenausschlusschromatographie wurde an einer ÄKTA Purifier mit einer Superose 6 10/300 Säule in 20 mM Tris/HCl pH 7,9 und 300 mM NaCl durchgeführt. Das Protein zeigt eine homogene Elution mit einer molekularen Masse von 95,5 +/- 0,3 kDa und bildet demnach unter den gewählten Bedingungen eine monomere Spezies (Abbildung 4.23) in Abwesenheit von Proteinaggregaten.

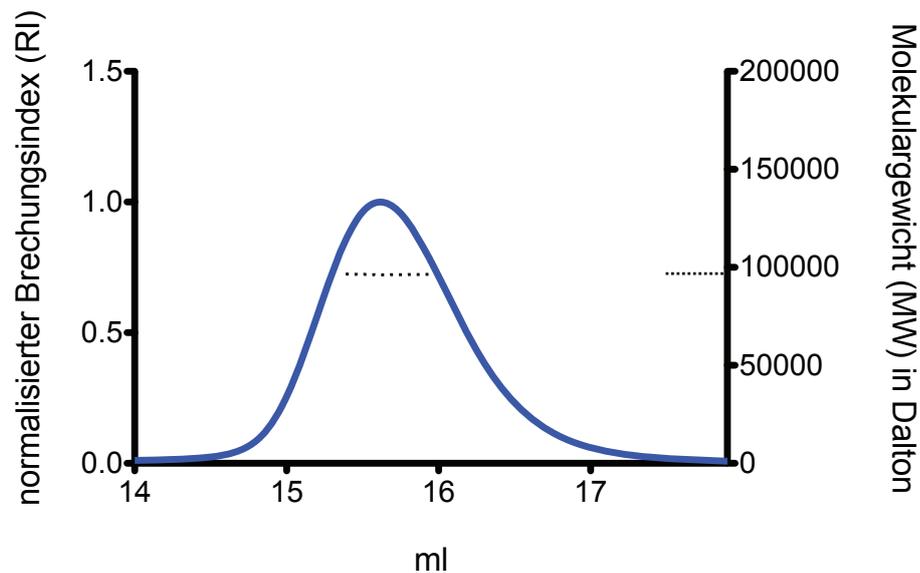


Abbildung 4.23 Größenausschlusschromatographie und statische Lichtstreuungsanalyse von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$. Blau: Brechungsindex (RI), schwarz: Molekulargewicht (MW)

Mittels Massenspektrometrie können neben der Bestimmung der Masse auch Aussagen über die Reinheit sowie die Identität des Proteins gemacht werden. Die Analyse erfolgte mittels MALDI-TOF durch das Biologisch-Medizinische-Forschungszentrum (BMFZ) der Heinrich-Heine-Universität (Abbildung 4.24). Das Protein wurde im Anschluss an die Größenausschlusschromatographie über Nacht gegen Wasser dialysiert und der Überstand nach Zentrifugation als intaktes Protein analysiert. Die Dekonvolution ergab einen einzigen einheitlichen Gipfel mit einer kleinen Schulter zur rechten Seite hin, mit einem kleinen Gipfel bei kleineren Molekulargewichten, sodass von einer hohen Reinheit des Proteins ausgegangen werden kann. Die Schulter ist vermutlich auf eine leichte Oxidation des Proteins im Laufe der Reinigung zurückzuführen. Der kleine Gipfel links des Hauptgipfels könnte auf kleinere Proteinfragmente oder höher ionisierte Proteine hinweisen, die möglicherweise noch NaCl-Reste beinhalten. Der Gipfel entspricht einem Molekulargewicht von 93213 Da, was mit der kalkulierten Masse von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ (93212 Da) übereinstimmt. Für die Messung ergab sich eine Genauigkeit von ± 1 Da. Durch die Isolierungsprozedur ergibt sich demnach kein Proteinabbau. Mittels

enzymatischem Verdau und anschließender Sequenzierung der Peptide wurde das Protein als $\Delta 95$ -ncu06461-His verifiziert.

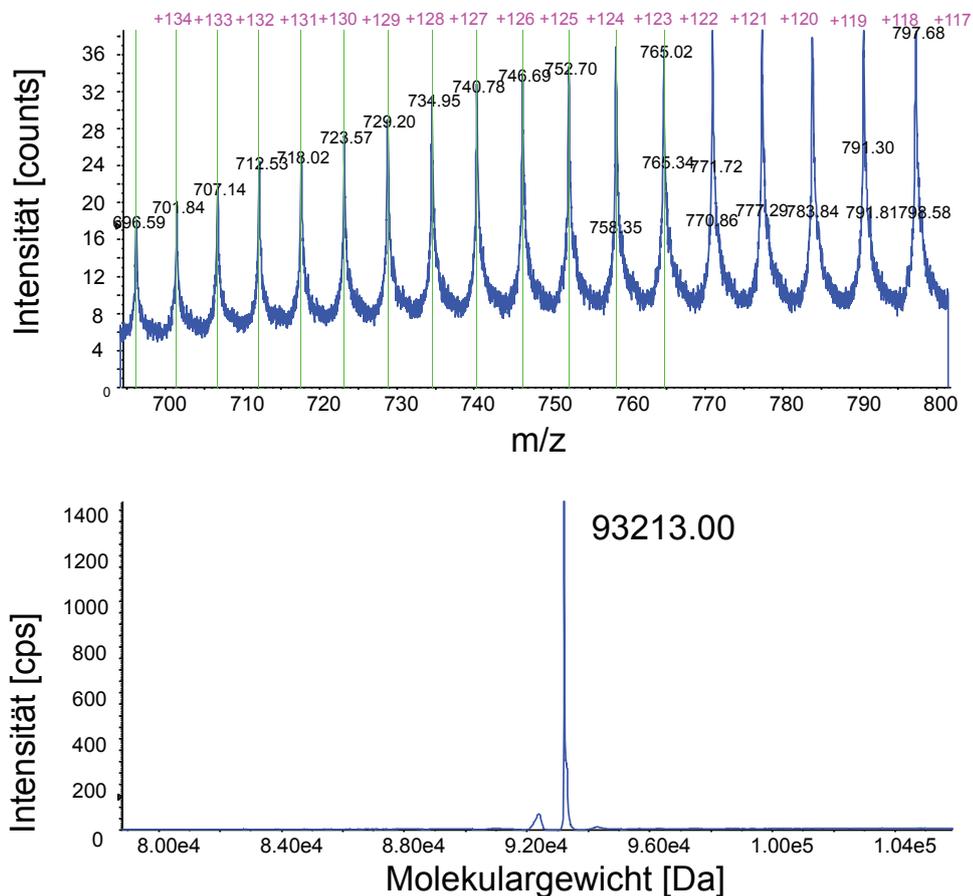


Abbildung 4.24 Massenspektrometrische Analyse der Elutionsfraktion von $\Delta 95$ -ncu06461-His mittels MALDI-TOF. Oben: Ausschnitt aus der Masse-Ladungsverteilung. Die pinken Zahlen über den Ausschlägen geben den Ladungszustand wieder. Unten: Dazugehörige Dekonvolution.

4.5.2 Bestimmung der Proteinstruktur

Bis zum heutigen Tage wurden nur wenige Strukturen von PPR-Proteinen gelöst. Die Strukturaufklärung von $\Delta 95$ -ncu06461-His mittels Röntgenstrukturanalyse könnte helfen, mehr Verständnis über die Funktionalität des Proteins zu erhalten. Es wurden Kristallisationsversuche in Zusammenarbeit mit der

Crystal and X-Ray Facility der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt. Dazu wurde das Protein nach der IMAC in 10 mM Tris/HCl und 300 mM NaCl mittels PD10-Säule überführt, mit dem gleichen Volumen einer 2 M Saccharoselösung zur Erhöhung der Stabilität versetzt und auf eine Proteinkonzentration von 23 mg/ml eingeeengt. Die Proteinlösungen wurden im Verhältnis 1/1 mit der Reservoir-Lösung aus den Kristallisations-*screens* versetzt. Mittels Gasphasendiffusion in der *sitting-drop*-Methode und Inkubation bei 18°C wurden unter zwei Bedingungen Kristalle erzeugt. Durch Absorption von UV-Licht bei 280 nm wurde verifiziert, dass es sich dabei um Proteinkristalle handelte (Abbildung 4.25).

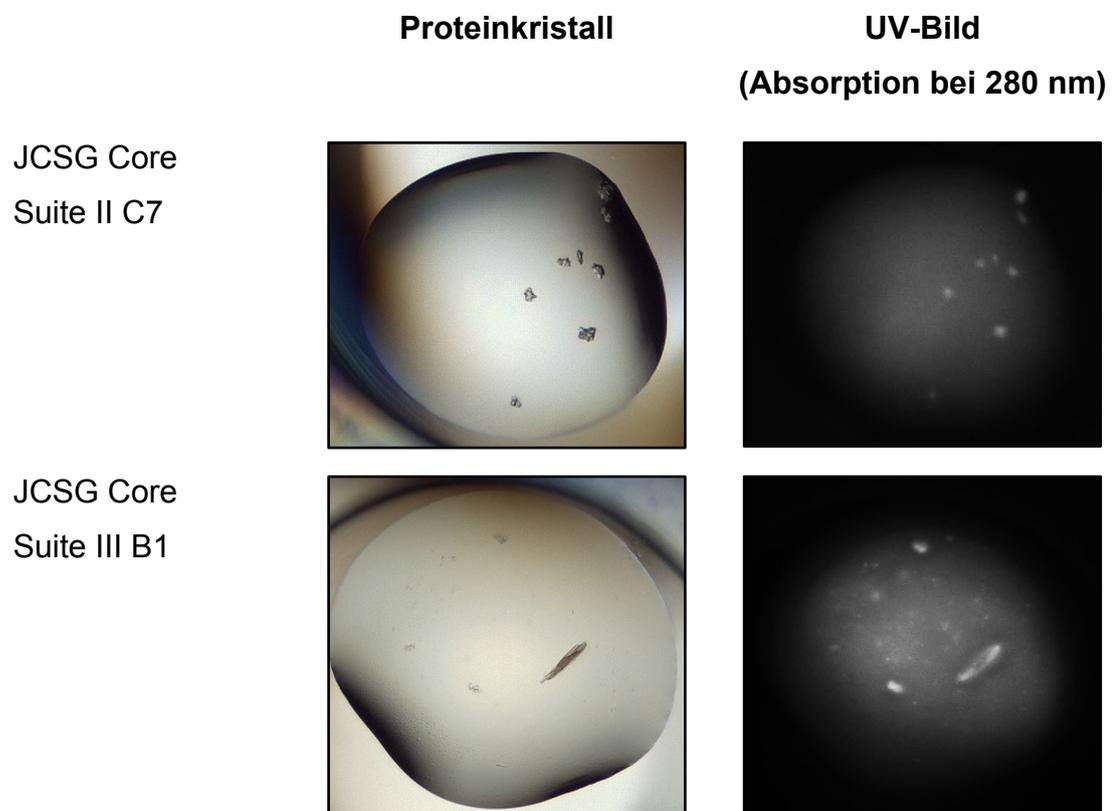


Abbildung 4.25 Proteinkristalle von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$. Oben: Bedingung JCSG Core Suite II C7. Unten: Bedingung: JCSG Core Suite III B1. Links: Proteinkristall, rechts: UV-Bild (Absorption bei 280 nm)

In Zusammenarbeit mit Reus (2014) und Schmidt (2014) wurde versucht, die Kristallisationsbedingungen zu optimieren und weitere Bedingungen zu finden, bei denen die Kristallisation des Proteins begünstigt ist.

Der Zusatz von 1 M Saccharose zu der Proteinlösung, welche für die Kristallisation eingesetzt wurde, wirkte sich förderlich auf die Proteinstabilität aus. Die Zugabe von Calcium- bzw. Strontiumchlorid bewirkte weder die Kristallisation noch die eindeutige Stabilisierung des Proteins. Unter den Bedingungen mit einer Proteinkonzentration von 21 mg/ml in Anwesenheit von 1 M Saccharose, 15 mM SrCl₂ und 25 % Ethylenglycol wurden Quasikristalle erhalten (Reus 2014).

Durch Veränderung der Pufferkomposition der Proteinlösung, bevor sie zur Kristallisation eingesetzt wurde, wurden weitere Quasikristalle erhalten. In 100 mM Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7 und 50 mM NaCl, wurden mit 0,2 M Lithiumsulfat, 0,1 M Tris mit einem pH-Wert von 8,5 und 40 % PEG, sowie mit 1 M Lithiumchlorid, 0,1 M Tris mit einem pH-Wert von 8 und 20 % PEG 6000 Quasikristalle erhalten. Das Protein bildete in 20 mM Bicine mit einem pH-Wert von 9 und 300 mM NaCl Quasikristalle in der Bedingung mit 0,2 M Tri-Natriumcitrat, 0,1 M Tris mit einem pH-Wert von 8,5 und 30 % PEG 400 (Schmidt 2014).

Bis zum heutigen Tage wurden keine Proteinkristalle erzeugt, die mittels Röntgendiffraktion untersucht werden konnten.

4.5.3 Bestimmung der Funktion

In vorangegangenen Arbeiten wurde gezeigt, dass die Deletion des PPR-Proteins ncu06461 zu einer defekten Assemblierung des Komplex I führt. Es wurde postuliert, dass das Protein an der Prozessierung des dicistronischen mitochondrialen mRNA-Transkripts der Komplex-I-Untereinheiten ND1-ND4 beteiligt ist (Solotoff 2011). Um eine direkte Interaktion zwischen der RNA und dem Protein *in vitro* zu untersuchen, wurden in dieser Arbeit elektrophoretische Mobilitäts *Shift Assays* (EMSA) bzw. Retardierungsanalysen mit [5'-³²P]pCp markierter RNA durchgeführt. Diese beruhen auf der Retardierung von RNA-Fragmenten im elektrischen Feld bei Komplexbildung mit Protein. Um diese Retardierung als Bandenverschiebung im Gel wahrnehmen zu können, bedarf es einer Aufteilung der potentiellen Bindungsregion zu maximal 500 Basen

großen Fragmenten. Die Herstellung von RNA erfolgte mittels *in-vitro*-Transkription. Dazu wurden die entsprechenden DNA-Vorlagen in einen mit T7-Promotor modifizierten pUC18-Vektor integriert und die RNA wurde mithilfe der RNA Polymerase synthetisiert.

Es wurden 18 Fragmente erhalten, die jeweils einen überlappenden Bereich mit angrenzenden Fragmenten enthalten und alphabetisch benannt wurden. Tabelle 4.5 gibt einen Überblick über die erstellten Fragmente, deren Größe und Lokalisierung im mitochondrialen Genom. Von den Fragmenten A, T, U und X wurden keine Konstrukte als Vorlage für die RNA-Synthese erhalten, sodass hiermit keine Interaktion untersucht werden konnte.

Tabelle 4.5: RNA-Fragmente

Fragment	Größe [b]	Lokalisierung im mitochondrialen Genom
A	244	54526 – 54767
B	325	54262 - 54583
C	287	54003 - 54286
D	470	53562 – 54031
E	355	53232 – 53583
G	405	52868 – 53269
H	444	52447 – 52887
I	464	52157 – 52617
K	121	52082 - 52200
L	465	51640 – 52101
M	402	51276 - 51674
O	302	51002 – 51300
P	467	50568 – 51031
R	382	50215 – 50593
S	289	50016 – 50300
T	341	49715 – 50052
U	312	49428 – 49736
X	357	49170 - 49523

Zu Beginn wurden die Analysen in den bevorzugten, standardisierten Polyacrylamid-Gelen durchgeführt, jedoch stellte sich heraus, dass die

möglichen RNA-Proteinkomplexe in der Tasche des Gels verblieben und nicht in das Gel hineinwanderten. Da dieser Effekt bereits ohne Zugabe von RNA erfolgte, ist nicht davon auszugehen, dass die gebildeten Komplexe zu groß für das Gelsystem waren, sondern eher von einer Proteinaggregation herrührten. Die Änderungen der Pufferbedingungen für den Reaktionsansatz als auch für das Polyacrylamidgel, sowie die Absenkung der Reaktionstemperatur durch Inkubation auf Eis und die Elektrophorese bei 4°C führte zu keinen beständigen Verbesserungen. Erst die Umstellung auf Agarosegele führte unter Zugeständnissen in der Bandenschärfe zu erfolgreichen Retardierungsgelen. Abbildung 4.26 zeigt das Autoradiogramm der Retardierungsanalyse von Fragment G ohne Zugabe von Heparin.

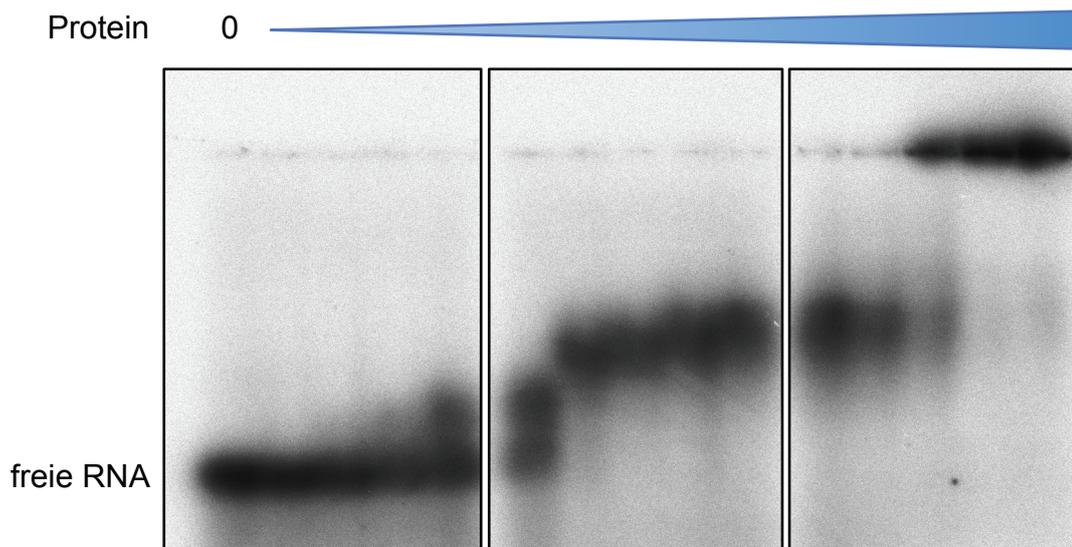


Abbildung 4.26 Retardierungsanalyse von Fragment G. Die Autoradiographie zeigt die Komplexbildung zwischen Fragment G und dem Protein $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$. Es wurden jeweils 15 nM RNA mit 0,02 bis 5 μM Protein in 100 mM Bicine pH 9, 50mM NaCl und 200 mM Xylitol versetzt und für zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse der Interaktion erfolgte im 2 %igen Agarose-Gel in 0,5 x Tris/Borat-Puffer unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Detektion der RNA-Banden erfolgte anschließend mittels Autoradiographie.

Im Vergleich zur freien RNA-Bande, wandert die RNA bei Zugabe von Protein langsamer im Gel, sodass eine Verschiebung der Banden nach oben auftritt, die sich bei steigender Proteinmenge sogar erhöht. Die Wanderungsgeschwindigkeit wird durch die Größe der Partikel stark gemindert, wobei große Partikel langsamer im Gel wandern als kleine. Sehr hohe Proteinmengen führen zu noch größeren Komplexen, die in den Geltaschen verbleiben und nicht ins Gel hineinwandern. Mit steigender Proteinkonzentration nimmt die Intensität der Bande der freien RNA ab, in der sechsten Spur, die einer Proteinkonzentration von 100 nM Protein entspricht, sind die Intensitäten der freien zur gebundenen RNA gleich, die Hälfte der RNA wurde demnach gebunden. Eine Proteinkonzentration von 200 nM in Spur sieben führt zu einer höheren Retardierung und ab 2,3 μ M Protein sind die entstandenen Komplexe so groß, dass ein Eindringen in das Gel verhindert wird.

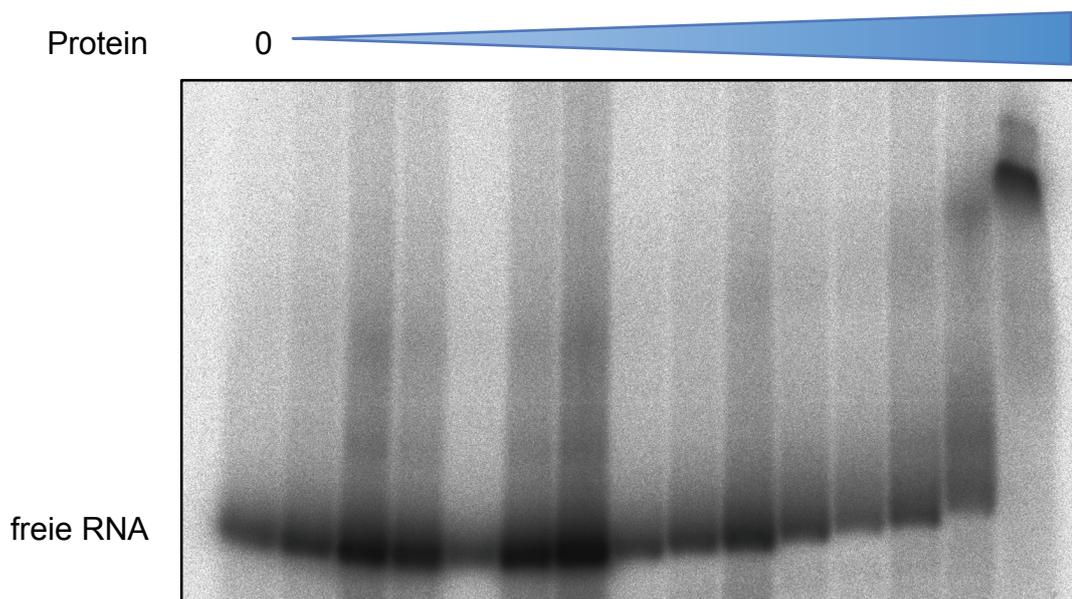


Abbildung 4.27 Retardierungsanalyse von Fragment G mit Zugabe von Heparin. Es wurden jeweils 15 nM RNA mit 0,02 bis 5 μ M Protein in 100 mM Bicine pH 9, 50mM NaCl und 200 mM Xylitol versetzt. Nach Inkubation wurden 20 ng/ μ l Heparin hinzugefügt. Die Analyse der Interaktion erfolgte im 2 %igen Agarose-Gel in 0,5 x Tris/Borat-Puffer unter nichtdenaturierenden Bedingungen. Die Detektion der RNA-Banden erfolgte anschließend mittels Autoradiographie.

Zur Vermeidung von unspezifischen Bindungen und zur Überprüfung der Stabilität der Komplexe wurden nach der Komplexbildung 20 ng/μl des Polyanions Heparin als elektrostatischer Kompetitor zu den Ansätzen hinzugefügt, und für weitere 5 Minuten inkubiert.

Die Retardierungsanalyse mit Fragment G und Zugabe von Heparin zeigt im Wettbewerbsexperiment keine Bindung von Protein und RNA bei geringen Proteinkonzentrationen. Erst ab Konzentrationen von 3,6 bis 5 μM RNA in den letzten beiden Spuren lassen sich Bandenverschiebungen erkennen (Abbildung 4.27), sodass die Bindungen aus Abbildung 4.26 als unspezifische Wechselwirkungen deklariert werden können. Für alle weiteren Experimente wurde Heparin als Kompetitor standardmäßig hinzugefügt.

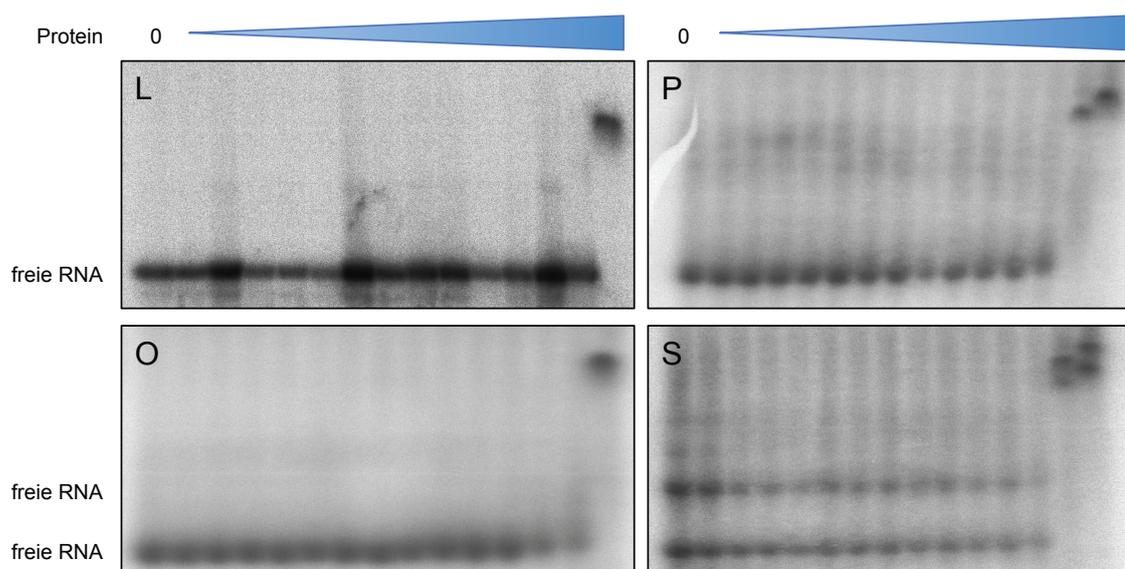


Abbildung 4.28 Retardierungsanalyse der Fragmente L, P, O und S mit Zugabe von Heparin. Es wurden jeweils 15 nM RNA mit 0,02 bis 5 μM Protein in 100 mM Bicine pH 9, 50mM NaCl und 200 mM Xylitol versetzt. Nach Inkubation wurden 20 ng/μl Heparin hinzugefügt. Die Analyse der Interaktion erfolgte im 2 %igen Agarose-Gel in 0,5 x Tris/Borat-Puffer unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Detektion der RNA-Banden erfolgte anschließend mittels Autoradiographie.

Abbildung 4.28 zeigt exemplarisch für alle weiteren getesteten Fragmente die Retardierungen der Fragmente L, P, O und S. In allen Fragmenten konnte mit Zugabe von Heparin erst bei sehr hohen Proteinkonzentrationen von 3,6 bis 5 μ M eine Bandenverschiebung detektiert werden. Bei manchen RNA-Fragmenten zeigte sich in der Retardierungsanalyse eine Doppelbande, die beispielsweise bei Fragment S zu sehen ist und vermutlich von unterschiedlichen Konformationen herrührt. Dabei war nicht eindeutig zu klären, ob die Doppelbande aufgrund der Präparation, Markierung oder Sequenz der RNA erscheint. In allen Fällen ergab sich jedoch eine Bandenverschiebung beider Konformationen. Durch Denaturierung der RNA wurde eine einzige Bande erhalten (Ergebnisse nicht gezeigt).

Tabelle 4.6: Puffer für Retardierungsanalysen

Nr.	Puffer	Additiv
1	Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl	ohne
2	Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl	+1 mM MgCl ₂
3	Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl	+1 mM CaCl ₂
4	Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM NaCl	+1 mM DTT
5	Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM KCl	ohne
6	Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM KCl	+1 mM MgCl ₂
7	Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM KCl	+1 mM CaCl ₂
8	Tris/HCl, pH 7,5, 50 mM KCl	+1 mM DTT
9	Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl	ohne
10	Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl	+1 mM MgCl ₂
11	Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl	+1 mM CaCl ₂
12	Tris/HCl, pH 8, 50 mM NaCl	+1 mM DTT
13	Tris/HCl, pH 8, 50 mM KCl	ohne
14	Tris/HCl, pH 8, 50 mM KCl	+1 mM MgCl ₂
15	Tris/HCl, pH 8, 50 mM KCl	+1 mM CaCl ₂
16	Tris/HCl, pH 8, 50 mM KCl	+1 mM DTT

Um die Komplexbildung zwischen RNA und Protein zu erhöhen und um eine spezifische Bindung nachweisen zu können, wurden verschiedene Testansätze mit 100 mM Tris/HCl pH 7,5 oder 8 mit den Salzen KCl oder NaCl und durch

Zugabe von Additiven wie $MgCl_2$, $CaCl_2$ oder DTT durchgeführt, sodass die in Tabelle 4.6 aufgeführten Bedingungen getestet wurden.

Unter den Bedingungen 6 und 10 aus Tabelle 4.6 (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM KCl und 1mM $MgCl_2$ oder 100 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl und 1mM $MgCl_2$) wurde mit dem Fragment L, welches sich am Exon-Intron-Übergang des Transkripts für die Untereinheit ND4 befindet, mit 2,3 μ M Protein bereits eine Bandenverschiebung in der Retardierungsanalyse identifiziert (Abbildung 4.29).

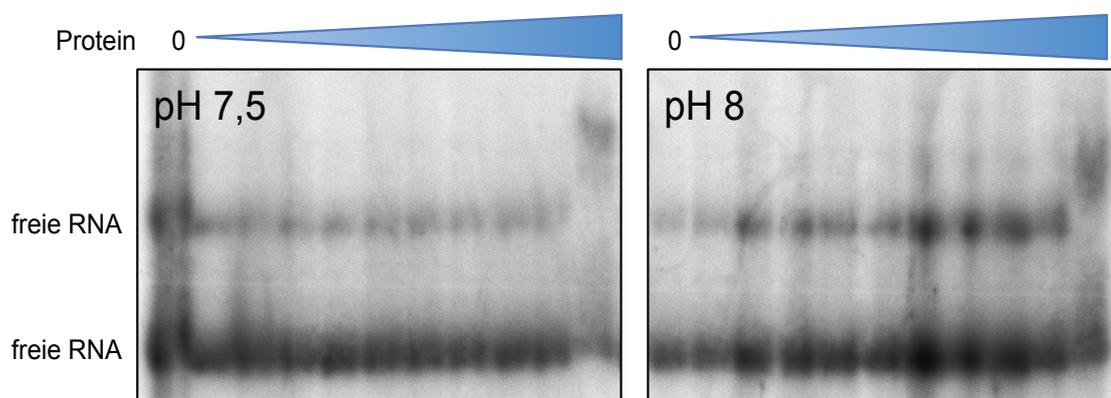


Abbildung 4.29 Retardierungsanalyse von Fragment L mit Zugabe von Heparin in unterschiedlichen Puffern. Es wurden jeweils 15 nM RNA mit 0,04 bis 2,3 μ M Protein in 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM KCl und 1mM $MgCl_2$ oder 100 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl und 1mM $MgCl_2$ versetzt. Nach Inkubation wurden 20 ng/ μ l Heparin hinzugefügt. Die Analyse der Interaktion erfolgte im 2 %igen Agarose-Gel in 0,5 x Tris/Borat-Puffer unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Detektion der RNA-Banden erfolgte anschließend mittels Autoradiographie.

Die Fragmente C und G, die sich am Exon-Intron- bzw. Intron-Exon-Übergang des Transkripts für ND1 befindet, zeigt unter der Bedingung 6 (100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM KCl und 1mM $MgCl_2$) keine Bindung (Abbildung 4.30).

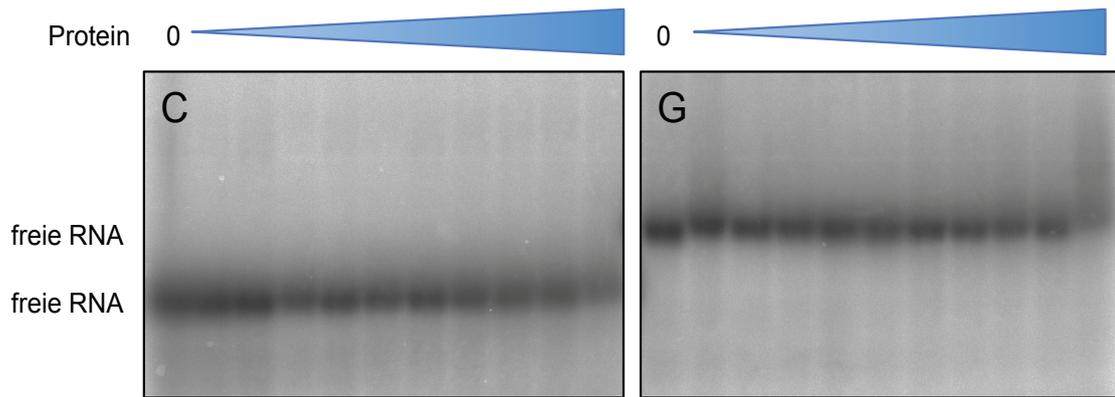


Abbildung 4.30 Retardierungsanalyse der Fragmente C und G mit Zugabe von Heparin in pH 7,5. Es wurden jeweils 15 nM RNA mit 0,04 bis 2,3 μM Protein in 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM KCl und 1mM MgCl_2 versetzt. Nach Inkubation wurden 20 ng/ μl Heparin hinzugefügt. Die Analyse der Interaktion erfolgte im 2 %igen Agarose-Gel in 0,5 x Tris/Borat-Puffer unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Detektion der RNA-Banden erfolgte anschließend mittels Autoradiographie.

Durch die Veränderung der Pufferbedingungen wurden in der Retardierungsanalyse unterschiedliche Ergebnisse erzielt, die auf unterschiedliche Spezifitäten hinweisen.

5. Diskussion

Die Pentatricopeptid-*repeat*-Proteinfamilie repräsentiert eine der größten, jüngst identifizierten Proteinfamilien. Sie werden charakterisiert durch ein Motiv aus 35 Aminosäuren, welches sich in Tandems bis zu 30 mal in einem einzigen Protein wiederholen kann und verantwortlich für die Namensgebung der Proteinfamilie ist. Seit ihrer Entdeckung im Jahr 2000 im Modellorganismus *Arabidopsis thaliana*, wurden eine Reihe von Proteinen dieser Klasse in weiteren Organismen identifiziert und deren Relevanz für die Regulierung posttranskriptioneller Prozesse in Organellen nachgewiesen (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Sowohl *in-vivo*- als auch *in-vitro*-Studien belegen eine direkte Interaktion zwischen den Proteinen und ihrer Ziel-RNA (Schmitz-Linneweber *et al.* 2005; Kobayashi *et al.* 2007). In dem Hyphenpilz *Neurospora crassa* wurden neun PPR-Proteine identifiziert und ein Einfluss von den Proteinen ncu07684 und ncu06461 auf die RNA-Prozessierung von Transkripten für Komplex-I-Untereinheiten des Membranarms gezeigt (Solotoff *et al.* 2014). Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese beiden PPR-Proteine in modifizierter Form ohne mitochondriale Präsequenz und mit C-terminalem His-tag heterolog exprimiert und isoliert. Anschließend erfolgte die Charakterisierung des Proteins $\Delta 95$ -ncu06461-His. Dabei wurde insbesondere die direkte Interaktion zwischen dem Protein und RNA *in vitro* untersucht.

5.1 Komplementation der Deletionsmutanten 20112 und 20449

Durch Reintegration der PPR-Gene in die entsprechende Deletionsmutante wurde die Funktion des Komplex I wiederhergestellt, sodass der Komplex-I-Defekt als Resultat der Abwesenheit der Proteine in den Deletionsmutanten bestätigt wurde. Die Komplementation erfolgte dabei mit modifizierten Gensequenzen, die Informationen für die Expression der Proteine mit Affinitäts-tags zum späteren Expressionsnachweis enthielten. Es wurde eine Kombination aus His- und Strep-tag gewählt, da in früheren Arbeiten gezeigt wurde, dass ein mitochondriales Protein aus *N. crassa* bereits mittels

Affinitätschromatographie angereichert wird und mit dem His-*tag*-Antikörper interagiert, wodurch eine eindeutige Identifizierung der Zielproteine über den His-*tag* nicht möglich erscheint (Moseler 2011). Durch die Kombination von zwei *tags* sollte die Trennung des unbekanntes Proteins von den gesuchten Proteinen realisiert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erfolgreiche Komplementationen der Mutanten 20112 und 20449 durchgeführt (Abbildung 4.3). Die Informationen über die Gensequenzen der PPR-Proteine wurden dabei als vorhergesagte offene Leserahmen durch das MIPS und Broad-institute erhalten, die im Falle von ncu20711 bzw. ncu06461 zu unterschiedlichen Vorhersagen kamen. Dabei konnte sowohl die MIPS-Version ncu20711 als auch die N-terminal verkürzte Version ncu06461 aus dem Broad-Institute die Assemblierung des Komplex I wiederherstellen. Reste des peripheren Arms sind in beiden Komplementationsmutanten ersichtlich. Dies ist vermutlich durch einen nicht ausreichenden Proteinimport oder auf unterschiedliche Transformationseffizienz der mehrkernigen Makrokonidien zurückzuführen. Ein heterokaryotes Erbgut, bei dem sowohl komplementierte als auch nicht komplementierte Kerne vorliegen, erklärt die Anwesenheit des peripheren Arms in Gegenwart eines erfolgreich komplementierten Komplex I. Die Erstellung von homokaryoten Stämmen kann durch den Umweg über einkernige Mikrokonidien erfolgen.

Aufgrund der ähnlichen Ausprägung der Komplementation durch die kurze als auch die lange Version des Gens kann angenommen werden, dass die kurze Version bereits alle Informationen enthält, die sowohl für den Import des Proteins in die Mitochondrien als auch für die Funktion benötigt werden.

Durch die erfolgreiche Komplementation beider Mutanten mit modifizierten Genen, kann angenommen werden, dass die Modifizierung die Aktivität der Proteine nicht beeinträchtigt und in weiterführenden Arbeiten mit Proteinen in modifizierter Form *in-vitro*-Studien durchgeführt werden können.

Es wurde vergebens versucht, die homolog exprimierten Proteine über ihre Affinitäts-*tags* anzureichern und nachzuweisen. Dazu wurden Mitochondrien und das Cytosol von *N. crassa* sowohl nativ als auch unter denaturierenden Bedingungen in Gegenwart von Harnstoff untersucht, der Nachweis der Proteine war in Western Blot-Analysen jedoch nicht eindeutig (Ergebnisse nicht gezeigt). Unter der Annahme einer Steuerung des Proteinimports durch

regulatorische Netzwerke zwischen Kern und Mitochondrium, kann vermutet werden, dass der Import der Proteine in die Mitochondrien als Zielort stattfand, die benötigten Proteinmengen für eine ausreichende Funktionalität jedoch gering sind.

5.2 Heterologe Expression von PPR-Genen

Die heterologe Expression der PPR-Proteine in *E. coli* gestaltete sich zunächst schwierig. In vorangegangenen Arbeiten wurden mit dem Protein ncu07684 hohe Expressionslevel erzielt, wobei das Protein hauptsächlich unlöslich zu Einschlusskörpern aggregiert vorlag. Das Gen ncu20711 wurde nur in sehr geringen Mengen und in aggregierter Form exprimiert.

Durch Verkürzung der Gensequenz um jene Sequenzen, die für die mitochondriale Importsequenz kodieren, wurde die Expression von beiden Genen verbessert. Die Synthese des Proteins $\Delta 65$ -ncu07684-His wurde im Vergleich zum Protein in voller Länge verringert (Abbildung 4.4), aber der Anteil des löslichen Proteins im Vergleich zu vorangegangenen Studien wurde erhöht (Abbildung 4.5). Dennoch blieb die Bildung von aggregierten Proteinen auch nach Verkürzung von ncu07684 eine erhebliche Einschränkung der erfolgreichen heterologen Expression. Die Expression des Gens ncu20711 erfolgte mit Hilfe der Variante $\Delta 95$ -ncu06461-His in hohen löslichen Mengen (Abbildung 4.10). Dabei ist ungewiss, ob die Synthese grundsätzlich durch die Verkürzung der Gesamtsequenz verbessert wurde, oder ob die Abwesenheit der Präsequenz einen spezifischen Faktor darstellt. Aus der Erfahrung heraus scheint sich die Expression von großen Proteinen über 60 – 70 kDa in *E. coli* generell schwierig zu gestalten, sodass die Expression eines verkürzten Fragments ratsam ist. Die Verbesserung der Expression durch die Verkürzung des Gens ncu20711 auf die verkürzte Version ncu06461, könnte auch ein weiterer Hinweis auf die „richtige“ Primärstruktur des Proteins sein. Die Initiierung der Translation scheint in besonderem Maße durch die Faltung der mRNA am 5'-Bereich des Transkripts beeinflusst zu werden (Hall *et al.* 1982). Möglicherweise entstehen bei der Transkription des verlängerten Gens

ncu20711 stabile Sekundärstrukturen der mRNA am 5'-Ende, welche nun dazu führen, dass Teile der Sequenz nicht zugänglich für Ribosomen sind und die Translation demzufolge nicht stattfinden kann. Doch auch auf dem Proteinlevel lassen sich Gründe vermuten, welche die geringe Expression der verlängerten Version begründen. Möglicherweise enthält das durch Expression gebildete Protein der Version ncu20711 N-terminale Sequenzen, die hinderliche Sekundärstrukturen enthalten. Die Bildung dieser verlängerten Sequenzen in *E. coli* könnte demnach zu einem Expressionsabbruch oder zur Proteinaggregation führen.

Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine wird an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und anschließend in die Mitochondrien importiert (Wiedemann *et al.* 2004). Während oder nach der Translation werden die Proteine durch Chaperone gebunden und in einer locker gefalteten Konformation gehalten, welche die Translokation über die Mitochondrienmembran ermöglicht. Dazu werden sowohl Chaperone der HSP70-Familie als auch Faktoren zur Erkennung der mitochondrialen Präsequenzen benötigt (Herrmann und Neupert 2000). Dem mitochondrialen Hitzeschockprotein 70 (mtHsp70) wird bei der Entfaltung, Translokation und Rückfaltung von mitochondrialen Proteinen eine entscheidende Rolle zugesprochen (Voisine *et al.* 1999). Die Abwesenheit von Organellen in Prokaryoten und demnach auch von Mechanismen zur Zielsteuerung und Translokation mitochondrialer Proteine, könnte ein entscheidender Faktor sein, der die Problematik der heterologen, bakteriellen Expression von mitochondrialen Genen in voller Länge begründen könnte. Die verbesserte Genexpression bei den Proteinen ncu07684 und ncu06461 durch die Verkürzung um die mitochondriale Präsequenz unterstützt diese Vermutung. Die Vorhersage der Präsequenz durch Parameter, die sich nur auf die Aminosäuresequenz stützen, birgt allerdings Fehlerquellen, besonders in der Bestimmung der Länge der Präsequenz. So wurde die Präsequenz von ncu06461 mit 95 Aminosäuren vorhergesagt, obwohl bisher nur mitochondriale Präsequenzen in einer Länge von bis zu 85 Aminosäuren beschrieben wurden (Emanuelsson *et al.* 2007). Die Existenz der Präsequenz wird durch die Vorhersage zweier verschiedener Programme gestützt, die exakte Länge der Sequenz sollte jedoch nur als Vorschlag angesehen werden. Die Verkürzung des Gens war dennoch zweckmäßig, da von einer proteolytischen Abspaltung

der vorhergesagten Präsequenz nach dem Import in die Mitochondrien ausgegangen werden kann und die anschließenden Funktionsstudien mit dem Protein so vorgenommen werden sollten, wie es natürlich in den Mitochondrien vorliegen würde. Die potenziell inkorrekte Verkürzung sollte bei der Interpretation der Ergebnisse jedoch berücksichtigt werden.

Neben der Verkürzung der Gene folgten Versuche unter Variation des Nährmediums und der Expressionstemperatur. Dabei wurde gezeigt, dass das Wachstum und die Induktion von Zellen unter osmotischem Stress und unter Anwendung eines Hitzeschocks die Menge von löslichem Protein steigert. Die Erhöhung der Proteinlöslichkeit erfolgt dabei sowohl durch „chemische“ als auch molekulare Chaperone, welche die Stabilität des synthetisierten Proteins erhöhen, die Proteinaggregation verhindern oder möglicherweise die Rückfaltung der Proteine aus ungefalteten oder aggregierten Proteinen ermöglichen (Chen *et al.* 2002; Oganessian *et al.* 2007). Dazu zählt unter anderem auch das unter Stressbedingungen gebildete Hitzeschockprotein HSP70 aus *E. coli*, welches ähnliche Aufgaben wie sein mitochondriales Pendant übernimmt (Bukau und Horwich 1998). Im Gegensatz zur Deletion der mitochondrialen Präsequenz zeigten die Versuche zur Verhinderung der Proteinaggregation für beide Proteine unterschiedliche Resultate. Durch Anwendung von osmotischem Stress und Hitzeschock wurde das Löslichkeitsverhalten des Proteins $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$ verbessert (Abbildung 4.6). Dabei zeigte sich besonders, dass diese Verbesserung nur durch eine Kombination aus Verkürzung und geänderten Expressionsbedingungen erzielt wird (Abbildung 4.10). Bei dem Protein $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ wurde die Verbesserung hauptsächlich durch die Absenkung der Expressionstemperatur erzielt (Abbildung 4.11). Die Anwendung des Hitzeschocks sowie osmotischem Stress bei der Expression führt zu keinen signifikanten Unterschieden in der Proteinlöslichkeit (Abbildung 4.12), es wird jedoch auch kein negativer Effekt auf Expression oder Zellwachstum ermittelt, sodass die Expression unter diesen Bedingungen fortgeführt wurde.

Insgesamt erfolgt die Expression von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ nach der Optimierung in deutlich höheren Mengen als bei $\Delta 65\text{-ncu07684-His}$, sodass eine Umkehrung der Ausgangssituation aus vorangegangenen Studien eingetreten ist. Die Gesamtmenge an löslichem Protein wurde jedoch in beiden Fällen deutlich

erhöht. Die Expression von beiden Proteinen zeigt zusätzliche kleinere Banden in der Western Blot-Analyse, die mit dem His-tag-Antikörper interagieren (Abbildungen 4.6 und 4.9). Da diese Proteine bereits während der Expression entstehen, kann das Vorhandensein eines alternativen Startcodons oder Instabilität der mRNA vor der Translation diskutiert werden. Der Instabilität kann beispielsweise über Expression in BL21 StarTM-Zellen entgegengewirkt werden. Diese enthalten eine verkürzte Form des RNaseE Gens, welche zum Abbau von mRNA nicht mehr fähig ist. Zudem wurden zwei Proteasen deletiert, sodass der Proteinabbau reduziert wird (Life Technologies, BL21 StarTM (DE3) Spezifikation).

Es ist bekannt, dass der differentielle Codongebrauch von Zielproteinen und Expressionsstamm die Translationseffizienz beeinflusst (Tuller *et al.* 2010). Durch Überprüfung des Gens auf seltene Codons und Anpassung dieser für eine Expression in *E. coli* könnte das Expressionslevel von $\Delta 65\text{-ncu07684-10xHis}$ erhöht werden. Eine weitere Möglichkeit stellt die Verwendung von Expressionsstämmen wie RosettaTM (DE3) dar, welche die Genexpression durch Koexpression von seltenen tRNAs erhöht. Die Expression im Expressionsstamm ArcticExpress RIL (DE3), welche durch Kultivierung bei niedrigen Temperaturen kombiniert mit der Coexpression von Chaperonen und seltenen tRNAs die Expression von löslichem Protein erhöhen soll, war jedoch erfolglos (Agilent Technologies, ArcticExpress Spezifikation). Die Untersuchung von weiteren Expressionsstämmen erschien demnach nicht erfolgversprechend. Ebenfalls könnte die Expression der Gene mittels eines ähnlichen Codongebrauchs in einem eukaryotischen Organismus wie *Pichia pastoris* oder *Saccharomyces cerevisiae* erfolgen. Diese ermöglichen zusätzlich post-translationale Modifikationen, welche für die Stabilität und Funktion des Proteins von Relevanz sein könnten. Zudem könnten die Proteine im eukaryotischen Organismus aus den Mitochondrien mit abgespaltener Importsequenz isoliert werden. Aufgrund seiner schnellen und anspruchslosen Wachstumsbedingungen wurde die Expression in prokaryotischen *E. coli* Zellen dennoch bevorzugt und beibehalten (Sahdev *et al.* 2008).

5.3 Proteinisolierung

Für die Isolierung der Proteine $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis und $\Delta 95$ -ncu06461-His aus *E. coli* wurde in beiden Fällen eine einstufige Methode mittels IMAC etabliert.

5.3.1 Proteinisolierung von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis

Die Isolierung von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis wurde erschwert durch einen geringen Ausgangsgehalt des Proteins in den Bakterienzellen. Dadurch war die Ausbeute des Proteins insgesamt geringer, während ein überproportionaler Anteil von unerwünschten Proteinen vorlag. Das Protein $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis wurde gemeinsam mit dem Chaperon GroEL aus *E. coli* in ca. gleichen Anteilen homogen isoliert (Abbildung 4.16). Die Identität der beiden coisolierten Proteine wurde dabei mittels massenspektrometrischer Analyse ermittelt. Eine Erklärung für die gemeinsame Isolierung mit GroEL ergibt sich möglicherweise aus der Funktion des Proteins GroEL. Um Stressbedingungen zu bewältigen, werden in *E. coli* GroEL und GroES synthetisiert, welche für die Faltung vieler neu-synthetisierter Proteine unter ATP-Verbrauch verantwortlich sind. GroEL enthält 14 identische Untereinheiten von 60 kDa, welche eine fassartige Struktur aus zwei heptameren Ringen bildet. GroES enthält sieben Untereinheiten in der Größe von 10 kDa, die eine Art Deckel bilden, mit dem GroEL abgedeckt wird und sich ein gemeinsamer Komplex GroEL/ES bildet. Die Bindung des ungefalteten Proteins erfolgt im Zentrum des Komplexes (Xu *et al.* 1997). Mit steigender Temperatur wird die Aktivität im Faltungsprozess von GroEL verringert, die Dissoziation von GroES verlangsamt und die Freisetzung des ungefalteten Proteins verhindert. Dieser Vorgang ist reversibel, sodass nach dem Hitzeschock die Funktion des Komplexes aus GroEL und GroES wiederhergestellt wird. Vermutlich verhindert der Komplex auf diese Weise die Denaturierung hitzeinstabiler Proteine unter thermischem Stress (Llorca *et al.* 1998). Es ist naheliegend, dass mit der Expression und dem durchgeführten Hitzeschock die Expression und Aktivierung der Chaperone einherging. Da das

Protein $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis gemeinsam mit dem Chaperon GroEL isoliert wurde, kann eine Interaktion zwischen diesen beiden Proteinen vermutet werden. Dabei wäre davon auszugehen, dass der Komplex GroEL/ES das gebildete Protein während des Hitzeschocks vor Denaturierung und Aggregation bewahrt, bei der anschließenden Expression bei 37°C jedoch die Freisetzung des gefalteten Proteins ermöglicht. Die Bindung von GroEL und dem Protein $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis könnte aufgrund von unvollständig gefaltetem Protein herrühren. Dies würde auch die Tatsache erläutern, dass die Proteine im Ausschlussvolumen der Gelfiltrationsanalyse eluieren, welche im Anschluss an die IMAC durchgeführt wurde. Zur Entfernung möglicher Chaperone wurden bereits vergebens Waschschrte mit Magnesiumchlorid und ATP nach Immobilisierung des Proteins durchgeführt. Um GroEL von dem Protein $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis zu separieren, ist es möglich, das Gemisch mit einer Kombination aus $MgCl_2/ATP$ und KCl zu inkubieren. Diese Methode wurde bereits für eine Trennung der Interleukin-2 Tyrosinkinase von den Chaperonen Cpn60/10 aus *Oleispira antarctica* gezeigt, während die alleinige Inkubation mit $MgCl_2/ATP$ oder KCl nur partiell zur Entfernung der Verunreinigungen führte (Joseph und Andreotti 2008). Da Cpn60/10 74 bzw. 54 % Aminosäureidentität zu ihren Homologen GroES und GroEL aus *E. coli* aufweisen (Agilent Technologies, ArcticExpress Spezifikation), ist dieser Schritt zur Optimierung der Reinheit von $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis und zur Entfernung des Chaperons aus der Proteinlösung erfolgsversprechend. Sollte GroEL aufgrund von mangelnder Stabilität mit dem Protein $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis eine Bindung eingehen, so ist eine Trennung dieser nicht ratsam. Die Blau Nativ-PAGE aus Abbildung 4.17 widerspricht der Theorie der Komplexbildung, auch wenn die Zuordnung der einzelnen Banden nicht möglich ist. Bei einer einheitlichen Komplexbildung aus GroEL und $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis, bei der sich das Protein im katalytischen Zentrum von GroEL befindet, sollte sich in der Blau Nativ-PAGE lediglich eine einzelne Bande darstellen. Im Gegensatz dazu zeigt das Gel drei Banden. Es ist denkbar, dass zwar ein Heterokomplex aus beiden Proteinen vorliegt, die Proteine gleichwohl aber auch vereinzelt vorliegen. Da GroEL mit seinen 14 Untereinheiten eine Größe von 840 kDa besitzt, ist dieses im oberen Bereich des Gels zu finden. Unter der Annahme, dass mindestens ein Teil des Proteins $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis ungebunden von

GroEL vorliegt, würde die Lokalisierung des Proteins im oberen Bereich des Gels einen höheren Oligomerisierungsgrad des Proteins implizieren. Die Assoziation des Proteins $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis zu einem höheren Oligomer würde die Elution nahe des Ausschlussvolumens der hier verwendeten Gelfiltrationssäulen erklären, eine Unterscheidung von Proteinaggregation und Oligomerisierung ist demnach mit den hier verwendeten Gelfiltrationsmaterialien nicht möglich. Die Überprüfung des Oligomerisierungszustands mittels Größenausschlusschromatographie in Kombination mit statischer Lichtstreuung gestaltet sich schwierig, da die Lichtstreuung eine hohe Sensitivität gegenüber Aggregaten aufweist und das Signal für das Protein vermutlich überlagert. Eine verlässliche Auswertung des Signals ist nur durch Abtrennung der Aggregate von den potenziellen Oligomeren möglich. Die Oligomerisierung eines PPR-Proteins wurde bisher beispielsweise mit dem Protein THA8 aus *Brachypodium distachyon* festgestellt, bei dem eine Dimerisierung des Proteins durch Bindung von RNA bewirkt wird (Ke *et al.* 2013). Beispiele für eine höhere Oligomerisierung von PPR-Proteinen sind bisher nicht bekannt. Zur Identifizierung des Proteins $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis sollte eine Western Blot-Analyse der Blau Nativ-PAGE durchgeführt werden. Die Verifizierung aller sichtbaren Banden und mögliche Komplexbildungen können mittels Massenspektrometrie erfolgen.

Aufgrund der geringen Expressionsrate und der Einschränkungen durch Heterogenität und aggregierte Proteine bei der Expression sowie die Anwesenheit von Fremdproteinen in der Proteinlösung wurde die Charakterisierung des Proteins $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis nicht weiter verfolgt.

5.3.2 Proteinisolierung von $\Delta 95$ -ncu06461-His

Abbildung 4.19 zeigt die Isolierung von $\Delta 95$ -ncu06461-His als homogen isolierte Spezies mit geringen Nebenprodukten in der Größe von 80 und 60 kDa. Es wurden bis zu 8 mg Protein pro Liter Kultur erhalten. Die Stabilität des Proteins ist mit Puffern mit geringen (pH 6) bis zu hohen pH-Werten (pH 9) und unterschiedlichen Natriumchlorid-Konzentrationen gegeben, wobei die

Langzeitstabilität mit Phosphatpuffer bei pH 7 oder Bicine-Puffer bei pH 9 erhöht wird. Die Ionenstärke des Puffers ist dabei nicht relevant, wurde jedoch für anschließende Bindungsstudien minimiert (Abbildung 4.20). Der Zusatz von Xylitol ermöglichte die Lagerung des Proteins bei -70°C über mehrere Wochen. Bei den Untersuchungen zur Stabilität des Proteins ergab sich, dass dieses in Gegenwart von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) präzipitierte. Die Präzipitation konnte durch Zugabe von Zink- oder Erdalkalimetall-Ionen wie Calcium, Strontium und Barium verhindert werden. Die Identifikation von Metall-Ionen in dem isolierten Protein $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ wurde mittels Atomabsorptionsspektroskopie durchgeführt. In einer Proteinlösung mit einer Konzentration von $0,25\text{ mg/ml}$ wurden $0,365\text{ mg/L}$ Calcium nachgewiesen, das entspricht etwa 3 Calcium-Ionen pro Proteinmolekül (Ergebnisse nicht gezeigt). Es ist jedoch ungewiss, ob das Metall-Ion tatsächlich von dem Protein koordiniert wird und die Funktion des Proteins abhängig von der Anwesenheit von Metall-Ionen ist oder ob es sich dabei lediglich um einen nicht nachvollziehbaren sekundären Effekt handelt. Die Koordination von Metall-Ionen durch PPR-Proteine konnten bei dem Mitochondrialen Ribonuklease P Protein 3 (MRPP3), sowie PPR-Proteinen, die eine DYW Deaminase-Domäne enthalten, nachgewiesen werden. In beiden Fällen sind jedoch nicht die PPR-Domäne selbst, sondern zusätzliche Domänen für die Bindung der Metall-Ionen verantwortlich. Neben einem Zink-Finger-ähnlichen Motiv, enthält MRPP3 eine Metallonuklease-Domäne, welche der katalytischen Aktivität zugrunde liegt. Die Proteine ELI1 und DOT4 binden jeweils zwei Zink-Atome über ihre DYW-Deaminase-Domäne (Hayes *et al.* 2013; Pinker *et al.* 2013). Für das Protein $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ konnten keine zusätzlichen Domänen identifiziert werden, welche die Bindung von Metall-Ionen begründen.

5.4 Charakterisierung von $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$

Die Isolierung des Proteins $\Delta 95\text{-ncu06461-His}$ resultiert in einem stabilen Protein in monomerer Form. Die massenspektrometrische Analyse bestätigte die Homogenität des Proteins und die Abwesenheit von Fremdproteinen.

Vergleicht man dieses Ergebnis mit den dargestellten SDS-PAGE-Analysen (zum Beispiel Abbildung 4.22), welche weitere kleinere Proteine bzw. Proteinfragmente aufzeigen, ergeben sich Diskrepanzen. Einen Faktor könnte die Dialyse der Proteinlösung gegen Wasser darstellen, die vor der Massenspektrometrie durchgeführt wurde, um störende Ionen zu entfernen. Die Dialyse führte zu sichtbaren Präzipitationen, die möglicherweise durch Fremdproteine hervorgerufen wurden und demnach auch nicht mehr zugänglich für die Analyse der abzentrifugierten Proteinlösung waren. Es ist nicht auszuschließen, dass in den verwendeten Proteinlösungen kürzere Fragmente des Proteins oder sogar Fremdproteine enthalten waren, welche die nachfolgenden Interaktionsstudien beeinflussen könnten. Ein weiterer Reinigungsschritt mittels Größenausschlusschromatographie konnte die Homogenität des Proteins jedoch nicht deutlich verbessern.

5.4.1 Aufklärung der Tertiärstruktur

Zur Bestimmung der Tertiärstruktur des Proteins sollten Kristallisationsbedingungen gefunden werden, mit denen anschließend eine Kristallstrukturanalyse mittels Röntgenbeugung durchgeführt werden kann. Dazu sollten hochreine und homogene Kristalle hergestellt werden. Unter zwei Bedingungen konnten aussichtsreiche Proteinkristalle erzeugt werden. Die Reproduktion und Optimierung der Kristallisation ist noch nicht abgeschlossen. Vor dem Hintergrund der äußerst hohen Stabilität des Proteins in den unterschiedlichsten Pufferbedingungen, stellt sich die hohe Rate der Kristallisationsbedingungen, welche die sofortige Präzipitation des Proteins zur Folge hatten, als sehr ungewöhnlich dar. Die Optimierung der Ausgangspufferbedingungen für die Kristallisation war in der erhöhten Stabilität des Proteins im Sinne von geringerer Anzahl an Präzipitationen messbar, jedoch ergaben sich dabei auch keine weiteren Bedingungen, welche die Kristallisation des Proteins bewirkten (Vgl. dazu auch Reus 2014 und Schmidt 2014). Auch kleine, möglicherweise nicht feststellbare oder nachvollziehbare Änderungen der Proteinkomposition in verschiedenen Proteinisolierungen können positive oder

negative Auswirkungen auf die Kristallisation zeigen. Abweichungen in den einzelnen Proteinisolierungen im Bezug auf die Anwesenheit von Fremdproteinen waren nicht sichtbar, können jedoch nicht ausgeschlossen werden. Auch die Präparationsdauer könnte einen Einfluss auf die erfolgreiche Proteinkristallisation darstellen.

Während der C-Terminus des Proteins hauptsächlich die RNA-bindenden PPR-Motive enthält, sind bisher keine Hinweise auf die Funktion des N-Terminus gegeben. Die Kristallisation könnte besonders zur Identifikation von Domänen hilfreich sein, welche die katalytische Aktivität des Proteins vorhersagen könnten. Demnach sollten weitere Experimente zur Kristallisation und Strukturlösung angestrebt werden.

5.4.2 Interaktionsstudien

Die Interaktion von RNA und dem Protein $\Delta 95$ -ncu06461-His wurde mittels Retardierungsanalysen untersucht. Abbildung 4.26 zeigt die Komplexbildung zwischen dem Protein $\Delta 95$ -ncu06461-His und dem Fragment G. Die für PPR-Proteine vorhergesagte RNA-Bindung kann grundsätzlich bestätigt werden. Im Wettbewerbsexperiment (Abbildung 4.27) wird die Komplexbildung erst bei sehr hohen Protein-konzentrationen erreicht, sodass von einer unspezifischen Bindung ausgegangen wird. Diese Unspezifität zeigt sich unterdessen auch im Bezug auf das eingesetzte RNA-Fragment, da mit keinem der Fragmente eine spezifische Bindung in den Retardierungsanalysen nachgewiesen wurde. Erst bei sehr hohen Proteinkonzentrationen von 3,6 bis 6 μM wird eine Bandenverschiebung erreicht, die vermutlich entsteht, wenn die eingesetzte Heparinkonzentration nicht mehr für die Konkurrenz ausreicht (siehe auch Abbildung 4.28). Die eingesetzte Heparinkonzentration ist dabei mit 20 ng/ μl im Vergleich zu den eingesetzten Proteinkonzentrationen als gering einzuschätzen. Unter der Annahme, dass das Protein $\Delta 95$ -ncu06461-His in die Prozessierung der Transkripte für die Untereinheiten ND1 und ND4 involviert ist, wird eine Bindung der Fragmente C, G, I, L und S, welche sich an Exon/Intron- oder Genübergängen befinden, erwartet. Um die Bedingungen für

die Komplexbildung zwischen RNA und Protein zu optimieren, wurden verschiedene Puffer analysiert. Unter den Bedingungen in 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM KCl und 1 mM MgCl₂ sowie 100 mM Tris/HCl pH 8, 50 mM NaCl und 1 mM MgCl₂ wurde für das Fragment L, welches sich am Exon-Intron-Übergang des Transkripts für die Untereinheit ND4 befindet, bereits bei einer geringeren Proteinkonzentration eine Bandenverschiebung erreicht. Neben der Senkung des pH-Wertes wird der Anwesenheit von Magnesium-Ionen als gemeinsamer Faktor beider Pufferbedingungen eine entscheidende Rolle für die Bindung zugesprochen. Die Bindung der RNA ist mit einer Proteinkonzentration im mikromolaren Bereich für eine spezifische Bindung sehr hoch und es bleibt fragwürdig, ob dies den physiologischen Bedingungen *in vivo* gerecht wird. Die Bindungsaffinität von RNA-Proteinen liegt mit sehr hohen Affinitäten im picomolaren bis zu geringen Affinitäten im mikromolaren Bereich in einer sehr hohen Bandweite (Yang *et al.* 2013). Die Affinität des Proteins $\Delta 95$ -ncu06461-His zu seiner Ziel-RNA kann im mikromolaren Bereich als gering angesehen werden. Die geringe Affinität der Bindung könnte durch die Genexpression in *E. coli* bedingt sein, da diesem Reaktionsmechanismen für die Einführung bestimmter posttranslationaler Modifikationen, beispielsweise die Ausbildung von Disulfidbrücken, fehlen. Ebenfalls sollte die N-terminale Verkürzung des Proteins in Betracht gezogen werden. Es wird allgemein angenommen, dass die PPR-Motive für die RNA-bindende-Aktivität verantwortlich sind (Delannoy *et al.* 2007). Da diese sich jedoch im C-Terminus des Proteins befinden und bei der Verkürzung auch nicht beeinflusst wurden, ist an dieser Stelle von keiner negativen Auswirkung der Verkürzung auf die Interaktion mit RNA auszugehen.

Möglicherweise kann die Komplexbildung von RNA und dem Protein $\Delta 95$ -ncu06461-His *in vitro* durch Veränderungen in der Versuchsdurchführung noch optimiert werden. Die Magnesiumkonzentration und die Inkubationszeit sowie -temperatur stellen weitere Optimierungsmöglichkeiten dar. Zudem sollten in einem nächsten Versuch kleinere Titrationsschritte gewählt werden, um die Menge zu identifizieren, bei der die Hälfte der RNA gebunden wurde und eine Bandenverschiebung aufweist, um die Affinität des Proteins genau bestimmen zu können. Die bisher relativ geringe Affinität des Proteins zu seiner

Ziel-RNA könnte auch durch die Abwesenheit weiterer Interaktionspartner bedingt sein.

Trotz der benötigten hohen Proteinkonzentration für die Bindung des Proteins $\Delta 95$ -ncu06461-His an das Fragment L, wurde für die Fragmente C und G in 100 mM Tris/HCl pH 7,5, 50 mM KCl und 1 mM MgCl₂ mit der gleichen Proteinkonzentration keine Komplexbildung nachgewiesen. Mit mindestens einem Fragment wurde demnach Bindung gezeigt, während bei mindestens zwei weiteren Fragmenten keine Bindung auftrat. Durch Variation der Pufferbedingungen in der Retardierungsanalyse wurden Unterschiede in der Bindungskapazität und Spezifität der einzelnen Fragmente nachgewiesen. Es wird davon ausgegangen, dass das Protein ncu06461 spezifisch mit dem Fragment L eine Komplexbildung eingeht und in den Spleißvorgang des Introns involviert ist.

5.5 Mögliche Funktionen der PPR-Proteine ncu07684 und ncu06461

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit bzw. mithilfe von Sequenzanalysen werden im folgenden die möglichen Funktionen der PPR-Proteine ncu07684 bzw. ncu06461 im Bezug auf ihre Rolle im mitochondrialen RNA Metabolismus diskutiert.

5.5.1 Mögliche Funktion von ncu07684 als Leucin-reiches Protein

Aufgrund der ungenügenden Homogenität und Stabilitätsdefizite des Proteins $\Delta 65$ -ncu07684-10xHis, wurden keine Interaktionsstudien durchgeführt, sodass keine neuen experimentellen Hinweise auf die Funktion des Proteins vorliegen. Auf Grundlage der Sequenz lässt sich mithilfe des Programms ProtParam jedoch eine Dominanz der Aminosäuren Leucin und Alanin feststellen, die in der verkürzten Version 12,8 % bzw. 10 % der Gesamtsequenz ausmachen

(Wilkins *et al.* 1999). Ein bekanntes PPR-Protein mit einem hohen Leucin-Anteil ist das humane LRPPRC Protein (*leucine-rich pentatricopeptide repeat containing*), dessen Rolle noch nicht vollständig geklärt ist. Ein Einfluss auf die Organisation des Cytoskelettes, des vesikulären Transports sowie der transkriptionellen Regulierung kernkodierter und mitochondrialer Gene wird vermutet (Liu und McKeehan 2002). Jedoch gibt es auch keine Hinweise auf den spezifischen Einfluss des hohen Leucin-Gehalts auf die Funktion des Proteins, die sich auf ncu07684 anwenden ließe.

Die Assoziation zu Proteinen der LRR-Familie (engl. *Leucine-rich repeat*) ist naheliegend, da diese wie die PPR-Proteine zu den solenoiden Proteinen zählen (Kobe und Kajava 2001). Mittels webbasierter Anwendung konnte jedoch keine Zugehörigkeit identifiziert werden (Offord *et al.* 2010). Unter der Annahme, dass das PPR-Protein ncu07684 entgegen der weitläufigen Annahme nicht RNA (Schmitz-Linneweber und Small 2008), sondern DNA bindet und in die Transkription der Komplex-I-Untereinheiten verwickelt ist, könnte eine Funktion des Proteins als Leucin-Zipper spekuliert werden. Leucin-Zipper werden charakterisiert durch eine Domäne aus einer Alpha-Helix, bei der jede siebte Aminosäure durch ein Leucin dargestellt wird. Durch dieses Motiv wird die Dimerisierung zweier Proteine ermöglicht (Landschulz *et al.* 1988). Tatsächlich kann zwischen den Aminosäuren 239 bis 260 der verkürzten Version eine periodische Wiederholung von vier Leucin-Resten identifiziert werden, die jeweils durch sechs Aminosäuren voneinander getrennt werden (Abbildung 5.1):

```

235-----245-----255-----
RALPLGTWYFLDECSRALHHEGTKLVW
----L-----L-----L-----L--

```

Abbildung 5.1 Periodische Leucin-Wiederholungen in ncu07684

Die Analyse mittels Computerverfahren ergab im Ergebnis jedoch keine Zugehörigkeit zu den Leucin-Zippern da keine für Leucin-Zipper spezifische *Coiled Coil*-Struktur vorhergesagt werden konnte und die Anzahl der Leucin-Wiederholungen häufig sieben Leucin-Reste umfasst (Bornberg-Bauer *et al.*

1998). Es bleibt demnach ungewiss, ob die Wiederholungen nur zufällig bedingt sind oder einen spezifischen Einfluss auf die Funktion des Proteins ausüben. Die Rolle des Proteins ncu07684 für den RNA-Metabolismus und der Einfluss der Dominanz der Aminosäuren Leucin und Alanin bleibt unbekannt und bedarf weiterer Untersuchungen zum Beispiel durch gezielten Austausch der Leucine und die Untersuchung der Aktivität.

Da für andere PPR-Proteine wie das Protein p63 aus Weizen eine Bindung von DNA nachgewiesen wurde (Ikeda und Gray 1999), ist eine Einflussnahme des Proteins auf die Transkription der Untereinheiten des Komplex I vorstellbar.

5.5.2 Mögliche Funktion von ncu06461

In der Deletionsmutante 20112 (Δ ncu06461) findet eine verzögerte, aber nicht aufgehobene Prozessierung der Transkripte für die Untereinheiten ND1 und ND4 des Atmungskettenkomplex I statt (Solotoff 2011), ein autokatalytisches Spleißen der Introns wäre eine mögliche Erklärung. Bei mitochondrialen Genen von Pilzen werden die Introns der Gruppe I und II aus den Vorstufen der RNA durch autokatalytisches Spleißen entfernt. Introns der Gruppe I und II unterscheiden sich dabei in der Sequenz, Sekundärstruktur und dem Mechanismus des Spleißens (Michel *et al.* 1982; Michel *et al.* 1989; Michel und Ferat 1995). Bei der Regulierung des Spleißens spielt die Sekundärstruktur der prä-mRNA Transkripte eine entscheidende Rolle (Saldanha *et al.* 1993). Es wurde gezeigt, dass Magnesium-Ionen die Ausbildung von definierten Sekundärstrukturen von RNA begünstigen und somit eine erhöhte Stabilität dieser mittels unspezifischer elektrostatischer Wechselwirkungen bewirken (Serra *et al.* 2002). Positiv geladene Ionen verhindern die Abstoßung der stark negativ geladenen Phosphatgruppen und unterstützen somit den Faltungsprozess. Der Einsatz von Magnesium-Ionen ist dabei besonders effizient, da bereits Konzentrationen im millimolaren Bereich ausreichen, um Tertiärstrukturen von RNA zu stabilisieren, die in Gegenwart hoher Konzentrationen einwertiger Ionen nur eine geringe Stabilität aufweisen (Draper 2004). Tatsächlich wurde die Anwesenheit von Magnesium-Ionen als essentiell

für das Spleißen von Gruppe-II-Introns deklariert (Gregan *et al.* 2001). Die in dieser Arbeit gewählten Bedingungen, die zu einer verbesserten Komplexbildung zwischen RNA und dem Protein $\Delta 95$ -ncu06461-His führten, zeichnen sich durch einen geringeren pH-Wert aus, welcher dem physiologischen Milieu der Mitochondrien eher entspricht und die Komplexbildung demnach begünstigen könnte. Mit einem isoelektrischen Punkt des Proteins von 7,09 sinkt auch die negative Ladung des Proteins mit geringeren pH-Werten, welche eine Abstoßung mit dem Phosphatrückgrats der RNA verursachen könnte. Zudem unterscheiden sich die beiden Bedingungen in der Art des Salzes. Da die Bindung sowohl bei unterschiedlichen pH-Werten als auch bei Verwendung von Natrium- und Kaliumchlorid stattfand, kann ein weiterer Faktor für die Optimierung der Komplexbildung vermutet werden. Ein gemeinsamer Faktor in beiden Bedingungen ist der Zusatz von 1 mM Magnesiumchlorid, welche die Reaktion durch Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen der RNA begünstigen könnte. Dabei wird die Ausbildung der RNA-Struktur als Voraussetzung für die Bindung mit dem Protein unterstellt. Eine stabile Sekundärstruktur der RNA in Anwesenheit von Magnesium-Ionen unterstützt die erleichterte Bindung des Proteins und begründet zudem die verschlechterte Komplexbildung bei höheren pH-Werten. Höhere pH-Werte begünstigen die negative Ladung und somit die Abstoßung der Phosphatgruppen der RNA und beeinträchtigen somit die Ausbildung einer stabilen Struktur. Das Protein $\Delta 95$ -ncu06461-His geht erst bei geringeren pH-Werten und unter Anwesenheit von Magnesium-Ionen, welche die Ausbildung von stabilen Sekundärstrukturen ermöglichen, eine spezifische Komplexbildung mit dem RNA-Fragment L ein. Es kann vermutet werden, dass das Protein nicht für die Ausbildung der aktiven Struktur der RNA verantwortlich, sondern erst nach Ausbildung einer stabilen Konformation an der Prozessierung beteiligt ist. Das autokatalytische Spleißen von Introns der Gruppe I und II wurde *in vitro* belegt, für das effiziente Spleißen *in vivo* werden jedoch zusätzliche Proteine vermutet. In *Neurospora crassa* wurden bereits Proteine identifiziert, die das Spleißen von mitochondrialen Gruppe-I-Introns fördern, indem sie die katalytisch aktive RNA-Struktur stabilisieren oder nichtnative Strukturen destabilisieren (Akins und Lambowitz 1987; Mohr *et al.* 2002). Für das Protein ncu06461 kann über eine ähnliche Funktion spekuliert werden. Möglicherweise

unterstützt das Protein ncu06461 den Vorgang des Spleißens, indem es favorisierte RNA-Sekundärstrukturen mit katalytisch aktiver Intron-Konformation einfängt und schützt. Diese These könnte durch die Analyse der Sekundärstruktur in An- und Abwesenheit des Proteins ncu06461 belegt werden. Eine ähnliche Funktion wird für das PPR-Protein PPR5 aus Mais unterstellt (Schmitz-Linneweber und Small 2008). Speziell für PPR-Proteine wird kein direkter Einfluss auf die posttranskriptionelle RNA-Prozessierung vermutet, sondern vorgeschlagen, dass PPR-Proteine sequenzspezifisch eine leitende Funktion für weitere Effektoren zu den entsprechenden RNA-Bereichen ausüben. Diese Hypothese findet ihre Begründung in der Abwesenheit katalytischer Domänen in PPR-Proteinen, sodass die Ausübung der Prozessierung durch eine Interaktion von Proteinen mit dem PPR-RNA-Komplex postuliert wird (Delannoy *et al.* 2007). So wurden beispielsweise für das Protein THA8 (Vgl. Kapitel 2.3), welches in den Spleißvorgang zweier Gruppe-II-Introns involviert ist, mindestens zwei weitere Proteinfaktoren für die Funktionalität nachgewiesen (Ke *et al.* 2013). Die Funktion des Proteins ncu06461 als Hilfsprotein kann durch die Tatsache der fortgeführten Prozessierung von ND1-ND4 trotz Abwesenheit des Gens untermauert werden. Die Existenz des Komplex-I-Defekts trotz fortgeführter Prozessierung legt die Vermutung nahe, dass neben dem Einfluss auf den Spleißvorgang des Introns, eine weitere Funktion für das PPR-Protein ncu06461 vorliegt. Mittlerweile wird für die PPR-Proteine nicht mehr ausschließlich eine Beteiligung im RNA-Metabolismus angenommen, sondern vielmehr die Kombination von Transkription, Translation und Assemblierung der Komplexe, die in die oxidative Phosphorylierung involviert sind, vermutet (Krause *et al.* 2004b; Shadel 2004). Eine Funktion des Proteins - beispielsweise in der Translation oder Assemblierung des Membranarms - ist vorstellbar. Der Nachweis von Proteinen als Interaktionspartner würde demnach eine immense Entwicklung in dem Verständnis der Funktion von PPR-Proteinen darstellen.

Zusammengefasst wird folgender Mechanismus für die Aktivität des Proteins ncu06461 postuliert. Das Protein ist in den Spleißvorgang des Introns des Transkripts für die Untereinheit ND4 des Atmungskettenkomplex I involviert. Dabei erfolgt die Bindung an katalytisch aktive, stabile Sekundärstrukturen des Introns zur Rekrutierung weiterer Faktoren, die das Spleißen ermöglichen. Eine

zusätzliche Funktion zur Kombination von Prozessierung, Translation oder Assemblierung des Membranarms von Komplex I des Proteins ist vorstellbar.

5.6 Ausblick

Die Identifikation von PPR-Proteinen und ihre funktionelle Charakterisierung stellt aufgrund ihrer großen Bedeutung für den RNA-Metabolismus in Mitochondrien und der bisher geringen Kenntnisse darüber eine interessante Herausforderung dar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Gene *ncu07684* und *ncu06461* heterolog als Fusionsproteine mit C-terminalen His-tags und ohne mitochondriale Präsequenz in *E. coli* exprimiert und isoliert. Das Protein $\Delta 95$ -*ncu06461*-His wurde als homogene und monomere Spezies isoliert und anschließend charakterisiert. Die Bindung des Proteins an den Exon-Intron-Übergang des Transkripts für die Untereinheit ND4 von Komplex I wurde nachgewiesen, sodass ein Einfluss des Proteins auf den Spleißvorgang des Introns vermutet wurde. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass das Protein *ncu06461* durch Bindung katalytisch aktiver RNA-Strukturen die Rekrutierung weiterer Effektorproteine ermöglicht.

Für das Protein *ncu07684* muss die Proteinisolierung weiter optimiert und es müssen geeignete Pufferbedingungen ermittelt werden, welche die Stabilität des Proteins fördern. Anschließend können Bindungsstudien mit RNA und DNA der Gene ND2 und ND3 erfolgen, um die spezifische Rolle des Proteins auf die Transkription oder Stabilität der transkribierten RNA zu ermitteln.

Die Charakterisierung des Proteins *ncu06461* kann in weiteren Kristallisationsversuchen zur Ermittlung der Struktur erfolgen, um mögliche katalytische Domänen zu identifizieren. Die Bindungsstudien sollten durch geeignete Reaktionsbedingungen optimiert werden, um die genaue Affinität bestimmen zu können. Dazu sollte auch nachgewiesen werden, dass der entstandene Komplex auch mit hohen Konzentrationen an Heparin beständig bleibt. Anschließend kann mittels RNA-Footprint-Analysen der genaue Bereich der

RNA festgelegt werden, welcher für die Bindung des Proteins von Bedeutung ist.

Analysen zur Stabilität der RNA unter An- und Abwesenheit des Proteins könnten die hier postulierte Rolle des Proteins als Hilfsprotein zur Indikation von katalytisch aktiven RNA-Konformationen verifizieren.

In weiterführenden Arbeiten sollten Untersuchungen zu Interaktionen mit Proteinen als Effektoren bei der RNA-Prozessierung, Translation und Assemblierung von Untereinheiten für die Komplexe, die an der oxidativen Phosphorylierung beteiligt sind, erfolgen. die Identifikation von potenziellen Interaktionspartnern könnte durch die Komplementationsmutanten und mittels Immunpräzipitation oder *Yeast-Two-Hybrid*-Analysen erfolgen.

Literaturverzeichnis

- Akins RA, Lambowitz AM (1987) A protein required for splicing group I introns in *Neurospora* mitochondria is mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase or a derivative thereof. *Cell* 50:331-345
- Albrandt A (2011) Expression von Pentatricopeptid-Repeat-Genen aus *Neurospora crassa* in *Escherichia coli*. Diplomarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Andrés C, Lurin C, Small ID (2007) The multifarious roles of PPR proteins in plant mitochondrial gene expression *Physiologia Plantarum* 129:14-22
- Arnaud-Barbe N, Cheynet-Sauvion V, Oriol G, Mandrand B, Mallet F (1998) Transcription of RNA templates by T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res* 26:3550-3554
- Aubourg S, Boudet N, Kreis M, Lecharny A (2000) In *Arabidopsis thaliana*, 1% of the genome codes for a novel protein family unique to plants. *Plant Mol Biol* 42:603-613
- Babushok DV, Ostertag EM, Kazazian HH, Jr. (2007) Current topics in genome evolution: molecular mechanisms of new gene formation. *Cell Mol Life Sci* 64:542-554
- Beidler JL, Hilliard PR, Rill RL (1982) Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal Biochem* 126:374-380
- Bittner-Eddy P, Monroy AF, Brambl R (1994) Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of *Neurospora crassa*. *J Mol Biol* 235:881-897
- Bonen L, Vogel J (2001) The ins and outs of group II introns. *Trends Genet* 17:322-331

- Bornberg-Bauer E, Rivals E, Vingron M (1998) Computational approaches to identify leucine zippers. *Nucleic Acids Res* 26:2740-2746
- Bruce AG, Uhlenbeck OC (1978) Reactions at the termini of tRNA with T4 RNA ligase. *Nucleic Acids Res* 5:3665-3677
- Bukau B, Horwich AL (1998) The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* 92:351-366
- Campbell JW, Enderlin CS, Selitrennikoff CP (1994) Vectors for expression and modification of cDNA sequences in *Neurospora crassa*. *Fungal Genet. News* 41:20-21
- Chen J, Acton TB, Basu SK, Montelione GT, Inouye M (2002) Enhancement of the solubility of proteins overexpressed in *Escherichia coli* by heat shock. *J Mol Microbiol Biotechnol* 4:519-524
- Claros MG, Vincens P (1996) Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences. *Eur J Biochem* 241:779-786
- Coffin JW, Dhillon R, Ritzel RG, Nargang FE (1997) The *Neurospora crassa* *cya-5* nuclear gene encodes a protein with a region of homology to the *Saccharomyces cerevisiae* PET309 protein and is required in a post-transcriptional step for the expression of the mitochondrially encoded COXI protein. *Curr Genet* 32:273-280
- Colot HV, Park G, Turner GE, Ringelberg C, Crew CM, Litvinkova L, Weiss RL, Borkovich KA, Dunlap JC (2006) A high-throughput gene knockout procedure for *Neurospora* reveals functions for multiple transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:10352-10357

- Das AK, Cohen PW, Barford D (1998) The structure of the tetratricopeptide repeats of protein phosphatase 5: implications for TPR-mediated protein-protein interactions. *EMBO J* 17:1192-1199
- de Longevialle AF, Meyer EH, Andres C, Taylor NL, Lurin C, Millar AH, Small ID (2007) The pentatricopeptide repeat gene OTP43 is required for trans-splicing of the mitochondrial nad1 Intron 1 in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19:3256-3265
- Delannoy E, Stanley WA, Bond CS, Small ID (2007) Pentatricopeptide repeat (PPR) proteins as sequence-specificity factors in post-transcriptional processes in organelles. *Biochem Soc Trans* 35:1643-1647
- Ding YH, Liu NY, Tang ZS, Liu J, Yang WC (2006) *Arabidopsis* GLUTAMINE-RICH PROTEIN23 is essential for early embryogenesis and encodes a novel nuclear PPR motif protein that interacts with RNA polymerase II subunit III. *Plant Cell* 18:815-830
- Draper DE (2004) A guide to ions and RNA structure. *RNA* 10:335-343
- Duarte M, Videira A (2009) Effects of mitochondrial complex III disruption in the respiratory chain of *Neurospora crassa*. *Mol Microbiol* 72:246-258
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat Protoc* 2:953-971
- Fournier D, Palidwor GA, Shcherbinin S, Szengel A, Schaefer MH, Perez-Iratxeta C, Andrade-Navarro MA (2013) Functional and genomic analyses of alpha-solenoid proteins. *PLoS One* 8:e79894
- Galle L (2013) Charakterisierung eines mitochondrialen PPR Proteins aus *Neurospora crassa*. Bachelorarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

- Georgiou G, Valax P (1996) Expression of correctly folded proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol* 7:190-197
- Giege P, Brennicke A (1999) RNA editing in *Arabidopsis* mitochondria effects 441 C to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:15324-15329
- Gregan J, Kolisek M, Schweyen RJ (2001) Mitochondrial Mg(2+) homeostasis is critical for group II intron splicing in vivo. *Genes Dev* 15:2229-2237
- Griffiths AJF, Collins RA, Nargang FE (1995) Mitochondrial Genetics of *Neurospora*. In: Kück U (ed) *Genetics and Biotechnology The Mycota Volume 2*
- Haili N, Arnal N, Quadrado M, Amiar S, Tcherkez G, Dahan J, Briozzo P, Colas des Francs-Small C, Vrielynck N, Mireau H (2013) The pentatricopeptide repeat MTSF1 protein stabilizes the *nad4* mRNA in *Arabidopsis* mitochondria. *Nucleic Acids Res* 41:6650-6663
- Hall MN, Gabay J, Debarbouille M, Schwartz M (1982) A role for mRNA secondary structure in the control of translation initiation. *Nature* 295:616-618
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* 166:557-580
- Hayes ML, Giang K, Berhane B, Mulligan RM (2013) Identification of two pentatricopeptide repeat genes required for RNA editing and zinc binding by C-terminal cytidine deaminase-like domains. *J Biol Chem* 288:36519-36529
- Herrmann JM, Neupert W (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr Opin Microbiol* 3:210-214

- Ikeda TM, Gray MW (1999) Characterization of a DNA-binding protein implicated in transcription in wheat mitochondria. *Mol Cell Biol* 19:8113-8122
- Jacquier A (1996) Group II introns: elaborate ribozymes. *Biochimie* 78:474-487
- Joseph RE, Andreotti AH (2008) Bacterial expression and purification of interleukin-2 tyrosine kinase: single step separation of the chaperonin impurity. *Protein Expr Purif* 60:194-197
- Karpenahalli MR, Lupas AN, Soding J (2007) TPRpred: a tool for prediction of TPR-, PPR- and SEL1-like repeats from protein sequences. *BMC Bioinformatics* 8:2
- Ke J, Chen RZ, Ban T, Zhou XE, Gu X, Tan MH, Chen C, Kang Y, Brunzelle JS, Zhu JK, Melcher K, Xu HE (2013) Structural basis for RNA recognition by a dimeric PPR-protein complex. *Nat Struct Mol Biol* 20:1377-1382
- Kennell JC, Lambowitz AM (1989) Development of an in vitro transcription system for *Neurospora crassa* mitochondrial DNA and identification of transcription initiation sites. *Mol Cell Biol* 9:3603-3613
- Kleidon J, Plesofsky N, Brambl R (2003) Transcripts and transcript-binding proteins in mitochondria of *Neurospora crassa*. *Mitochondrion* 2:345-360
- Kobayashi K, Suzuki M, Tang J, Nagata N, Ohyama K, Seki H, Kiuchi R, Kaneko Y, Nakazawa M, Matsui M, Matsumoto S, Yoshida S, Muranaka T (2007) Lovastatin insensitive 1, a Novel pentatricopeptide repeat protein, is a potential regulatory factor of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 48:322-331
- Kobe B, Kajava AV (2001) The leucine-rich repeat as a protein recognition motif. *Curr Opin Struct Biol* 11:725-732

- Koc EC, Spremulli LL (2003) RNA-binding proteins of mammalian mitochondria. *Mitochondrion* 2:277-291
- Krause F, Scheckhuber CQ, Werner A, Rexroth S, Reifschneider NH, Dencher NA, Osiewacz HD (2004a) Supramolecular organization of cytochrome c oxidase- and alternative oxidase-dependent respiratory chains in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *J Biol Chem* 279:26453-26461
- Krause K, Lopes de Souza R, Roberts DG, Dieckmann CL (2004b) The mitochondrial message-specific mRNA protectors Cbp1 and Pet309 are associated in a high-molecular weight complex. *Mol Biol Cell* 15:2674-2683
- Kubelik AR, Kennell JC, Akins RA, Lambowitz AM (1990) Identification of *Neurospora* mitochondrial promoters and analysis of synthesis of the mitochondrial small rRNA in wild-type and the promoter mutant [poky]. *J Biol Chem* 265:4515-4526
- Kuffner R, Rohr A, Schmiede A, Krull C, Schulte U (1998) Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol* 283:409-417
- Landschulz WH, Johnson PF, McKnight SL (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science* 240:1759-1764
- Lee C, Tibbetts AS, Kramer G, Appling DR (2009) Yeast AEP3p is an accessory factor in initiation of mitochondrial translation. *J Biol Chem* 284:34116-34125
- Lipinski KA, Puchta O, Surendranath V, Kudla M, Golik P (2011) Revisiting the yeast PPR proteins--application of an Iterative Hidden Markov Model algorithm reveals new members of the rapidly evolving family. *Mol Biol Evol* 28:2935-2948

- Liu L, McKeehan WL (2002) Sequence analysis of LRPPRC and its SEC1 domain interaction partners suggests roles in cytoskeletal organization, vesicular trafficking, nucleocytosolic shuttling, and chromosome activity. *Genomics* 79:124-136
- Llorca O, Galan A, Carrascosa JL, Muga A, Valpuesta JM (1998) GroEL under heat-shock. Switching from a folding to a storing function. *J Biol Chem* 273:32587-32594
- Lurin C, Andres C, Aubourg S, Bellaoui M, Bitton F, Bruyere C, Caboche M, Debast C, Gualberto J, Hoffmann B, Lecharny A, Le Ret M, Martin-Magniette ML, Mireau H, Peeters N, Renou JP, Szurek B, Taconnat L, Small I (2004) Genome-wide analysis of Arabidopsis pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis. *Plant Cell* 16:2089-2103
- Manthey GM, McEwen JE (1995) The product of the nuclear gene PET309 is required for translation of mature mRNA and stability or production of intron-containing RNAs derived from the mitochondrial COX1 locus of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 14:4031-4043
- Marques I, Dencher NA, Videira A, Krause F (2007) Supramolecular organization of the respiratory chain in *Neurospora crassa* mitochondria. *Eukaryot Cell* 6:2391-2405
- Michel F, Ferat JL (1995) Structure and activities of group II introns. *Annu Rev Biochem* 64:435-461
- Michel F, Jacquier A, Dujon B (1982) Comparison of fungal mitochondrial introns reveals extensive homologies in RNA secondary structure. *Biochimie* 64:867-881
- Michel F, Umesono K, Ozeki H (1989) Comparative and functional anatomy of group II catalytic introns--a review. *Gene* 82:5-30

- Mohr S, Stryker JM, Lambowitz AM (2002) A DEAD-box protein functions as an ATP-dependent RNA chaperone in group I intron splicing. *Cell* 109:769-779
- Moreno JI, Buie KS, Price RE, Piva MA (2009) Ccm1p/Ygr150cp, a pentatricopeptide repeat protein, is essential to remove the fourth intron of both COB and COX1 pre-mRNAs in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* 55:475-484
- Moseler R (2011) Charakterisierung modifizierter Biogenese Proteine des Atmungskettenkomplex I. Diplomarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Nakon R, Krishnamoorthy CR (1983) Free-metal ion depletion by "Good's" buffers. *Science* 221:749-750
- Nehls U, Friedrich T, Schmiede A, Ohnishi T, Weiss H (1992) Characterization of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora* mitochondria by gene disruption. *J Mol Biol* 227:1032-1042
- Nelson MA, Macino G (1987) Structure and expression of the overlapping ND4L and ND5 genes of *Neurospora crassa* mitochondria. *Mol Gen Genet* 206:307-317
- Nguyen TH (2013) Isolierung und Charakterisierung von Pentatricopeptide-Repeat-Proteinen aus *Neurospora crassa* in *Escherichia coli*. Diplomarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Notsu Y, Masood S, Nishikawa T, Kubo N, Akiduki G, Nakazono M, Hirai A, Kadowaki K (2002) The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. *Mol Genet Genomics* 268:434-445

- O'Toole N, Hattori M, Andres C, Iida K, Lurin C, Schmitz-Linneweber C, Sugita M, Small I (2008) On the expansion of the pentatricopeptide repeat gene family in plants. *Mol Biol Evol* 25:1120-1128
- Offord V, Coffey TJ, Werling D (2010) LRRfinder: a web application for the identification of leucine-rich repeats and an integrative Toll-like receptor database. *Dev Comp Immunol* 34:1035-1041
- Oganesyan N, Ankoudinova I, Kim SH, Kim R (2007) Effect of osmotic stress and heat shock in recombinant protein overexpression and crystallization. *Protein Expr Purif* 52:280-285
- Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* 22:5951-5961
- Pinker F, Bonnard G, Gobert A, Gutmann B, Hammani K, Sauter C, Gegenheimer PA, Giege P (2013) PPR proteins shed a new light on RNase P biology. *RNA Biol* 10:1457-1468
- Reus L (2014) Struktur-Funktionsanalyse eines mitochondrialen PPR-Proteins durch Kristallisation und isotherme Titrationskalorimetrie Bachelorarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Ringel R, Sologub M, Morozov YI, Litonin D, Cramer P, Temiakov D (2011) Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature* 478:269-273
- Sabar M, Balk J, Leaver CJ (2005) Histochemical staining and quantification of plant mitochondrial respiratory chain complexes using blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Plant J* 44:893-901
- Saha D, Prasad AM, Srinivasan R (2007) Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiol Biochem* 45:521-534

- Sahdev S, Khattar SK, Saini KS (2008) Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. *Mol Cell Biochem* 307:249-264
- Saldanha R, Mohr G, Belfort M, Lambowitz AM (1993) Group I and group II introns. *FASEB J* 7:15-24
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science* 283:1488-1493
- Schagger H, von Jagow G (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223-231
- Schmidt A (2014) Struktur-Funktionsanalyse eines mitochondrialen PPR-Proteins durch Kristallisation und Oberflächen-Plasmon-Resonanz. Bachelorarbeit Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Schmitt J, Hess H, Stunnenberg HG (1993) Affinity purification of histidine-tagged proteins. *Mol Biol Rep* 18:223-230
- Schmitz-Linneweber C, Small I (2008) Pentatricopeptide repeat proteins: a socket set for organelle gene expression. *Trends Plant Sci* 13:663-670
- Schmitz-Linneweber C, Williams-Carrier R, Barkan A (2005) RNA immunoprecipitation and microarray analysis show a chloroplast Pentatricopeptide repeat protein to be associated with the 5' region of mRNAs whose translation it activates. *Plant Cell* 17:2791-2804
- Serra MJ, Baird JD, Dale T, Fey BL, Retatagos K, Westhof E (2002) Effects of magnesium ions on the stabilization of RNA oligomers of defined structures. *RNA* 8:307-323

- Shadel GS (2004) Coupling the mitochondrial transcription machinery to human disease. *Trends Genet* 20:513-519
- Small ID, Peeters N (2000) The PPR motif - a TPR-related motif prevalent in plant organellar proteins. *Trends Biochem Sci* 25:46-47
- Solotoff V (2011) Identifizierung und Charakterisierung von Biogeneseproteinen der NADH:Ubichinon Oxidoreduktase in dem Hyphenpilz *Neurospora crassa* Dissertation Institut für Biochemie Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Solotoff V, Moseler R, Schulte U (2014) Two pentatricopeptide repeat domain proteins are required for the synthesis of respiratory complex I. *Curr Genet*
- Studier FW (2005) Protein production by auto-induction in high density shaking cultures. *Protein Expr Purif* 41:207-34
- Takenaka M (2010) MEF9, an E-subclass pentatricopeptide repeat protein, is required for an RNA editing event in the *nad7* transcript in mitochondria of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 152:939-947
- Tuller T, Waldman YY, Kupiec M, Ruppin E (2010) Translation efficiency is determined by both codon bias and folding energy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:3645-3650
- Vogel HJ (1956) A convenient growth media for *Neurospora crassa*. *Microbiol Genet Bull* 13:42-47
- Voisine C, Craig EA, Zufall N, von Ahsen O, Pfanner N, Voos W (1999) The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* 97:565-574

- Wang Z, Zou Y, Li X, Zhang Q, Chen L, Wu H, Su D, Chen Y, Guo J, Luo D, Long Y, Zhong Y, Liu YG (2006) Cytoplasmic male sterility of rice with boro II cytoplasm is caused by a cytotoxic peptide and is restored by two related PPR motif genes via distinct modes of mRNA silencing. *Plant Cell* 18:676-687
- Wiedemann N, Frazier AE, Pfanner N (2004) The protein import machinery of mitochondria. *J Biol Chem* 279:14473-14476
- Wilkins MR, Gasteiger E, Bairoch A, Sanchez JC, Williams KL, Appel RD, Hochstrasser DF (1999) Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol Biol* 112:531-552
- Xu Z, Horwich AL, Sigler PB (1997) The crystal structure of the asymmetric GroEL-GroES-(ADP)₇ chaperonin complex. *Nature* 388:741-750
- Yang X, Li H, Huang Y, Liu S (2013) The dataset for protein-RNA binding affinity. *Protein Sci* 22:1808-1811
- Yin P, Li Q, Yan C, Liu Y, Liu J, Yu F, Wang Z, Long J, He J, Wang HW, Wang J, Zhu JK, Shi Y, Yan N (2013) Structural basis for the modular recognition of single-stranded RNA by PPR proteins. *Nature* 504:168-171
- Zhu Q, Dugardeyn J, Zhang C, Takenaka M, Kuhn K, Craddock C, Smalle J, Karampelias M, Denecke J, Peters J, Gerats T, Brennicke A, Eastmond P, Meyer EH, Van Der Straeten D (2012) SLO2, a mitochondrial pentatricopeptide repeat protein affecting several RNA editing sites, is required for energy metabolism. *Plant J* 71:836-849

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
ABC-Transporter	<i>ATP binding cassette</i> Transporter
<i>A. Thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
abs.	absolut
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Au	<i>Absorbance units</i>
BMFZ	Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum
BN	Blau Nativ
BSA	Rinderserumalbumin
CAPS	3-(Cyclohexylamin)-1-Propansulfonsäure
Da	Dalton
DDM	n-Dodecyl- β -D-Maltosid
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	elektrophoretische Mobilitäts Shift Assays
FGSC	Fungal Genetics Stock Center
for	<i>forward</i>
HEPES	2-[4-(2-hydroxyethyl)piperazinyl]-ethansulfonsäure
His	Histidin
IMAC	Immobilisierte Metallionenaffinitäts-Chromatographie
KCN	Kaliumcyanid
LRR	Leucine rich repeat
M	molar
<i>M. musculus</i>	<i>Mus musculus</i>
MALDI	Matrix-unterstützter Laser-Desorption/Ionisation

MES	2-(N-morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MIPS	<i>munich information center for protein sequences</i>
ml	milliliter
mM	millimolar
MW	Molekulargewicht
<i>N. crassa</i>	<i>Neurospora crassa</i>
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NBT	4-Nitroblau-Tetrazoliumchlorid
nm	Nanometer
<i>O. Sativa</i>	<i>Oryza sativa</i>
OD	Optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
pCp	Cytidin 3',5'-bisphosphat
PCR	Polymerasekettenreaktion
PPR	Pentatricopeptid <i>repeat</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RC	<i>reliability class</i>
rev	<i>reverse</i>
RI	Brechungsindex
RNA	Ribonukleinsäure
s	Sekunde
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TOF	<i>time of flight</i>
TPR	tetratricopeptid <i>repeat</i>
Tris	Tris-(hydroxymethoxy)-aminomethan
u	<i>Unit</i>
UpM	Umdrehungen pro Minute

Abkürzungsverzeichnis

UV	Ultraviolett
μM	mikromolar

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich gerne ein paar Menschen danken, die mich in den letzten Jahren auf meinem Weg begleitet haben und ohne deren Unterstützung diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderes Dankeschön gilt Uli. Danke für deine Unterstützung, deine stets offene Tür und alle wertvollen Tipps, die du mir gegeben hast. Ich danke dir ganz besonders dafür, dass du mir den Raum und die Freiheit für meine eigenen Ideen und Entscheidungen gelassen und mich nur mit sanftem Schubsen zurück in die richtige Bahn gelenkt hast, wenn ich ein wenig von meinem Weg abgekommen bin. Durch dich habe ich in den letzten Jahren sowohl fachlich als auch menschlich sehr viel gelernt und ich hoffe, dass ein wenig von deinem ruhigen Gemüt auf mich abgefärbt hat.

Lutz danke ich nicht nur für die Übernahme des Koreferats, sondern gemeinsam mit Sander auch für die Unterstützung in unseren Meetings. Durch euch war es stets möglich, meine Ergebnisse aus einem anderen Blickwinkel betrachten zu können. Ich habe mich wirklich glücklich geschätzt, dass ich während meiner Arbeit so viel unterschiedlichen Input erhalten habe.

Ich danke Nino und Chrissi für den einen Tag, an dem ihr mein Kartenhaus zum Einsturz gebracht und mich überzeugt habt, dass die Doktorarbeit eine gute Idee für mich ist. Vielleicht ist es euch gar nicht bewusst, aber dieser eine Tag war entscheidend für mich, denn ihr habt dafür gesorgt, dass ich meine Zweifel überdenke, meine Angst hinter mir lasse und mich in das Abenteuer Doktorarbeit wage.

Danke an Vero und Martina, dass ihr mir den Einstieg ins Thema erleichtert habt und ich so viel von euch lernen konnte. Ich bin dankbar für die tatkräftige Unterstützung, die ansteckende Begeisterungsfähigkeit und jede einzelne Anweisung oder Karteikarte mit wertvollen Anweisungen, die mir meine Arbeit erleichtert hat. Martina danke ich besonders für die vielen persönlichen Gespräche über Buddha und die Welt, all die aufmunternden Worte und die

vielen Schlafmöglichkeiten. Danke für deine ansteckende Art, die Dinge im Leben positiv zu sehen. Wenn ich gehe, gebe ich dir wieder ein wenig davon zurück, aber einen Teil behalte ich ;) Vervollständigt um Marianne, Iris, Isa und Britta danke ich euch für unermessliche Stunden bei Kaffee und Tee, entspannende Yogastunden und tolle Mädelsabende.

Mein Lieblingsandré, manchmal findet man jemand ganz Besonderen, mit dem die Arbeit Spaß macht. Mit deinem ansteckenden Enthusiasmus und deiner liebenswerten Art hast du mich häufig motiviert und mir beigegeben, wenn ich frustriert war und nichts klappen wollte. Ich danke dir für all die Stunden im Labor und bei einer Tasse Tee auf der Couch oder dem Balkon, unsere offenen und herzlichen Gespräche, die aufmunternden Worte und Umarmungen. Ich hab dich so sehr in mein Herz geschlossen und jetzt hoffe ich, dass wir tanzen werden :)

Vielen Dank an Diana & Iris und Astrid & Steffi für die Unterstützung und Antworten auf Fragen aller Art zum Klonieren und Kristallisieren sowie die unendlichen Gespräche während der Bahn-, Zug- und Autofahrten oder bei Frisörbesuchen ;)

Prof. Wagner, Ümit, Reini und Sabine danke ich für die Unterstützung, Hilfsbereitschaft, Einarbeitung und Beratung in allen Fragen rund um RNA, Retardierungsanalysen und radioaktives Arbeiten. Die Zeit, die ihr euch für mich genommen habt, ging weit über das übliche Maß hinaus! Danke für euer Engagement und die stets offene Tür!

Ein großer Dank gilt auch Anette und Prof. Janiak für die Unterstützung bei den Atomabsorptionsspektren.

Vielen Dank an das gesamte Institut für Biochemie für die tolle gemeinsame Zeit, die kritischen Gespräche und wertvollen Tipps. Ganz besonders möchte ich mich bei Philipp, Michael, Sven, Nils, Miro, Katja, Manuel und Jan bedanken. Ich habe in euch nicht nur tolle Sitznachbarn und treue Mensabegleiter, sondern auch Freunde gefunden. Danke für alle Stunden, die ich mit euch mit vielfältigen Gesprächen auch außerhalb des Büros oder des

Labors bei Kaffee, Tee, Grillabenden, Glühwein und Karaoke verbringen durfte, ich hab euch wirklich lieb gewonnen. Ich wünsche euch allen ganz viel Spaß, Erfolg und Ausdauer für die nächste Zeit. Haltet durch und wachst über euch hinaus!

Ich danke allen Studenten, die ich auf ihrem Weg zur Bachelor-, Diplomarbeit oder in Praktika begleiten durfte und die meine Arbeit dabei so fleißig unterstützt haben: Gabriel, Ines, Birte, Susann, Huy, Lisa, Andreas, Laura und Anastasia.

Mein liebster Christian, ich danke dir für die Unterstützung, den Rückhalt und die Liebe, die du mir in den ganzen letzten Jahren entgegengebracht hast. Du hast mich so häufig aufgefangen und wieder aufgebaut und so sehr an mich geglaubt! Du hast mir immer wieder vor Augen geführt, was in mir steckt und mir dadurch das Selbstbewusstsein und die Kraft gegeben, das alles durchzustehen. Ohne dich wäre ich gar nicht so weit gekommen. Ich hab dich lieb und danke dir, dass du immer für mich da warst!

Mein allergrößter Dank gilt meiner Familie für die Liebe, Geduld, Unterstützung und den Halt, den ihr mir gebt. Ihr seid nicht nur meine Familie, sondern auch besten Freunde und Schutzengel! Ich danke besonders meinen Eltern und meinem Bruder. Ihr seid mir immer gute Vorbilder gewesen und habt mir stets gezeigt, dass man alles erreichen kann, was man sich vornimmt. Danke, dass ihr mir ermöglicht habt, meinen Weg zu gehen. Ich liebe euch!

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der "Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis" an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf,

Ricarda Moseler