

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

INHALTSVERZEICHNIS

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

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

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

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