# Etablierung eines Nachweisverfahrens zur Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Verteilung mitochondrial translatierter Proteine mit hochauflösender STED-Mikroskopie durch metabolische Markierung mit nichtkanonischen Aminosäuren

Dissertation

zur Erlangung des mathematisch-naturwissenschaftlichen Doktorgrades

"Doctor rerum naturalium"

der Georg-August-Universität Göttingen

im Promotionsprogramm Biologie

der Georg-August University School of Science (GAUSS)

vorgelegt von

Moritz Fabian Heuser

aus Hamburg

Göttingen, 2017

# **Betreuungsausschuss**

Prof. Dr. Stefan Jakobs, Forschungsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien, Abteilung NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie

PD Dr. Thomas Teichmann, Abt. Zellbiologie der Pflanze, Schwann-Schleiden Forschungszentrum für molekulare Zellbiologie, Georg-August-Universität Göttingen

# Mitglieder der Prüfungskommission

- Referent: Prof. Dr. Stefan Jakobs, Forschungsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien, Abteilung NanoBiophotonik, Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie
- Korreferent: PD Dr. Thomas Teichmann, Abt. Zellbiologie der Pflanze, Schwann-Schleiden Forschungszentrum für molekulare Zellbiologie, Georg-August-Universität Göttingen

# Weitere Mitglieder der Prüfungskommission:

Prof. Dr. Blanche Schwappach, Abteilung Molekularbiologie, Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Peter Rehling, Abteilung Zellbiochemie, Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsmedizin Göttingen

Prof. Dr. Ralph Kehlenbach, Abteilung Molekularbiologie, Zentrum Biochemie und Molekulare Zellbiologie, Universitätsmedizin Göttingen

Prof Dr. Gerhard Braus, Abteilung Molekulare Mikrobiologie und Genetik, Institut für Mikrobiologie und Genetik, Georg-August-Universität Göttingen

Tag der mündlichen Prüfung: 02.05.2017

# Inhaltsverzeichnis

Zus	amme	enfase	sung	1
Sur	nmary	·		2
1	Einle	eitung	g	3
1	L.1	Aufb	oau und Funktion von Mitochondrien	3
1	L.2	Die r	nitochondriale Proteinsynthese	5
	1.2.1	L	Das mitochondriale Genom	5
	1.2.2	2	Die Transkription	6
	1.	2.2.1	Initiation	6
	1.	2.2.2	Elongation	7
	1.	2.2.3	Termination	7
	1.2.3	3	Die Prozessierung der RNA	8
	1.	2.3.1	Endonukleolytische Spaltung der prä-RNA	8
	1.	2.3.2	Reifung der mRNA	10
	1.	2.3.3	Reifung der rRNA	11
	1.	2.3.4	Reifung der tRNA	13
	1.	2.3.5	Aminoacylierung der tRNA	15
1.2.4 Di			Die Translation	18
	1.	2.4.1	Die Struktur des Mitoribosoms	18
	1.	2.4.2	Die Initiation der Translation	18
	1.	2.4.3	Elongation, co-translationale Insertion und Termination	19
1	L.3	Expe	erimenteller Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese	21
	1.3.1	L	Der klassische Nachweis mit Isotopen	21
	1.3.2	2	Limitierungen und nicht-kanonische Aminosäuren als Alternativen	22
1	L.4	Die k	Kupfer-katalysierte Huisgen-Reaktion	23
	1.4.1	L	Der Reaktionsmechanismus der CuAAC	24
	1.4.2	2	Anwendungen in der biologischen Forschung	25
1	L.5	Aust	olick/Zielsetzung	26
2	Mate	erial	und Methoden	27
2	2.1	Puffe	er und Reagenzien	27
	2.1.1	L	Puffer, Lösungen und pH-Wert	27
	2.1.2	2	Antikörper	28
2.1.3 Funktionalisierte Sonde			Funktionalisierte Sonden	29
2	2.2	Hum	nane Zellkultur	31
	2.2.1	L	Zellkultivierung, Passage und Aussaat	

2.2.2		.2.2	Zellzahlbestimmung	
2.2.3		.2.3	Test auf Kontamination mit Mykoplasmen	
2.3 Mai		Ma	arkierung von Proteinsynthese für proteinbiochemische Analysen	32
2.3.1			Ablauf der Methioninsubstitution	32
	2	.3.2	Zellernte mit HeLa-Zellen	33
	2	.3.3	Zellernte mit HDFa-Zellen	33
	2.4	lsc	lation von Mitochondrien	
	2	.4.1	Isolation aus HeLa-Zellen	
	2	.4.2	Isolation aus HDFa-Zellen	
	2.5	Ve	rarbeitung mitochondrialer Rohlysate	
	2.	.5.1	Proteinkonzentrationsbestimmung	
	2.	.5.2	Präzipitation von Proteinen	
		2.5.2	.1 Proteinfällung nach Wessel und Flügge	
		2.5.2	.2 Proteinfällung nach Friedman, Hoving und Westermeier	38
	2	.5.3	Alkylierung von Aminosäuren mit Iodessigsäure	38
	2.6	Ku	pferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC)	39
	2.7	Au	freinigung desthiobiotinylierter Proteine	40
	2.8	Pro	oteinbiochemische Analyseverfahren	
	2	.8.1	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	
		2.8.1	.1 Das Tricin-System	42
		2.8.1	.2 Das Glycin-System	42
	2	.8.2	Western Blot	43
		2.8.2	.1 Klassische Antigen-Dekorierung	44
		2.8.2	.2 Neutravidin-System für sehr geringe Mengen Antigen	44
	2.9	Ma	assenspektrometrische Analyse	45
	2.10	) Pro	bbenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie	46
	2	.10.1	Anpassungen der Methioninsubstitution	46
	2.	.10.2	CuAAC auf fixierten Zellen	46
	2	.10.3	Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung	47
	2.11	L Mi	kroskopie	48
	2	.11.1	Konfokale Mikroskopie	48
	2	.11.2	STED-Mikroskopie	48
3	E	rgebni	sse	49
	3.1	Eta	ablierung eines CuAAC-Reaktionscocktails	49
	3	.1.1	Schutz der Proteine durch die Wahl der Reaktionskomponenten	49
	3.	.1.2	Optimierung der Stöchiometrie der Reaktanden	53

	3.1.3		Stabilisierung der Proteine durch Alkylierung	. 54
	3.1.4		Optimierung der CuAAC für den Nachweis hydrophober Proteine	. 56
	3.1.5		Etablierung eines Nachweissystems	. 57
	3.2	Nac	hweis mitochondrialer Proteinsynthese im Western Blot	. 59
	3.2	.1	Der Nachweis in Rohlysaten	. 59
	3.2	.2	Aufreinigung mitochondrialer Proteinsyntheseprodukte via CuAAC-Modifikation	. 61
	3.2	.3	Korrelation der nachgewiesenen Proteine mit Antikörpern	. 63
	3.3	Ider	ntifikation mitochondrialer Translationsprodukte im Massenspektrometer	. 66
	3.3	.1	Verdau und Nachweis mitochondrial codierter Proteine	. 66
	3.3	.2	Affinitätsaufreinigung der mitochondrial codierten Proteine	. 67
	3.3	.3	Nachweis von HPG-Einbau und -Modifikation	. 71
	3.4	Anv	vendung in der Fluoreszenzmikroskopie	. 73
4	Dis	kussio	on	. 77
	4.1	Der	Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese im Western Blot	. 77
	4.1	.1	Die Steigerung der Nachweisempfindlichkeit	. 77
	4.1	.2	Der Nachweis durch nicht-kanonische und radioaktive Aminosäuren im Vergleich	. 78
	4.2	Der	massenspektrometrische Nachweis des mitochondrial codierten Proteoms	. 81
	4.3 codiei	Aus rten P	weitung des Nachweises auf die HPG-positive Subpopulation der mitochondrial Proteine	. 84
	4.4	Die	kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition in biologischen Proben	. 86
	4.4	.1	Erzeugung des Katalysators und Schutz der Proteine vor freien Radikalen	. 86
	4.4	.2	Seitenreaktionen des Alkins	. 90
	4.4	.3	Der Ligand als Optimierungsansatz	. 92
	4.5	Aus	blick: Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie	. 94
5	Lite	eratur		. 97
6	Anł	nang.		113
Abkürzungsverzeichnis			erzeichnis	120
А	bbildur	ngsve	rzeichnis	123
Та	abellen	iverze	eichnis	127
D	anksag	ung		129
Le	ebensla	auf		130

# Zusammenfassung

Die metabolische Markierung naszierender Polypeptide mit nicht-kanonischen Aminosäuren ist ein mächtiges Werkzeug für die Analyse des zellulären Proteoms. Über das Einbringen bioorthogonaler funktioneller Gruppen ermöglicht es in einer anschließenden Nachweisreaktion den direkten Zugriff auf die Subpopulation der in einem frei gewählten Zeitraum translatierten Proteine. Diese Methode ist in der Vergangenheit bereits sowohl für cytosolische Proteinsynthese eukaryotischer Zellen, als auch für prokaryotische Proteinsynthese angewendet worden. Mitochondrien sind endosymbiotisch entstandene Organellen, die sich ihr eigenes Genom erhalten haben, das neben funktionalen RNAs ausschließlich für einige essentielle Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe codiert. Basierend auf dem Import kerncodierter Proteine unterhalten sie darüber hinaus eine eigene Proteinsynthese-Maschinerie, die sich stark von ihrem cytosolischen Gegenstück, aber auch von ihrem Ursprung, dem bakteriellen System, unterscheidet. Diese Arbeit zeigt erstmalig, dass das Methionin-Analog Homopropargylglycin (HPG), eine nicht-kanonische Aminosäure die ein terminales Alkin trägt, anstelle von Methionin in mitochondrial translatierte Proteine eingebaut wird und dort über die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) mit einer Azid-funktionalisierten Sonde nachgewiesen werden kann. Dies wird anhand der Affinitätsaufreinigung mitochondrialer Translationsprodukte nach differentiellem Einsatz der Proteinsyntheseinhibitoren Cycloheximid und Thiamphenicol im Western Blot demonstriert und mit massenspektrometrischen Daten, die den Einbau von HPG in mitochondrial translatierte Proteine zeigen, belegt. Zusätzlich wird gezeigt, dass sich die mitochondriale Proteinsynthese auch in intakten fixierten Zellen fluoreszenzmarkieren und in situ mit hochauflösender STED-Mikroskopie abbilden lässt, obwohl die direkte Kopplung eines Fluorophors an eine nicht kanonische Aminosäure viel dunkler ist als eine Antikörper-Färbung. Damit legt diese Arbeit den Grundstein für die Untersuchung der räumlichen Verteilung der Proteinsynthese im mitochondrialen Netzwerk mit bisher unerreichter Präzision, weil der Abstand zwischen der markierten nicht-kanonischen Aminosäure und der Fluoreszenz-Sonde um ein Vielfaches geringer ist als im Falle einer Antikörper-Dekoration. Die Entwicklung einer Azid-funktionalisierten Sonde, die diesem Problem begegnet, indem sie mehr als ein Fluorophor trägt, wird in zukünftigen Arbeiten eine hochauflösende Abbildung der mitochondrialen Translation in variablen Zeiträumen auch in Mehrfachfärbungen gegen andere Strukturen ermöglichen.

# Summary

Metabolic labeling of nascent polypeptides using non-canonical amino acids is a valuable tool enabling researchers to introduce bioorthogonal functional groups into proteins. These can subsequentially be used for identifying the subset of proteins synthesized in a defined time window. This method has already been applied to analyze protein synthesis in the cytoplasm of both eukaryotic and prokaryotic cells. Mitochondria are organells of endosymbiontic origin that have maintained their own genome coding for some functional RNAs and a few subunits of the respiratory complexes. Based on the import of cytosolic proteins, mitochondria furthermore possess everything needed for protein synthesis. The mitochondrial protein synthesis however differs strongly from both its cytosolic counterpart and its ancestor, the bacterial system. This study shows, for the first time, the incorporation of the methionine-mimic homopropargylglycine (HPG) into mitochondrially translated proteins. HPG introduces a terminal alkyne into the proteins which can subsequently be detected with an azidefunctionalized probe via copper catalyzed 1,3 dipolar cycloaddition (CuAAC). This was demonstrated by using cycloheximide and thiamphenicol for differential inhibition of protein synthesis, affinity purification of the labeled mitochondrial translation products and their subsequent detection in Western blot. HPG incorporation into these proteins was confirmed by mass spectrometric analysis. Further, the mitochondrial protein synthesis was labeled with an azide-functionalized fluorophore in fixed cells and detected in situ using high-resolution STED microscopy, although the one fluorophore per HPG approach was very dim. Altogether, this work establishes a new method for measuring the nanoscale distribution of mitochondrial protein synthesis, because direct labeling with HPG brings the fluorescent probe much closer to the protein than an antibody staining. If a future study were able to cope with the problem of brightness, e.g. by synthesizing an azide-modified probe bearing more than one fluorophore, then even multi-color imaging with other structures will be possible.

# 1.1 Aufbau und Funktion von Mitochondrien

Mitochondrien sind essentielle Bestandteile aller eukaryotischer Zellen. Ihre Herkunft wird mit der Endosymbiontentheorie erklärt, nach der sich ein Wasserstoff-abhängiges Archaebakterium als Wirstzelle ein fakultativ anaerobes α-Proteobakterium (dem Proto-Mitochondrium) einverleibt hat. Im Laufe der Evolution hat ein horizontaler Gentransfer hin zur Wirtszelle das Genom des Endosymbionten stark reduziert, während sich gleichzeitig der Zellkern gebildet hat; die eukaryotische Zelle war entstanden (W. F. Martin, Garg, & Zimorski, 2015).

Mitochondrien sind Organellen mit einer komplexen Ultrastruktur. Vom Cytosol sind sie durch ihre äußere Membran abgegrenzt. In ihnen befindet sich die innere Membran, die eine weitaus größere Oberfläche als die äußere Membran aufweist. Daraus resultieren morphologisch und funktionell die zwei Subdomänen der inneren Membran: Die innere Grenzflächenmembran bildet Kontaktstellen mit der äußeren Membran, während sich Invaginationen, die Cristae, in das Innere der Mitochondrien erstrecken. Eine Folge dieser Architektur ist, dass Mitochondrien zwei voneinander getrennte, wässrige Reaktionsräume beherbergen (siehe Abbildung 1.1), dem Intermembranraum zwischen äußerer und innerer Membran und die Matrix, die vollständig von der inneren Membran umgeben ist (Frey & Mannella, 2000).



**Abbildung 1.1: A:** Die mitochondriale Ultrastruktur als dreidimensionales Modell am Beispiel eines Mäuseherz-Mitochondriums, erzeugt per cryo-Elektronentomographie. **B:** Mikrograph einer einzelnen Schnittebene. Die Abbildung ist angepasst nach Kühlbrandt (2015).

Mitochondrien spielen eine zentrale Rolle in vielen Stoffwechselprozessen. Sie sind essentiell für die Synthese von Eisen-Schwefel-Clustern, die als Co-Faktoren in den Mitochondrien selbst, aber auch im Cytoplasma und im Zellkern für die Funktion vieler Proteine notwendig sind (Lill & Mühlenhoff, 2006). Auch Häm wird in Mitochondrien synthetisiert (Atamna, 2004). Mitochondrien sind eng mit der Apoptose verknüpft, indem sie Cytochrom c aus dem Intermembranraum in das Cytosol entlassen, wo es seinerseits die Kaspase-Kaskade auslösen kann (Cai, Yang, & Jones, 1998). Das mitochondriale Proteom von Säugern umfasst mehr als 1000 Proteine (Meisinger, Sickmann, & Pfanner, 2008). Der allergrößte Anteil davon ist in der Kern-DNA codiert und wird aus dem Cytosol in die Mitochondrien importiert (Neupert & Herrmann, 2007). Fehlfunktionen in zahlreichen mitochondrialen Komponenten führen zu einer Vielzahl schwerer Krankheitsbilder (Powell, Nicholls, & Minczuk, 2015; Tuppen *et al.*, 2010).

Eine weitere zentrale Funktion der Mitochondrien ist die oxidative Phosphorylierung, die in den Cristae der inneren mitochondrialen Membran stattfindet (Kühlbrandt, 2015). Die bei der Oxidation energiereicher Kohlenwasserstoffe die gewonnenen Elektronen werden über Atmungskettenkomplexe I bis IV kontrolliert auf den Akzeptor Sauerstoff übertragen und die dabei freigesetzte Energie wird verwendet, um einen elektrochemischen Protonengradienten über die innere Membran zu erzeugen. Dessen Potentialdifferenz wird anschließend von Komplex V der Atmungskette zur Erzeugung des energiereichen Moleküls Adenosintriphosphat genutzt. Dieser Prozess liefert die für die Unterhaltung einer eukaryotischen Zelle nötige Energie. Zusammengenommen bestehen die Atmungskettenkomplexe aus etwa 90 Proteinen, deren Großteil kerncodiert ist und importiert wird (Gustafsson, Falkenberg, & Larsson, 2016; Van Haute et al., 2015). Die Assemblierung der Komplexe ist jedoch ein kompliziertes Zusammenspiel aus mitochondrialen Translations- und Importmechanismen (Mick et al., 2012), weil die Mitochondrien auch ein eigenes Genom enthalten. In Säugern codiert es 13 Proteine aus den Atmungskettenkomplexen I, III, IV und V (siehe Tabelle 3.4), die allesamt unverzichtbare Kernkomponenten der Atmungskettenkomplexe sind (Larsson et al., 1998). Der Erhalt des mitochondrialen Genoms wird als Fähigkeit der Organelle begriffen, seine eigene Redox-Balance zu regulieren, um über die Stöchiometrie der einzelnen Komplexe eine Übersättigung an reduzierten Elektronenträgern in der inneren Membran zu verhindern, die ihrerseits die Ursache für Entstehung reaktiver Sauerstoffspezies wären (W. F. Martin et al., 2015). Viele mechanistische Details der mitochondrialen Proteinsynthese sind auch heute noch unbekannt und Gegenstand intensiver Forschung.

#### 1.2 Die mitochondriale Proteinsynthese

#### 1.2.1 Das mitochondriale Genom

Mitochondrien verfügen über ihr eigenes Genom, wobei dessen Größe und die Anzahl der darin codierten Proteine zwischen verschiedenen Spezies stark variiert (Ott, Amunts, & Brown, 2016). Das humane, mitochondriale Genom (mtDNA, siehe Abbildung 1.2) hat eine Größe von 16,5 Kilobasenpaaren und codiert insgesamt für 11 mRNAs, aus denen 13 Proteine hervorgehen, 22 tRNAs und zwei rRNAs (Gustafsson et al., 2016; Taanman, 1999). Mittels CsCl-Dichtezentrifugation können die komplementären DNA-Stränge in Abhängigkeit ihres Guanin-Gehalts in den schweren (Guanin-reichen) und leichten Strang aufgetrennt werden (Borst, 1972). Auf diesem Umstand beruht die Nomenklatur des schweren bzw. leichten Stranges (heavy & light strand). Der leichte Strang der humanen mitochondrialen DNA codiert lediglich für eine mRNA und acht tRNAs, alle anderen Gene befinden sich auf dem schweren Strang. In jeder Zelle existieren viele Kopien der mtDNA und der Einfluss mutationsbedingter Dysfunktionen auf die Integrität der Mitochondrien wird als kumulativer Effekt (Heteroplasmie) begriffen, der abhängig ist von der Größe der mutierten Fraktion relativ zur Gesamtzahl der vorhandenen Kopien (Hayashi et al., 1991; Montier, Deng, & Bai, 2009). Die mtDNA befindet sich in der mitochondrialen Matrix und wird in vivo mit Hilfe des DNA-Bindeproteins TFAM (mitochondrial transcription factor A) zu kernäquivalenten Nucleoiden organisiert (Campbell, Kolesar, & Kaufman, 2012). Auf ein Nucleoid kommen schätzungsweise 1000 Kopien TFAM (Bogenhagen, 2012). Hochauflösende Mikroskopie hat gezeigt, dass mit Antikörpern fluoreszenzmarkierte Nucleoide einen durchschnittlichen Durchmesser von 100 nm haben (Kukat et al., 2011). Aus einem eigenen Genom resultiert die Notwendigkeit eines vollständigen Replikations-, Transkriptions-, Prozessierungs- und Translationsapparates. Sämtliche darin involvierte Enzyme, Regulatoren und auch die Untereinheiten der mitochondrialen Ribosomen (Mitoribosomen) selbst sind kerncodiert und werden in die Mitochondrien importiert (Gustafsson et al., 2016; Ott et al., 2016; Van Haute et al., 2015). Der genetische Code in Mitochondrien weist einige Abwandlungen gegenüber dem universellen Code auf. So wird Methionin zusätzlich zu AUG auch von AUA und AUU codiert und UGA fungiert nicht als Stop-Codon, sondern codiert für Tryptophan (Anderson et al., 1981; Barrell, Bankier, & Drouin, 1979). Zudem codieren AGG und AGA nicht für Arginin, sondern terminieren indirekt die Translation, indem sie eine -1-Leserasterverschiebung zum UAG-Stop-Codon bewirken (R. Temperley et al., 2010).



**Abbildung 1.2:** Schematische Darstellung des humanen mitochondrialen Genoms. Der schwere Strang (HS) ist der äußere, der leichte Strang (LS) der innere Kreis. HSP1, HSP2 und LSP sind die Promotoren. Die 22 tRNAs sind rot, die 2 rRNAs grün und die 13 Proteine blau hervorgehoben. Die Abbildung ist angepasst nach Taanman (1999).

#### 1.2.2 Die Transkription

#### 1.2.2.1 Initiation

Im Menschen wird die Transkription von einer einzigen mitochondrialen RNA-Polymerase katalysiert (Ringel et al., 2011; Tiranti et al., 1997). Die Polymerase ist nicht in der Lage, die Transkription eigenständig zu initiieren (Schwinghammer et al., 2013), sondern bewerkstelligt dies im Zusammenspiel mit zwei essentiellen Transkriptionsfaktoren, dem mitochondrialen DNA-Bindeprotein TFAM (mitochondrial transcription factor A) und TFB2M (mitochondrial transcription factor 2B), einer Methyltransferase (Bonawitz, Clayton, & Shadel, 2006; Falkenberg et al., 2002; Litonin et al., 2010). Eine Kontroverse gibt es bezüglich der Anzahl an Promotoren auf der mitochondrialen DNA. Zwei Promotoren sind allgemein akzeptiert, HSP1 (heavy strand promoter 1) auf dem schweren Strang und LSP (light strand promoter) auf dem leichten (Gustafsson et al., 2016). Beide Promotoren haben gemeinsam, dass sie in vitro in Anwesenheit von TFAM und TFB2M exprimiert werden (Falkenberg et al., 2002; Litonin et al., 2010). Zusätzlich gibt es Berichte über einen zweiten Promotor HSP2 auf dem schweren Strang, auf dessen Existenz der Nachweis mehrerer Transkripte mit unterschiedlichen Start- und Endpunkten hindeuten (M. Martin et al., 2005; Montoya, Gaines, & Attardi, 1983), die aber nicht von allen Autoren bestätigt werden (Litonin et al., 2010). Zudem ist die exakte Position von HSP2 im Genom noch ungeklärt und es gibt widersprüchliche Ergebnisse zu dieser Frage (Lodeiro et al., 2012; M. Martin et al., 2005). Der Befund, dass die RNA-Polymerase zusammen mit TFB2M in vitro auch ohne TFAM die Transkription initiiert, hat die Theorie

aufgebracht, dass HSP2 einer differentiellen Expression in Abhängigkeit von der TFAM-Konzentration unterliegen könnte und im Gegensatz zu HPS1 und LSP dann aktiv ist, wenn die lokale Konzentration von TFAM temporär gering ist (Lodeiro *et al.*, 2012; Shutt *et al.*, 2010; Zollo, Tiranti, & Sondheimer, 2012). Als Regulationsmechanismus wird das Mengenverhältnis zwischen TFAM auf der einen Seite und dem RNA-Polymerase-TFB2M-Komplex auf der anderen Seite vorgeschlagen, die um das Binden von HSP2 konkurrieren könnten (Lodeiro *et al.*, 2012). Diese Befunde deuten eine Rolle von TFAM sowohl als Transkriptionsaktivator als auch als Repressor an. *In vitro* inhibiert die Deletion des C-Terminus von TFAM sowohl die Expression von HSP1 als auch die Repression von HSP2 (Lodeiro *et al.*, 2012). Bislang wurden TFAM zwei Rollen zugewiesen: Als Transkriptionsaktivator und als Regulator der Kopienzahl der mitochondrialen DNA (Campbell *et al.*, 2012). Mit der Vorhersage seiner Funktion als Transkriptionsrepressor könnte sich das Aufgabenspektrum dieses Proteins noch erweitern.

#### 1.2.2.2 Elongation

Nach dem Start der Transkription wird die DNA in mehrere, polycistronische Transkripte umgeschrieben (Gustafsson *et al.*, 2016; Montoya *et al.*, 1982). Die schiere Länge dieser Transkripte führte zu der Vorhersage, dass die RNA-Polymerase auch während der Elongation von weiteren Proteinen unterstützt werden muss. Mit TEFM (*mitochondrial transcription elongation factor*) ist der einzige derzeit bekannte, mitochondriale Transkriptionselongationsfaktor aufgrund von Sequenzhomologien zu anderen Elongationsfaktoren identifiziert worden und *in vivo* wurde gezeigt, dass ein *knockdown* von *TEFM* durch RNA-Interferenz eine Verringerung der Menge Promotor-distaler Transkripte zur Folge hat (Minczuk *et al.*, 2011). *In vitro* wurde anschließend gezeigt, dass TEFM die RNA-Polymerase befähigt, deutlich längere Transkripte zu erzeugen, auch über Regionen hinaus, in denen die RNA starke Strukturen ausbildet, die ohne TEFM zur Termination führen (Posse *et al.*, 2015). TEFM ist *in vitro* ebenfalls in der Lage, die Transkription eines oxidationsgeschädigten DNA-Stranges aufrecht zu erhalten (Posse *et al.*, 2015).

#### 1.2.2.3 Termination

Über die Termination der Transkription ist nur wenig bekannt. Das Protein MTERF1 (*mitochondrial transcription termination factor 1*) ist damit in Verbindung gebracht worden, weil es die mtDNA auf dem schweren Strang an einer konservierten Sequenz hinter dem 3'-Ende des 16S-rRNA-Gens bindet (siehe Abbildung 1.2) und seine Deletion zu verlängerten Transkripten führt (Daga *et al.*, 1993; Kruse, Narasimhan, & Attardi, 1989). Allerdings zeigt das rekombinante, aufgereinigte Protein *in vitro* zwar die erwartete spezifische DNA-Bindekapazität, ist jedoch nicht in der Lage, die Transkription zu terminieren (FernandezSilva *et al.*, 1997). Die Titer-Bestimmung mitochondrialer Transkripte zeigt, dass im stabilen Gleichgewicht der Pool an rRNAs (12S und 16S) ca. 50x größer ist als der Pool an mRNAs, wobei zwischen den einzelnen mRNA-Molekülen nur geringe Unterschiede bestehen (Gelfand

& Attardi, 1981). In Mäusen wird aber keine Verschiebung dieses Gleichgewichts beobachtet, wenn diese einen homozygoten *mterf1-knockout* tragen, obwohl gleichzeitig ausgeschlossen wird, dass ein anderes Protein MTERF1 substituiert (Terzioglu *et al.*, 2013). Stattdessen verursacht das Fehlen von MTERF1 eine Verlängerung der Transkription des leichten Stranges hinein in eine nicht-codierende Region, obwohl es die mtDNA auf dem schweren Strang bindet (Terzioglu *et al.*, 2013). MTERF1 ist folglich möglicherweise für eine sterisch bedingte Termination der Transkription auf dem komplementären Strang verantwortlich.

Basierend auf Sequenzhomologien wurden noch drei weitere Mitglieder der MTERF-Familie identifiziert; MTERF2, 3 und 4 (Linder *et al.*, 2005). Weder MTERF2 noch MTERF4 sind bislang mit der Termination in Verbindung gebracht worden (Camara *et al.*, 2011; Pellegrini *et al.*, 2009). Auch aufgereinigtes MTERF3 ist nicht in der Lage, die Transkription *in vitro* zu beeinflussen (Park *et al.*, 2007). Der gewebsspezifisch induzierte Verlust von MTERF3 in adulten Mäusen führt allerdings zu einer Steigerung der Transkriptionsaktivität Promotor-naher-Gene, während Promotor-distale Gene in kleineren Mengen transkribiert werden. Ein homozygoter *knockout* von *Mterf3* ist indes schon für Embryonen letal. Zusammen mit der Beobachtung, dass MTERF3 stark an die Promotor-Region des mitochondrialen Genoms bindet, wird geschlussfolgert, dass es ein Repressor der mitochondrialen Transkription ist, womöglich um eine Kollision gegenläufiger Transkriptionsvorgänge von HSP und LSP zu verhindern (Park *et al.*, 2007). Passend dazu sinkt bei MTERF3-Verlust die Anzahl der Atmungskettenkomplexe, die von den Transkripten abhängig sind (Park *et al.*, 2007; Roberti *et al.*, 2006).

Zusammengefasst ist noch kein mitochondrialer Terminationsfaktor identifiziert worden, die Datenlage weißt aber auf eine regulatorische Funktion der räumlichen Kopplung der Transkription beider mtDNA-Stränge hin.

#### 1.2.3 Die Prozessierung der RNA

Die Transkription erzeugt lange, polycistronische RNAs, auf denen die meisten m- und rRNA-Gene von tRNAs getrennt werden. Die Exzision der tRNAs erzeugt somit automatisch auch freie m- und rRNAs. Dies wird das tRNA-Punktuationsmodell genannt (Ojala, Montoya, & Attardi, 1981; Van Haute *et al.*, 2015). Ausnahmen sind die fehlenden Unterbrechungen zwischen *MT-ATP8*, *6* und *MT-CO3*, sowie zwischen *MT-ND4/4L*. Außerdem wird *MT-CO1* von nicht-codieren Regionen flankiert und *MT-ND5* und *MT-CYB* sind ebenfalls durch eine nicht codierende Region separiert (siehe in Abbildung 1.2).

#### 1.2.3.1 Endonukleolytische Spaltung der prä-RNA

Mitochondrial codierte Gene enthalten weder Introns, noch wird ihnen eine 5'-Cap-Struktur angehängt (Van Haute *et al.*, 2015). Nichtsdestotrotz durchlaufen auch mitochondriale RNAs einen komplexen Reifungsprozess. Dieser wird im Wesentlichen von zwei Enzym(-komplexen) katalysiert:

8

der RNase P und der RNase Z. Die RNase P entfernt präzise 5'-Fortsätze von tRNAs. Im Menschen sind zwei diskrete Enzyme bekannt, eines im Zellkern und eines in den Mitochondrien (Rossmanith et al., 1995). Eine hochkonservierte Gemeinsamkeit vieler RNasen von Prokaryoten bis hin zur humanen RNase P im Nukleus ist eine RNA als katalytisch aktives Zentrum. Für diese RNAs ist gezeigt worden, dass sie prä-tRNA auch dann korrekt schneiden, wenn keine Protein-Untereinheiten zugegen sind. Diese Entdeckung wird als Relikt einer RNA-Welt interpretiert, in der Nukleinsäuren katalytische Aufgaben übernommen haben, noch bevor die Evolution Proteine hervorgebracht hat (Guerrier-Takada et al., 1983; Joyce, 2002; Kikovska, Svard, & Kirsebom, 2007). Der Befund, dass die humane, mitochondriale RNase P ein Heterotrimer aus den drei (Protein-) Untereinheiten MRPP1-3 (mitochondrial RNase P protein 1-3) ist und ohne eine katalytisch aktive RNA auskommt, ist daher überraschend (Holzmann et al., 2008). MRPP1-3 sind nur gemeinsam in der Lage in vitro mitochondriale prä-tRNA zu spalten, wobei MRPP3 eine Metallonuklease ist und die endonukleolytische Spaltung der prä-tRNA durchführt (Reinhard, Sridhara, & Hallberg, 2015). Anhand der Kristallstruktur des Komplexes wird gegenwärtig angenommen, dass MRPP1 und MRPP2 eine Konformationsänderung in MRPP3 verursachen, welche es katalytisch aktiv werden lässt (Li et al., 2015; Reinhard et al., 2015).

Komplementär zur Entfernung von 5'-Fortsätzen durch RNase P schneidet die RNase Z die prä-tRNAs am 3'-Ende (Van Haute *et al.*, 2015), wobei die 3'-Prozessierung immer der zweite Schritt ist, da der Verlust der RNase P jede weitere Prozessierung inhibiert (Brzezniak *et al.*, 2011). Bakterielle Homologe der RNase Z werden durch zu lange 5'-Fortsätze inhibiert (de la Sierra-Gallay, Pellegrini, & Condon, 2005). Die humane, mitochondriale RNase Z ist die metallo-ß-Lactamase ELAC2, die differentiell sowohl im Nukleus, als auch in den Mitochondrien lokalisiert, verursacht durch alternierende Translation an zwei verschiedenen Start-Codons (Rossmanith, 2011). Die RNase Z schneidet RNA *in vitro* ohne die Anwesenheit weiterer Co-Faktoren (Rossmanith, 2011; Takaku *et al.*, 2003). Es gibt allerdings Hinweise, dass die Interaktion mit dem Protein PTCD1 (*pentatricopeptide repeat domain protein 1*) die Substratspezifität von ELAC2 verändert und damit *in vivo* die Prozessierung von einigen RNAs beeinflusst (Sanchez *et al.*, 2011). Ein *knockdown* von *Elac2* zeigt zwar eine Beeinträchtigung der 3'-Prozessierung vieler tRNAs, aber keinen vollständigen Verlust der maturen Spezies (Brzezniak *et al.*, 2011; Sanchez *et al.*, 2011). Neben ELAC2 könnte es folglich noch weitere unbekannte Mechanismen der 3'-Prozessierung von tRNAs geben.

Das tRNA-Punktuationsmodell ist gut dokumentiert, kann aber nicht alle RNA-Spaltungsereignisse erklären, weil es auch Gene im mitochondrialen Genom gibt, die nicht von tRNAs flankiert werden (siehe Abbildung 1.2). In diesen Fällen wird deutlich, dass die Prozessierung der mitochondrialen RNA noch nicht vollständig verstanden ist, weil hier noch kein zusammenhängender Mechanismus

9

aufgedeckt worden ist. In der mitochondrialen Matrix sind distinkte Foki identifiziert worden, in denen zahlreiche Komponenten der RNA-Prozessierung in großer Dichte funktional organisiert sind. Diese Strukturen werden RNA-Granula genannt und lösen sich bei transienter Inhibierung der Transkription auf (Iborra, Kimura, & Cook, 2004; Jourdain *et al.*, 2016; Jourdain *et al.*, 2013). Mit dem RNA-Bindeprotein GRSF1 (*G-rich sequence binding factor 1*) ist innerhalb dieser RNA-Granula ein Interaktionspartner der RNase P identifiziert worden (Antonicka *et al.*, 2013), dessen Verlust durch *knockdown* mit RNA-Interferenz die Prozessierung einiger prä-RNAs inhibiert, die keine tRNAs enthalten (Jourdain *et al.*, 2013). Ob GRSF1 dies alleine oder mit anderen Proteinen zusammen bewerkstelligt, ist derzeit unbekannt. Weitere Proteine, deren Verlust in einer Inhibition der Reifung einer oder mehrerer nicht-tRNA-flankierter prä-mRNAs resultiert, sind PTCD1, PTCD2 und FASTKD5 (Antonicka & Shoubridge, 2015; Sanchez *et al.*, 2011; F. Xu *et al.*, 2008). Zusammengenommen ist gegenwärtig unklar, ob die Prozessierung von prä-RNAs, die keine tRNAs enthalten, von eigenständigen RNasen katalysiert wird, oder die bereits bekannten Enzyme ihre Spezifität durch die Rekrutierung alternierender Co-Faktoren anpassen können.

#### 1.2.3.2 Reifung der mRNA

Dem 3'-Schneiden aller mRNAs des schweren Stranges folgt die Polyadenylierung (Ojala et al., 1981; R. J. Temperley et al., 2010). Nur für die einzige, dem leichten Strang entspringende mRNA (MT-ND6) ist noch keine Modifikation eindeutig gezeigt worden, weil das 3'-Ende dieses Gens noch nicht zweifelsfrei identifiziert worden ist (Slomovic et al., 2005). Die Länge der Polyadenylierung mitochondrialer Transkripte wird mit durchschnittlich 45 Nukleotiden angegeben; es gibt aber auch Ausnahmen, sowohl zwischen verschiedenen Transkripten innerhalb eines Zelltyps, als auch zwischen demselben Transkript in verschiedenen Zelltypen (Rorbach & Minczuk, 2012; R. J. Temperley et al., 2010). Das Enzym mtPAP (mitochondrial poly(A) polymerase) katalysiert die (Homo-)Polyadenylierung (Nagaike et al., 2005; Rorbach & Minczuk, 2012; Tomecki et al., 2004). Ein partieller knockdown von Mtpap mittels RNA-Interferenz senkt den Anteil aller polyadenylierten mitochondrialen Transkripte zugunsten einer wachsenden, oligoadenylierten Population. Es werden allerdings niemals vollständig deadenylierte Transkripte nachgewiesen (Tomecki et al., 2004), obwohl der Grad der Polyadenylierung als Gleichgewicht zwischen Adenylierung und Deadenylierung beschrieben wird (Nagaike et al., 2005; Rorbach, Nicholls, & Minczuk, 2011). Deswegen gibt es Spekulationen, wonach die Polyadenylierung ein Zwei-Schritt-Prozess sein könnte und mit mtPAP bislang nur das zweite Enzym bekannt ist (Rorbach & Minczuk, 2012). Denkbar ist aber auch, dass andere Enzyme den Verlust von mtPAP kompensieren können. Es ist gezeigt worden, dass das Enzym PNPase (polynucleotide phosphorylase) mitochondriale Transkripte in vitro polyadenyliert, obwohl die PNPase mit einer bakteriellen Deadenylase verwandt ist (Nagaike et al., 2005), die in Abhängigkeit von der

Phosphatkonzentration entweder den Auf- oder Abbau der Polyadenylierung katalysiert (Mohanty & Kushner, 2000). Zudem lokalisiert PNPase als peripheres Membranprotein im Intermembranraum und nicht in der Matrix und ihr partieller Verlust durch einen *knockdown* hat weder einen Einfluss auf den mitochondrialen mRNA-Spiegel, noch den Level der mitochondrial translatierten Proteine (Chen *et al.*, 2006; Nagaike *et al.*, 2005).

Unklar ist zudem der Nutzen der Polyadenylierung in Mitochondrien. Während die Polyadenylierung im Cytosol eukaryotischer Zellen mit einer Stabilisierung der mRNA assoziiert wird, ist sie in Bakterien und pflanzlichen Mitochondrien ein Signalgeber zur Degradation der mRNA (Beelman & Parker, 1995; Gagliardi & Leaver, 1999; O'Hara et al., 1995). In Hefen wiederum gibt es kein Homolog der mtPAP und keine Adenylierung der mitochondrialen Transkripte (Gagliardi et al., 2004). In Säuger-Mitochondrien ist eine klare Aussage nicht möglich. Eine kritische Funktion der Polyadenylierung für sieben der elf offenen Leserahmen ist die Vervollständigung des Stop-Codons (Van Haute et al., 2015), es werden aber auch mRNA-Transkripte polyadenyliert, die bereits über ein Stop-Codon verfügen (Tomecki et al., 2004). Der rekombinant herbeigeführte mitochondriale Import der cytosolischen Exoribonuklease PARN (poly(A)-specific ribonuclease) verhindert die Polyadenylierung und inhibiert die mitochondriale Translation in vivo (Wydro et al., 2010). Passend dazu senkt auch eine Überexpression der humanen mitochondrialen Deadenylase 2'-PDE (2' phosphodiesterase, auch PDE12) den Spiegel aller mitochondrial translatierten Proteine, obwohl gleichzeitig aber nur eine Subpopulation der mitochondrialen mRNAs direkt destabilisiert wird, während die Konzentration der übrigen Transkripte unverändert bleibt (Rorbach et al., 2011). Ein solches Ungleichgewicht der mitochondrialen Transkriptmengen mit Verlust, Anhäufung und Aufrechterhaltung jeweils einiger davon, ist auch in einem Patienten beobachtet worden, der eine einzige kritische homozygote Punktmutation in seinem Mtpap-Gen trägt, die das Enzym schwer beeinträchtig und zu einem schwerwiegendem respiratorischen Defekt führt (Wilson et al., 2014). Eine generelle Wirkung der Polyadenylierung als Schutz vor Degradation wird in Säuger-Mitochondrien deshalb ausgeschlossen (Nagaike et al., 2005; Tomecki et al., 2004). Zusammengefasst ist die Polyadenylierung von RNAs in Mitochondrien sehr komplex und ihre Rolle von zentraler Bedeutung für die mitochondriale Integrität, aber ein vollständiges Bild ihrer Funktion kann mit dem heutigen Stand der Forschung noch nicht gezeichnet werden.

# 1.2.3.3 Reifung der rRNA

Auch ribosomale RNAs durchlaufen einen Reifungsprozess, bei dem Nukleotide, die im Ribosom in räumlicher Nähe zu wichtigen funktionalen Einheiten sitzen werden, chemisch verändert werden. Sowohl die Anzahl dieser Modifikationen, als auch deren chemische Natur variieren zwischen den Spezies, wie auch zwischen Cytosol und Organellen (Decatur & Fournier, 2002). In Säugern codiert die

11

mtDNA für zwei rRNAs, die 12S-rRNA und die 16S-rRNA (siehe Abbildung 1.2). Beide werden nach dem tRNA-Punktuationsmodell (siehe Abschnitt 1.2.3) aus der prä-RNA ausgeschnitten und anschließend positionsspezifisch modifiziert.

Die 12S-rRNA wird an insgesamt fünf Nukleotiden modifiziert und bei allen handelt es sich um Monooder Dimethylierungen an den Basen Uracil, Adenin und Cytosin an konservierten Positionen der Primärstruktur (Baer & Dubin, 1981; Van Haute et al., 2015). Bis heute sind zwei Methyltransferasen mit der 12S-rRNA in Verbindung gebracht worden. TFB1M (mitochondrial transcription factor 1B) ist ein Interaktionspartner der mitochondrialen RNA-Polymerase und katalysiert an zwei hochkonservierten Adenosinen jeweils eine m<sup>6</sup><sub>2</sub>-A- Dimethylierung (Seidel-Rogol, McCulloch, & Shadel, 2003; Z. Xu et al., 2008). Der homozygote knockout von Tfb1m in Mäusen ist bereits für Embryonen letal und ein gewebespezifischer knockout zeigt, dass der Verlust dieser kritischen Dimethylierungen zu einer schweren Störung der Mitoribosom-Assemblierung und einer vollständigen Inhibierung der Translation führt (Metodiev et al., 2009). Die zweite Methyltransferase, NSUN4 (NOL1/NOP2/Sun domain family member 4), katalysiert ohne weitere Faktoren die  $m^{5}$ -C-Methylierung eines konservierten Cytosins (Camara *et al.*, 2011; Metodiev *et al.*, 2014). Auch der homozygote knockout von Nsun4 in Mäusen ist für Embryonen letal, während der gewebespezifische knockout zu einer Inhibierung der Mitoribosom-Assemblierung führt, mit der Konsequenz des Verlusts der Translation (Metodiev et al., 2014). Die Enzyme, die die zwei übrigen Methylierungen (positionsspezifisch je einmal m<sup>5</sup>-U und m<sup>4</sup>-C) katalysieren, sind noch nicht bekannt. Auch die 16S-rRNA wird post-transkriptional modifiziert, insgesamt an vier Positionen. Im Gegensatz zur 12S-rRNA allerdings sind nur drei davon Methylierungen, die sich zudem an der Riboseeinheit und nicht an den Basen von zweimal Guanosin und einmal Uridin befinden (Dubin & Taylor, 1978). Jede 2'-O-Ribose-Methylierung wird von einer eigenen Methyltransferase, MRM1-3 (mitochondrial rRNA methyltransferase 1-3), katalysiert (K. W. Lee & Bogenhagen, 2014). Der partielle knockdown von Ftsj2 (MRM2-Gen) und Rnmtl1 (MRM3-Gen) mit RNA-Interferenz beeinträchtigt die mitochondriale Translation in vivo stark (Rorbach et al., 2014). Die vierte Modifikation der 16S-rRNA ist eine Pseudouridinylierung (siehe Abschnitt 1.2.3.4) und damit die einzige Modifikation einer Base direkt (Ofengand & Bakin, 1997). Ein Kandidat für die Katalyse dieser Reaktion, die putative Pseudouridin-Synthase RPUSD4 (RNA Pseudouridylate Synthase Domain Containing 4), ist erst jüngst in mitochondrialen RNA-Granula identifiziert worden (Antonicka et al., 2017). RPUSD4 spielt eine direkte Rolle in der Pseudouridinylierung des kritischen Uracils in der 16S-rRNA und sein partieller knockdown durch RNA-Interferenz verursacht eine schwere Störung der Translation, während eine homozygote Deletion von *Rpusd4* letal ist (Antonicka *et al.*, 2017; Zaganelli *et al.*, 2017).

#### 1.2.3.4 Reifung der tRNA

Nach der Exzision aus der prä-RNA werden die tRNAs umfangreich modifiziert, der durchschnittliche Anteil modifizierter Basen in tierischen mt-tRNAs wird mit ca. 6% angegeben (Brule *et al.*, 1998). Obwohl die Modifikationspositionen in der Primärstruktur der Moleküle hoch konserviert sind, ist die Situation aufgrund der Vielzahl an möglichen Modifikationen hier besonders komplex (Powell *et al.*, 2015; Van Haute *et al.*, 2015).

Eine universelle Eigenschaft ausnahmslos aller tRNAs ist die 3-Nukleotid-Sequenz CCA an ihrem 3'-Ende. Das 3'-Adenin der CCA-Sequenz ist der Ort der Aminoacylierung (siehe Abschnitt 1.2.3.5) und systematische Veränderungen der CCA-Sequenz haben gezeigt, dass Mutationen sowohl das Risiko der Falschbeladung der tRNA steigern, als auch die Aminoacylierung und den Einbau der Aminosäure in naszierende Proteine schwer beeinträchtigen (J. C. H. Liu, Liu, & Horowitz, 1998; Nissen *et al.*, 1996; Tamura *et al.*, 1994). Zudem interagiert das 3'-Ende der tRNA inklusive der CCA-Sequenz transient mit einer rRNA der großen ribosomalen Untereinheit (Moazed & Noller, 1991; Nissen *et al.*, 2000). Es ist gezeigt worden, dass diese Interaktion durch Basenpaarungen zustande kommt und dass sie eine kritische Rolle für die Peptidyl-Transferase-Aktivität des Ribosoms spielt (Samaha, Green, & Noller, 1995; Tamura, 1994). In einigen Organismen ist die CCA-Sequenz bereits in der DNA codiert, die Mehrzahl aber fügt sie als post-transkriptionale Modifikation seinen tRNAs an. In Eukaryoten ist zudem auch die Nukleotidyl-Transferase, die die Reaktion katalysiert, hochkonserviert (Betat *et al.*, 2015). Im Menschen ist bislang nur ein Vertreter dieser Familie beschrieben worden, TRNT1 (*tRNA nucleotidyl transferase* 1), welcher sowohl cytosolische, als auch mitochondriale tRNAs modifiziert (Nagaike *et al.*, 2001).

Neben der CCA-Sequenz gibt es noch weitere Modifikationen, die in allen Organismen vorkommen. Die Pseudouridinylierung ( $\Psi$ ) ist die häufigste Modifikation an RNAs insgesamt (Ge & Yu, 2013) und ist auch in den tRNAs humaner Mitochondrien oft vertreten (siehe Abbildung 1.3). Sie entsteht durch Uracil in eine Isomerisierung von situ, was die Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrückenbindung ermöglicht und damit die Stabilität der Sekundärstrukturen der RNAs erhöht (Ge & Yu, 2013). Diese Reaktion wird von Pseudouridin-Synthasen katalysiert, die ihrerseits sehr positionsspezifisch agieren. Die Folge daraus ist, dass es in Organismen zahlreiche Vertreter dieser Familie gibt, im Menschen sind derzeit 13 beschrieben (Powell et al., 2015).

Eine weitere Modifikation von Uracil ist die Sättigung des Pyrimidinrings mit zwei Wasserstoffatomen. Das Resultat ist Dihydrouridin (D), welches anschließend die Flexibilität der tRNA erhöht (Dalluge *et al.*, 1996). In mitochondrialen tRNAs von Säugern ist eine Dihydrouridinylierung nur an einer einzigen Position bekannt (siehe Abbildung 1.3) und bislang nur für drei tRNAs, zweimal tRNA<sup>Leu</sup> und einmal tRNA<sup>Ser</sup> beschrieben worden (T. Suzuki & Suzuki, 2014).

Methylierungen sind ebenfalls sehr weit verbreitet, in den tRNAs humaner Mitochondrien sind sie sogar häufiger als Pseudouridinylierungen (siehe Abbildung 1.3). Die Funktion einer Methylierung ist sowohl abhängig von ihrer Position im Molekül, als auch von dessen räumlicher Struktur und kann deswegen nicht verallgemeinert werden. So ist zum Beispiel gezeigt worden, dass die humane mt-tRNA<sup>Lys</sup>, die an insgesamt sechs Positionen modifiziert wird, eine einzige Methylierung m<sup>1</sup>A9 benötigt, um ihre korrekte Sekundärstruktur auszubilden (Helm *et al.*, 1998; Helm, Giege, & Florentz, 1999). Eine andere Methylierung, die hochkonservierte Methylierung m<sup>1</sup>G37 der mt-tRNA<sup>Pro</sup>, wird mit einer Präzisionskontrolle der Translation in Verbindung gebracht, indem sie das Risiko einer Leserasterverschiebung senkt (Brule *et al.*, 1998; Urbonavicius *et al.*, 2001). Ein Enzym, das Methylierungen an tRNAs positionsspezifisch katalysiert, ist eine Untereinheit der mitochondrialen RNase P, MRPP1 (Phizicky & Hopper, 2010; Vilardo *et al.*, 2012). Diese duale Funktion von MRPP1 deutet an, wie eng die verschiedenen Prozesse in Mitochondrien miteinander verknüpft sind (siehe Abschnitt 1.2.3.1).

Ein hochkonservierter Sonderfall ist die Polymerisation eines Guanins (G<sup>-1</sup>) an das 5'-Ende der tRNA<sup>His</sup> vieler eukaryotischer Organismen (Powell *et al.*, 2015). Die Besonderheit dieser Reaktion ist die RNA-Polymerisation von 3' nach 5', im Menschen wird sie von THG1 (*tRNA-histidin guanylyltransferase 1*) katalysiert (Heinemann *et al.*, 2012). Die Funktion dieser Modifikation ist die Ausbildung einer nicht-kanonischen Sekundärstruktur der tRNA<sup>His</sup>, die die Histidin-aminoacyl-tRNA Synthethase benötigt, um die Beladung der tRNA mit Histidin effizient durchführen zu können (Himeno *et al.*, 1989; Nameki *et al.*, 1995).

Die Diversität der tRNA-Modifikationen ist noch weit größer, aber alle anderen bekannten befinden sich im Bereich des Anticodons, genauer entweder in Position 34 (der degenerierten dritten Base des Anticodons), und/oder in Position 37, unmittelbar hinter dem 3'-Ende desselben. Die chemisch sehr vielfältigen Modifikationen in Position 34 vergrößern die Anzahl an Codons, die von jeder einzelnen tRNA spezifisch erkannt werden können und haben mit den insgesamt 22 mitochondrialen tRNAs den kleinsten vollständigen Satz für die Translation erschaffen, der heute bekannt ist (Johansson et al., 2008; T. Suzuki & Suzuki, 2014). Ein Beispiel für eine Modifikation in Position 34 ist die einzige tRNA<sup>Met</sup> des mitochondrialen Systems (Anticodon CAU), die durch die Formylierung f<sup>5</sup>C befähigt wird, zusätzlich zum kanonischen AUG auch das Codon AUA zu binden (Bilbille et al., 2011). Weitere Modifikationsmöglichkeiten von Basen in diesen Positionen umfassen Thiolierung, Threonylcarbamylierung, die Addition von Taurin, Queuosin oder einer Isopentenylgruppe, sowie die Weiterverarbeitung letzterer durch eine Methionylthiotransferase (Powell et al., 2015; Van Haute et al., 2015). Viele dieser Modifikationen sind entdeckt worden, weil ihr Fehlen schwere Krankheitsbilder

verursacht (Powell *et al.*, 2015; Torres, Batlle, & de Pouplana, 2014). Ein Überblick über die derzeit bekannten Modifikationen bietet Abbildung 1.3.



**Abbildung 1.3:** Zusammenfassung aller bekannten Modifikationstypen und –positionen in humanen mitochondrialen tRNAs (Abbildung angepasst nach Powell *et al.* (2015). Dargestellt ist die allgemeine Kleeblatt-Sekundärstruktur einer tRNA mit Akzeptorarm (lila), D-Arm (blau), Anticodonarm (grün), variabler Region (braun) und T-Arm (grau). Die Kreise markieren die Modifikationspositionen. Die Kästchen geben den Typ der Modifikation an (m=Methylierung; Ψ=Pseudouridinylierung; D=Dihydrouridinylierung; tm=taurinomethyl-, S=Thiolierung; F=Formylierung; Q=Queuosin; t=threonylcarbamoyl-; i=isopentenyl-). Unter dem Typ ist – sofern bekannt – das für die Modifikation verantwortliche Enzym angegeben, die Ziffern außerhalb der Kästchen stehen für die genaue Position der modifizierten Base in der Primärstruktur. Die Kästchen sind rot, wenn das Fehlen der entsprechenden Modifikation mit einem Krankheitsbild verbunden ist und blau, wenn dies nicht der Fall ist.

#### 1.2.3.5 Aminoacylierung der tRNA

Eine grundlegende Voraussetzung für die Translation ist die Beladung der tRNAs mit ihren passenden Aminosäuren. Die tRNA-Aminoacylierung ist ein Zweischrittprozess. Der erste Schritt ist die Aktivierung der spezifischen Aminosäure durch ihre korrespondierende Aminoacyl-tRNA-Synthetase (AARS) unter Hydrolyse eines Adenosintriphosphats. Das Ergebnis ist ein Komplex aus einem Aminosäure-Adenylat und der AARS. Im zweiten Schritt rekrutiert die AARS die spezifische tRNA und

überträgt die Aminosäure in einer 3'-Esterifizierung kovalent auf die CCA-Sequenz der tRNA. Das Adenylat (Adenosinmonophosphat) wird dabei wieder frei (Ibba & Soll, 2000). Nach diesem Prinzip (illustriert in Schritt I-III in Abbildung 1.4) existiert für jede Aminosäure eine eigene AARS und die korrekte Beladung jeder tRNA ist somit eine wichtige Qualitätskontrolle in der Synthese neuer Proteine (Ling, Reynolds, & Ibba, 2009). Defekte in dieser Qualitätskontrolle verursachen schwere Krankheitsbilder (Konovalova & Tyynismaa, 2013). Die einzige bekannte Ausnahme in humanen Mitochondrien ist das Fehlen einer Glutaminyl-tRNA-Synthetase (GlnRS). Die korrekte Gln-tRNA<sup>Gln</sup> wird erzeugt, indem die mitochondriale Glutamyl-tRNA-Synthetase (GluRS) in einem ersten Schritt die Fehlbeladung Glu-tRNA<sup>Gln</sup> der tRNA<sup>Gln</sup> erzeugt, die in einem zweiten Schritt von der mitochondrialen Glu-tRNA<sup>Gln</sup>-Amidotransferase zur korrekten Gln-tRNA<sup>Gln</sup> korrigiert wird (Nagao *et al.*, 2009). Die fehlbeladene Glu-tRNA<sup>Gln</sup> zeigt dabei eine sehr schwache Affinität zu dem für den Einbau in das naszierende Protein verantwortlichen Faktor, weshalb die Translation von diesem Prozess nicht beeinträchtigt wird (Nagao *et al.*, 2009).

Eine Besonderheit ist die Derivatisierung von Methionin, dem universellen Initiator der Translation. In Prokaryoten und Organellen wird Methionin nach der Beladung auf die tRNA<sup>Met</sup> noch formyliert und erst damit wird die Proteinsynthese gestartet (Ibba & Soll, 2000; Sinha et al., 2014). Die Bildung von Met-tRNA<sup>Met</sup> wird von der Methionyl-tRNA-Synthetase (MARS) katalysiert. Anschließend erzeugt die Methionyl-tRNA-Formyltransferase (MTF) die Formylierung (f) mithilfe des Co-Faktors N10-Formyltetrahydrofolat (Ibba & Soll, 2000). Abbildung 1.4 zeigt in Schritt III-IV eine schematische Darstellung dieses Prozesses. In Bakterien existieren je zwei MARS und zwei tRNA<sup>Met</sup>, wodurch fMettRNA<sup>Met</sup> exklusiv für die Initiation verwendet wird und das unmodifizierte Met-tRNA<sup>Met</sup> für die Elongation. In humanen Mitochondrien hingegen gibt es nur jeweils eine MARS und eine tRNA<sup>Met</sup>. (Sinha et al., 2014; Spencer & Spremulli, 2004). Die derzeitige Theorie zur Unterscheidung der Methionin-Derivate für Initiation und Elongation basiert auf den Affinitäten der Co-Faktoren gegenüber der Modifikation von Methionin: Das für die Elongation verantwortliche EF-Tu<sub>mt</sub> bindet Met-tRNA<sup>Met</sup> mit hoher Affinität, während fMet-tRNA<sup>Met</sup> das bessere Substrat für den Initiationsfaktor IF-2<sub>mt</sub> ist. Direkt nach der Acylierung besteht nach heutigem Wissen eine Konkurrenzsituation zwischen EF-Tu<sub>mt</sub> und MTF (Spencer & Spremulli, 2004). Die Beladung der mitochondrialen tRNA<sup>Met</sup> war ein kritischer Aspekt für diese Arbeit, da die hier verwendete, nicht-kanonischen Aminosäure Homopropargylglycin (HPG) ein Methionin-Surrogat ist (siehe Abschnitt 1.3.2).



**Abbildung 1.4:** Aminoacylierung am Beispiel der tRNA<sup>Met</sup>. Methionin (blau) wird von dem Enzym Methionyl-tRNA-Synthetase (MARS, magenta) mittels Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP, grün) adenyliert (I). Das Zwischenprodukt ist ein Komplex aus MARS und dem Methionyl-Adenylat (grün), anorganisches Phosphat wird frei (II). MARS rekrutiert die tRNA<sup>Met</sup> (rot) und katalysiert die Esterifizierung am Adenosin der 3'-terminalen CCA-Sequenz der tRNA<sup>Met</sup> (siehe Abschnitt 1.2.3.5). Das Methionyl-Adenylat wird dabei gespalten und AMP wird frei. Die Esterifizierung der Ribose an der tRNA<sup>Met</sup> kann entweder am 2'-O oder am 3'-O geschehen, hier ist die 2'-O-Esterfizierung abgebildet (III). Das Enzym Methionyl-tRNA-Formyltransferase (MTF, magenta) rekrutiert die beladene tRNA und katalysiert die Formylierung von Methionin mit Hilfe des Co-Faktors N<sup>10</sup>-Formyltetrahydrofolat (FTHF, schwarz). Die Produkte sind fMet-tRNA<sup>Met</sup> und Tetrahydrofolat (THF, IV).

#### 1.2.4 Die Translation

#### 1.2.4.1 Die Struktur des Mitoribosoms

Intakte, mitochondriale Ribosomen (Mitoribosomen) aus Säugern werden historisch basierend auf ihrem Sedimentationsverhalten in Saccharose-Gradienten als 55S-Partikel beschrieben, die aus einer 39S-Großen Untereinheit und einer 28S-Kleinen Untereinheit bestehen (O'Brien, 1971). Heute ist bekannt, dass die Mitoribosomen von Säugern trotz ihrer bakteriellen Abstammung im Laufe der Evolution einen massiven Verlust von rRNAs bei gleichzeitigem Gewinn neuer Proteine erfahren haben, ein Prozess, welcher im Vergleich zum bakteriellen Ribosom zu einer Umkehr des Protein-zu-RNA-Verhältnisses geführt hat (Amunts et al., 2015; Sharma et al., 2003). Das Mitoribosom besteht aus 80 Proteinen und nur noch drei RNAs. Die große Untereinheit mtLSU (mitoribosomal large subunit) enthält die 16S-rRNA und die tRNA<sup>Val</sup>, die kleine Untereinheit mtSSU (*mitoribosomal small subunit*) trägt die 12S-rRNA (Amunts et al., 2015). Alle RNAs sind in der mtDNA codiert (siehe Abschnitt 1.2.1). Die 16S-rRNA hat, verglichen mit ihrem bakteriellen Homolog der 23S-rRNA, beinahe die Hälfte ihrer Länge durch Deletionen eingebüßt, was zusammen mit dem Gewinn an Proteinuntereinheiten die Kontaktfläche der rRNA mit dem umgebenden Lösungsmittel stark reduziert hat (A. Brown et al., 2014). Der Austrittstunnel der mtLSU, durch den die naszierenden Proteine das Mitoribosom verlassen, enthält mit vielen hydrophoben Aminosäuren eine Anpassung des Mitoribosoms an die ausschließlich hydrophoben Proteine, die hier translatiert werden (Amunts et al., 2015; A. Brown et al., 2014). Eine weitere Besonderheit der Säuger-Mitoribosomen ist das Fehlen der 5S-rRNA, die ansonsten in allen Organismen, selbst in Pflanzenmitochondrien, hochkonserviert ist (Ott et al., 2016). Dieser Verlust ist bemerkenswert, weil die 5S-rRNA einen zentralen Platz zwischen beiden Untereinheiten einnimmt und ein wichtiger Mediator in der Verknüpfung der katalytischen Zentren auf beiden Untereinheiten des Ribosoms ist (Dinman, 2005). Anstelle der 5S-rRNA befindet sich die tRNA<sup>Val</sup> zwischen mtLSU und mtSSU und könnte durch strukturelle Flexibilität im Verlauf der Translation das Fehlen der 5S-rRNA teilweise kompensieren (A. Brown et al., 2014). Eine andere Studie hat eine tRNA<sup>Phe</sup> mit der mtLSU eines Schweine-Mitoribosoms assoziiert gezeigt (Greber, Boehringer, Leibundgut, et al., 2014). Die Inkorporation der tRNA<sup>Val</sup> oder tRNA<sup>Phe</sup> könnte ihrer Position in der mtDNA geschuldet sein, wo beide die 12S- und 16S-rRNA-Gene flankieren (Anderson et al., 1981). Nach ihrer Transkription und Exzision aus der prä-RNA nach dem tRNA-Punktuationsmodell (siehe Abschnitt 1.2.3) würden sie in stöchiometrischen Mengen mit den rRNAs vorliegen (A. Brown et al., 2014).

#### 1.2.4.2 Die Initiation der Translation

Für die Initiation der Translation benötigen die Mitochondrien neben dem Mitoribosom, den prozessierten mRNAs, der aminoacylierten- und formylierten fMet-tRNA<sup>Met</sup> noch weitere Co-Faktoren.

IF-2<sub>mt</sub> und IF-3<sub>mt</sub> (*mitochondrial initiation factor 2&3*) sind die beiden bekannten Initiationsfaktoren in Säugern (Koc & Spremulli, 2002; Liao & Spremulli, 1990). Diese Nomenklatur basiert auf Homologen im bakteriellen System, in welchem drei Faktoren bekannt sind. IF-1, das in Bakterien essentiell ist und die Bindung der Initiator-tRNA an die mRNA stabilisiert, fehlt in Säugern und seine Funktion wird von IF-2<sub>mt</sub> übernommen (Gaur *et al.*, 2008). Die Mechanismen, die zur Erkennung der mRNAs führen, sind noch unbekannt. Humane mitochondriale mRNAs besitzen maximal drei Nukleotide 5' vor dem eigentlichen Start-Codon und demnach keine regulatorischen Elemente wie die Shine-Dalgarno-Sequenz in Bakterien (Ott *et al.*, 2016). Sie besitzen auch keine 5'-Kappe wie cytosolische Transkripte. Es ist gezeigt worden, dass gerade diese Abwesenheit von 5'-Verlängerungen von Bedeutung für die Translationsinitiation in humanen Mitochondrien ist, weil die mtSSU 5'-terminale Start-Codons internen Start-Codons vorzieht und die künstliche 5'-Verlängerung von mRNA-Fragmenten die Bildung des Initiationskomplexes stark beeinträchtigt (Christian & Spremulli, 2010).

Christian und Spremulli (2012) fassen den heutigen Wissenstand des Initiationsprozesses zusammen: Zunächst werden mtLSU und mtSSU durch IF-3<sub>mt</sub> voneinander getrennt, was der mRNA das Einfädeln in die mtSSU durch eine proteinreiche Eintrittsregion ermöglicht. IF-2<sub>mt</sub> ist eine GTPase, die die fMettRNA<sup>Met</sup> rekrutiert und deren Codon-Paarung mit dem Start-Codon in der Peptidyl-Stelle (P-Stelle) des Mitoribosoms vermittelt. Scheitert diese Vermittlung, passiert die mRNA die mtSSU und der Beladungsprozess beginnt von neuem. Ist die Platzierung der fMet-tRNA<sup>Met</sup> erfolgreich, folgt die Dissoziation von IF-3<sub>mt</sub>, was mtSSU und mtLSU wieder zusammenbringt. IF-2<sub>mt</sub> wird unter GTP-Verbrauch ebenfalls wieder freigesetzt und die Elongation der Peptidkette kann folgen.

#### 1.2.4.3 Elongation, co-translationale Insertion und Termination

Das universelle Prinzip der Proteinsynthese am Ribosom ist, dass die mRNAs in der SSU zwei Codons präsentiert, das erste der Peptidyl- und das zweite in der Aminoacyl-Stelle (P- und A-Stelle). Der Präsentation folgt sequentiell das von Elongationsfaktoren vermittelte Binden der aminoacylierten tRNAs in der P- und dann in der A-Stelle. Anschließend katalysiert eine rRNA in der LSU die Entstehung der Peptidbindung, bei der die Carbonyl-Gruppe der Aminosäure in der P-Stelle von der Aminogruppe der Aminosäure in der A-Stelle angegriffen wird, was zu der Deacylierung der tRNA in der P-Stelle führt. Ein Elongationsfaktor transloziert daraufhin GTP-abhängig mRNA und tRNA, wobei die deacylierte tRNA zu Exit-Stelle (E-Stelle) gelangt, von wo aus sie wieder freigegeben wird. Die A-Stelle indes wird gemäß des folgenden mRNA-Codons von der nächsten aminoacylierten tRNA okkupiert. Von diesem Schema weicht auch das Mitoribosom von Säugern nicht ab, die Kristallstruktur bestätigt das Vorhandensein von A-, P- und E-Stelle in der mtLSU (Greber, Boehringer, Leibundgut, *et al.*, 2014). Dennoch gibt es in der Komposition und räumlichen Zusammensetzung des Proteingerüsts um die

katalytischen Zentren starke Veränderungen im Vergleich zu bakteriellen Ribosomen, die als

19

Anpassungen der hohen Strukturvariabilität humaner mt-tRNAs interpretiert werden (A. Brown *et al.*, 2014). Die Ausbildung der Peptidbindung wird von einer rRNA in der großen ribosomalen Untereinheit katalysiert, in Bakterien von der 23S-rRNA (Beringer & Rodnina, 2007; Samaha *et al.*, 1995). Ihr mitochondriales Homolog ist die 16S-rRNA und deren Position in der mtLSU ist ein starker Hinweis darauf, dass sie im Mitoribosom die Peptidyl-Transferase-Aktivität ausübt. Ein direkter, experimenteller Beweis dafür ist aber noch nicht erbracht worden.

Alle Translationssysteme haben gemein, dass sie mit den Elongationsfaktoren weitere Co-Faktoren brauchen, die das Zusammenspiel von Ribosom, mRNA und tRNA koordinieren. Drei Co-Faktoren, EF-Tu<sub>mt</sub>, EF-Ts<sub>mt</sub> und EF-G1<sub>mt</sub> (EF = *elongation factor*), kontrollieren die Elongation in humanen Mitochondrien und alle finden sich auch konserviert in Bakterien (Ott *et al.*, 2016). EF-Tu bindet die aminoacylierte tRNA an der konservierten CCA-Sequenz, noch bevor diese auf das Mitoribosom geladen wird (J. C. H. Liu *et al.*, 1998). In Bakterien bilden tRNA und EF-Tu zusammen mit GTP einen dreiteiligen Komplex (*ternary complex*), der zum Ribosom rekrutiert wird, von dem EF-Tu durch die Hydrolyse von GTP wieder dissoziiert (Andersen *et al.*, 2000; Nissen *et al.*, 1996). EF-Ts ist ein Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor, der EF-Tu anschließend wieder neu belädt. In den Mitochondrien von Säugern hingegen bilden mt-EF-Tu und mt-EF-Ts ein Heterodimer (Schwartzbach & Spremulli, 1989). Der dritte Faktor, EF-G1<sub>mt</sub>, ist ebenfalls hoch konserviert und koordiniert und katalysiert GTP-abhängig die Translokation von mRNA und tRNA auf dem Ribosom (Bhargava, Templeton, & Spremulli, 2004).

Das naszierende Protein verlässt die mtLSU durch den hydrophoben Austrittstunnel und wird unmittelbar in die innere mitochondriale Membran inseriert (Ott & Herrmann, 2010). Ein erheblicher Anteil der Mitoribosomen ist mit der inneren mitochondrialen Membran (IM) assoziiert (M. Q. Liu & Spremulli, 2000). Nahe am Austrittstunnel sitzt die mtLSU-Untereinheit mL45, welche als Ankerprotein für die mtLSU in der IM gilt (Greber, Boehringer, Leibundgut, *et al.*, 2014; Greber, Boehringer, Leitner, *et al.*, 2014). Dieser Kontakt zur IM ermöglicht es einer Insertase, das naszierende Protein direkt zu übernehmen, zu inserieren und die Faltung zu koordinieren. Die Proteine Oxa1p (Hefe-Mitochondrien), Alb3 (Chloroplasten) und YidC (Bakterien) sind eine Familie funktioneller Homologe, die diese Aufgabe übernehmen (Saller *et al.*, 2012). In Säugern ist es Oxa1L, ein integrales Membranprotein der IM, dessen C-Terminus in der mitochondrialen Matrix direkt mit Untereinheiten des Austrittstunnels des Mitoribosoms interagiert (Haque *et al.*, 2010). Der *knockdown* von *Oxa1L* mit RNA-Interferenz senkt die Mengen von Komplex I und Komplex V, beeinflusst aber nicht Komplex III und Komplex IV (Stiburek *et al.*, 2007). Dieser Befund deutet an, dass Oxa1L nur für die Insertion einer Subpopulation der mitochondrialen Proteine relevant ist und dass möglicherweise andere noch unbekannte Proteine ebenfalls in diesen Prozess involviert sind.

Erreicht ein Stop-Codon auf der mRNA die A-Stelle des Ribosoms, wird die Translation terminiert. Terminationsfaktoren sind Proteine, die direkt mit dem Stop-Codon interagieren, es wird keine tRNA mehr benötigt. Ist die Bindung des Terminationsfaktors erfolgt, gelangt eine ihrer Domänen mit der universell konservierten Sequenz GGQ in das Peptidyl-Transferase-Center und hydrolysiert die Esterbindung zwischen der letzten tRNA und dem neuen Protein (Chrzanowska-Lightowlers, Pajak, & Lightowlers, 2011). Ob direkt oder durch Leserasterverschiebungen, in humanen Mitochondrien werden alle 13 offenen Leserahmen vom Stop-Codon UGA terminiert (siehe Abschnitt 1.2.1). Konsequenterweise ist mit mtRF1a (*mitochondrial release factor 1a*) ein Protein identifiziert worden, welches die Translation aller 13 mitochondrialen Proteine terminiert (Soleimanpour-Lichaei *et al.*, 2007). Darüber hinaus sind in humanen Mitochondrien noch drei weitere, essentielle Mitglieder dieser Proteinfamilie bekannt, deren Funktion allerdings noch nicht verstanden ist (Chrzanowska-Lightowlers *et al.*, 2011).

#### **1.3** Experimenteller Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese

#### 1.3.1 Der klassische Nachweis mit Isotopen

Der klassische Nachweis von Proteinsynthese wird mittels radioaktiv markierten Aminosäuren erbracht. Eine sehr frühe Arbeit zeigt für Lebergewebe aus der Ratte, dass radioaktive Aminosäuren nach der Lyse des Gewebes und anschließender differentieller Zentrifugation in mikrosomalen Fraktionen angereichert ist, die - nach heutigem Wissen - die cytosolischen Ribosomen enthält (Keller, 1951). Durch kontinuierliche Verbesserungen der Verfahren ist in Folgearbeiten eine Anreicherung von <sup>14</sup>C-Derivaten der Aminosäuren Leucin, Valin und Phenylalanin zusätzlich zur mikrosomalen Fraktion auch in der mitochondrialen Fraktion beschrieben worden (Mclean et al., 1958; Roodyn, Reis, & Work, 1961). Heute gängige Trennverfahren wie die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Davis, 1964; Laemmli, 1970; Ornstein, 1964) waren damals noch unbekannt. So gehört zu den ersten Hinweisen auf mitochondriale Proteinsynthese der Nachweis radioaktiver Aminosäuren in Peptid-Fraktionen nach partieller saurer Hydrolyse (Askonas et al., 1955) und Papier-Chromatographie von mitochondrialen Fraktionen (Mclean et al., 1958). Zudem ist gezeigt worden, dass mitochondriale Fraktionen radioaktive Aminosäuren auch dann anreichern, wenn sie erst nach der Subfraktionierung damit in Kontakt kommen, solange die oxidative Phosphorylierung intakt ist (Roodyn et al., 1961). Außerdem sind radioaktive Aminosäuren nach der Lyse der mitochondrialen Fraktion nahezu vollständig mit der Membranfraktion präzipitiert und nicht länger im wässrigen Überstand detektiert worden (Roodyn, Suttie, & Work, 1962). Der Befund, dass der Proteinsynthese-Inhibitor Chloramphenicol die Anreicherung der radioaktiven Aminosäuren zwar in der mitochondrialen, nicht aber der mikrosomalen Fraktion verhindert, ist eine frühe Differenzierung der zwei parallelen Translationssysteme (Mager, 1960), noch bevor die Existenz der mitochondrialen

Proteinsynthese allgemein akzeptiert war. Tatsächlich hielt sich der Vorwurf die angeblich mitochondriale Proteinsynthese sei eine Kontamination mit Bakterien noch einige Zeit (Sandell, Low, & Vonderde.A, 1967).

Heute gehört der Einsatz translationshemmender Antibiotika zur Routine in der Differenzierung von cytosolischer und mitochondrialer Proteinsynthese. Chloramphenicol bindet selektiv und reversibel die große Untereinheit mitochondrialer und bakterieller Ribosomen und inhibiert die Ausbildung der Peptidbindung (Vazquez, 1974). Ein Derivat davon, Thiamphenicol, ist effizienter und wurde in dieser Arbeit eingesetzt (Ferrari, 1984). Umgekehrt kann auch die cytosolische Proteinsynthese selektiv gehemmt werden (Mahler, 1973; Vazquez, 1974). Beispiele die auch in dieser Arbeit eingesetzt wurden sind Cycloheximid und Emetin. Cycloheximid bindet an die große Untereinheit cytosolischer Ribosomen, stabilisiert die tRNA in der A-Stelle und bewirkt somit eine Verhinderung von deren Translokation (Jimenez, Carrasco, & Vazquez, 1977). Emetin hingegen kompetiert mit einem Elongationsfaktor um die Bindung an die kleine Untereinheit des cytosolischen Ribosoms und führt damit ebenfalls zu einer Stagnation der Translation (Jimenez *et al.*, 1977). Im Gegensatz zu Cycloheximid ist der Einfluss von Emetin irreversible (Grollman, 1968).

#### 1.3.2 Limitierungen und nicht-kanonische Aminosäuren als Alternativen

Im Gegensatz zu den <sup>14</sup>C-Aminosäure-Derivaten der frühen Studien ist heute das <sup>35</sup>S-Derivat von Methionin die gebräuchlichste Sonde zur Untersuchung mitochondrialer Proteinsynthese und mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können die Syntheseprodukte per Autoradiographen visualisiert werden (Chomyn, 1996; Jeffreys & Craig, 1976). Durch den Einsatz von <sup>35</sup>S-Methionin besteht eine nahezu identische Struktur zwischen der kanonischen Aminosäure und der Sonde, die räumliche Ladungsverteilung des Moleküls sollte optimal mit dem lebenden System kompatibel sein (siehe Abbildung 1.5), obwohl natürlich der Nachteil des radioaktiven Zerfalls besteht, der besondere Herausforderungen an die Arbeit mit dieser Aminosäure mit sich bringt. Ein weiterer Nachteil von <sup>35</sup>S-Methionin ist, dass abseits vom Autoradiographen keine Visualisierungsmöglichkeiten bestehen. Nicht-kanonische Aminosäuren hingegen, die anstelle einer natürlichen in naszierende Proteine eingebaut werden, bieten die Chance, chemisch einzigartige funktionelle Gruppen in die Proteine einzuführen und sind selbst dann noch in der Praxis anwendbar, wenn sie ein ca. 2000x schwächeres Substrat für die tRNA-Synthetase sind als die eigentliche Aminosäure (Kiick & Tirrell, 2000). Zwei derartige heute etablierte Derivate sind L-Azidohomoalanin (AHA) und L-Homopropargylglycin (HPG, alternativer Name 2-amino-5-hexynoic-acid, siehe Abbildung 1.5). Beide sind Methionin-Surrogate, werden von der methionyl-tRNA-Synthetase in Escherichia Coli aktiviert und in naszierende Proteine eingebaut (Kiick et al., 2002; van Hest, Kiick, & Tirrell, 2000). AHA ist dabei ein ca. 390x, HPG ein etwa 500x schwächeres Substrat für die methionyl-tRNA-Synthetase als Methionin selbst (Kiick et al., 2002;

Kiick, Weberskirch, & Tirrell, 2001). Auch die cytosolische methionyl-tRNA-Synthetase von Säugerzellen aktiviert AHA und HPG, was zu einem Einbau beider Derivate in Proteine führt (Beatty & Tirrell, 2008).



**Abbildung 1.5:** Vergleich der Aminosäuren. **a)** L-Methionin. **b)** L-Azidohomoalanin (AHA). **c)** L-Homopropargylglycin (HPG). Durch Einbau dieser Aminosäuren anstelle von Methionin in naszierende Proteine werden terminale Azide bzw. Alkine in die Proteine eingeführt, die anschließend mit kupferkatalysierter 1,3-dipolarer Cycloaddition nachgewiesen werden.

Die Molekularstruktur der nicht-kanonischen Aminosäuren weicht natürlich von Methionin ab, weshalb davon auszugehen ist, dass weder AHA noch HPG Methionin vollständig ersetzen können. So ist gezeigt worden, dass *E. coli* nicht anwachsen kann, wenn zum Zeitpunkt der Inokulation kein echtes Methionin zugegen ist (van Hest *et al.*, 2000). Dieser Nachteil ist aber nicht zwangsläufig die Konsequenz einer proteinstrukturellen Inkompatibilität, weil die Aminosäure Methionin auch abseits von der Proteinsynthese Substrat für biochemische Prozesse in der Zelle ist und diese Funktionen nicht komplementiert werden können. Methionin ist zum Beispiel ein Ausgangsstoff für S-adenosyl-Methionin, das wiederum ein wichtiges Substrat für rRNA-Methylierungen ist (Seidel-Rogol *et al.*, 2003). Da rRNA-Methylierungen kritisch sind (siehe Abschnitt 1.2.3.3), könnten Zellen auch dann nicht ohne Methionin wachsen, wenn alle Proteine seine Substitution verzeihen würden. Letztlich sind es die von HPG und AHA eingeführten funktionalen Gruppen, die die nicht-kanonischen Aminosäuren so interessant machen: Das Azid (AHA) und das Alkin (HPG) sind die für die Kupfer-katalysierte Huisgen-Reaktion notwendigen Gruppen, die die gezielte Modifikation einer definierten Proteinpopulation ermöglichen, etwa für biochemische Aufreinigungen oder Visualisierung *in situ* in intakten Zellen.

# 1.4 Die Kupfer-katalysierte Huisgen-Reaktion

Die Fähigkeit organischer Azide mit Kohlenstoffmehrfachbindungen in einer 1,3-dipolaren Cycloaddition zu Triazolen zu reagieren wird als Huisgen-Reaktion bezeichnet (Meldal & Tornoe, 2008). Sie ist bereits seit Jahrzehnten bekannt (Huisgen, Szeimies, & Mobius, 1967). Die Huisgen-Reaktion läuft zwischen organischen Aziden und sowohl Alkenen als auch Alkinen ab, ist aber bei Raumtemperatur sehr ineffizient (Huisgen *et al.*, 1967). Große Beachtung findet diese Reaktion allerdings, seit zu Beginn des Jahrtausends zwei Gruppen unabhängig voneinander beschrieben haben, dass die Gegenwart von Kupfer der Oxidationsstufe eins (Cu<sup>+</sup>) als Katalysator die Effizienz der Reaktion drastisch erhöht und sie unabhängig von Temperatur und pH-Wert auch im wässrigen Milieu ablaufen lässt (Meldal & Tornoe, 2001; Rostovtsev *et al.*, 2002; Tornoe, Christensen, & Meldal, 2002).

Heute ist die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) zwischen einem organischen Azid und einem terminalen Alkin (schematisch dargestellt in Abbildung 1.6) eine weitverbreitete Methode, um eine entsprechend modifizierte Probe zügig und mit hoher Effizienz kovalent mit einer funktionalisierten Sonde zu verbinden (Hein & Fokin, 2010; Liang & Astruc, 2011; Meldal & Tornoe, 2008).



Abbildung 1.6: Prinzip der der kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition (CuAAC) zwischen einem terminalen Alkin (rot) und einem organischen Azid (blau).

# 1.4.1 Der Reaktionsmechanismus der CuAAC

Das breite Anwendungsspektrum der CuAAC hat auch den Reaktionsmechanismus selbst ins Zentrum der Aufmerksamkeit gerückt. Daraus resultieren viele Studien, die sich mit dessen Details beschäftigen (Bock, Hiemstra, & van Maarseveen, 2006; Hein & Fokin, 2010; C. L. Wang et al., 2016). Mittlerweile existiert ein detailliertes Modell vom Ablauf des katalytischen Zyklus (Worrell, Malik, & Fokin, 2013). Dieser beginnt mit dem terminalen Alkin, das von einem Cu<sup>+</sup>-Ion angegriffen wird. Der reversible Angriff senkt den pK<sub>s</sub> des Alkins derart (Himo et al., 2005), dass es selbst im stark sauren Milieu deprotoniert wird (Mykhalichko, Temkin, & Mys'kiv, 2000). Das Resultat ist die Bildung eines ersten Intermediats, dem Cu-Acetylid (a in Abbildung 1.7), indem Cu eine stabile σ-Bindung mit dem Alkin eingeht und dies daraufhin deprotoniert wird. Ist die Deprotonierung erfolgt, ist das Cu-Acetylid stabil. Der nächste Schritt erfordert ein weiteres freies Cu<sup>+</sup>-Ion, das über eine schwächere  $\pi$ -Bindung mit der negativ geladenen Dreifachbindung des Cu-Acetylids interagiert und durch gleichzeitige Interaktion einem Azid dieses in räumliche Nähe koordiniert (b in Abbildung 1.7). Auch dieser Vorgang ist reversibel. Nun folgt eine Komplexbildung, die zu der eigentlichen Cycloaddition führt. Zunächst greift das N-3-Atom des Azids das ß-Kohlstoffatom des Alkins nukleophil an, was zu der Ausbildung der ersten kovalenten Bindung und damit zum nächsten Intermediat führt. Dies hat die Oxidation eines Kupfer-Zentrums zur Folge, energetisch stabilisiert vom zweiten Kupfer-Zentrum. Die Oxidation schwächt die Interaktion des Kohlenstoffatoms mit dem Kupferzentrum, was wiederum eine Umbildung der Cu–σ–C- Bindung auf das jeweils zweite Kupfer-Ion zur Folge haben kann. Der nächste Schritt ist die Ausbildung der zweiten kovalenten N–C–Bindung und damit die eigentliche Ringbildung. Das nicht o-C gebundene Kupfer-Ion verlässt daraufhin den Komplex, wobei für jedes der zwei involvierten Kupfer-Ionen die gleiche Wahrscheinlichkeit besteht. Das resultierende stabile Triazolid-Intermediat (c in Abbildung 1.7) ist der bereits vollständige Heterocyclus, der aber noch immer ein

σ-gebundenes Cu-Atom am C-5 enthält. Im letzten Schritt wird das Produkt der Reaktion (**d** in Abbildung 1.7) durch Konsum eines Protons frei und Kupfer gelangt wieder als Cu<sup>+</sup> in Lösung.

Die CuAAC ist eine hochspezifische und schnelle Reaktion, wenn die beiden Edukte (Azid und Alkin) in ausreichender Menge und gleichen Konzentrationen vorhanden sind. Der Blick auf das Modell des Reaktionsmechanismus zeigt aber, dass die Reaktion zahlreiche Gleichgewichte zwischen verschiedenen Intermediaten enthält. Wird die CuAAC im hochkomplexen Kontext biologischer Fragestellungen angewendet, in denen z.B. die Ausgangskonzentration eine der beiden funktionalen Gruppen nicht mehr direkt kontrolliert werden kann, wird ihr Einsatz schnell sehr anspruchsvoll.



**Abbildung 1.7:** Modell des Reaktionsmechanismus der Cu-katalysierten, 1,3-dipolaren Cycloaddition (CuAAC) dargestellt nach Worrell *et al.* (2013). Die Reaktion benötigt zwei Kupfer-Ionen. Das erste stabile Intermediat ist das Cu-Acetylid (a), das mit einem zweiten Kupfer-Ion interagieren muss (b) damit sich das Triazolid (c) aus Alkin und Azid bilden kann. Das Produkt der Reaktion (d) ist eine sehr stabile, heterocyclische Verknüpfung zwischen den beiden Zielmolekülen (R und R<sub>2</sub>).

# 1.4.2 Anwendungen in der biologischen Forschung

Werden die bioorthogonalen funktionalen Gruppen in ein lebendes System eingeführt, erlauben sie nachträglich vielseitige Modifikationen (Best, 2009). Im Falle der CuAAC setzt dies eine Fixierung der Proben voraus, da der Katalysator Kupfer cytotoxisch wirkt (Cao *et al.*, 2012). Analog zu den nichtkanonischen Aminosäuren führt zum Beispiel das künstliche Nukleotid EdU (*5-ethynyl-2'deoxyuridine*) ein Alkin in die DNA ein und wird verwendet, um die DNA-Synthese nachzuweisen (Salic & Mitchison, 2008). EdU ist auch bereits verwendet worden, um die Subpopulation neu synthetisierter DNA biochemisch aufzureinigen (Kliszczak *et al.*, 2011). Der Einsatz nicht-kanonischer Aminosäuren wiederum ist ein wertvolles Werkzeug für die Untersuchung von Protein-Subpopulationen. Die Proteom-Forschung profitiert von diesem Ansatz, indem die Ziel-Proteine direkt mit einem Anhang für

Affinitätsaufreinigungen, etwa einem Biotin-Derivat, markiert werden. Auf diese Weise kann die markierte Fraktion direkt abgetrennt und massenspektrometrisch analysiert werden. Dieses Verfahren, BONCAT (*bioorthogonal noncanonical amino acid tagging*) genannt, ist bereits erfolgreich für die Untersuchung cytosolischer Proteinsynthese in humanen Zellen eingesetzt worden (Dieterich *et al.*, 2007; Dieterich *et al.*, 2006). Nachfolgende Arbeiten haben das Potential dieser Methode noch weiter ausgeschöpft, indem nicht nur der biochemische Ansatz für die Massenspektrometrie durchgeführt wurde, sondern zusätzlich eine Markierung der Proteine in situ mithilfe von Fluoreszenzsonden durchgeführt wurde (Dieterich *et al.*, 2010). Dieses Vorgehen, FUNCAT (*FlUorescent Non–Canonical Amino acid Tagging*), ist bereits zur Markierung von Proteinsynthese in Säuger-Neuronen (Dieterich *et al.*, 2010) und in Zebrafisch-Larven eingesetzt worden (Hinz *et al.*, 2012). Bis heute sind viele Arbeiten mit nicht-kanonischen Aminosäuren veröffentlicht worden, die sich mit der cytosolischen Proteinsynthese in eukaryotischen Zellen, oder mit der bakteriellen Proteinsynthese beschäftigen. Die mitochondriale Proteinsynthese ist bislang jedoch nicht berücksichtigt worden.

# 1.5 Ausblick/Zielsetzung

Das Ziel dieser Arbeit ist die Etablierung eines Nachweissystems mitochondrialer Proteinsynthese mithilfe nicht-kanonischer Aminosäuren. Der Vorteil dieser gegenüber der klassischen Methode mit radioaktiven Isotopen ist die Vielfältigkeit der möglichen Folgeanalysen. Durch Funktionalisierung der Sonde mit Azid oder Alkin kann eine Vielzahl kleiner Moleküle an die Zielproteine gekoppelt werden, die nicht nur proteinbiochemische, sondern auch fluoreszenzmikroskopische Analysen ermöglichen. In dieser Arbeit soll mit proteinbiochemischen Methoden der Einbau der nicht-kanonischen Aminosäuren in mitochondriale Translationsprodukte nachgewiesen und mithilfe der massenspektrometrischen Analyse bestätigt werden. Diese Arbeit soll das Fundament legen, um mit hochauflösender Fluoreszenzmikroskopie die räumliche und zeitliche Verteilung der mitochondrialen Proteinsynthese *in situ* untersuchen zu können.

#### 2 **Material und Methoden**

#### 2.1 Puffer und Reagenzien

#### Puffer, Lösungen und pH-Wert 2.1.1

Alle Puffer und Lösungen wurden mit Reinstchemikalien (analytical grade) angesetzt und in 18,2 MΩ Reinstwasser (Purelab Classic, ELGA LabWater, Celle, Deutschland) gelöst. Salzhaltiger Phosphatpuffer (PBS, phosphate buffered saline, siehe Tabelle 2.1) wurde methodenübergreifend als Waschpuffer eingesetzt. Alle weiteren Chemikalien waren methodenspezifisch und sind entsprechend aufgeführt. Tabelle 2.2 gibt eine Übersicht der in dieser Arbeit häufig verwendeten Puffer und ihrer pK<sub>s</sub>-Werte. Zur Einstellung des pH-Werts von Lösungen wurde ein Basic Meter PB-11 (Sartorius, Göttingen, Deutschland) mit der Standardelektrode PY-P11 verwendet. Für die Messung und Einstellung kleiner Volumina in 1,5 ml Reaktionsgefäßen stand eine Mikroelektrode (Blue Line 16 pH, SI Analytics, Mainz, Deutschland) zur Verfügung. Das pH-Meter wurde vor jeder Messung mit Technischen Puffer-Lösungen (pH 4, 7 und 10, Mettler-Toledo AG, Schwerzenbach, Schweiz) kalibriert.

Tabelle 2.1: Rezept der PBS-Stammlösung. Die Reihenfolge der Auflistung der Salze entspricht der Zugabereihenfolge zu etwa 70% des Endvolumens an Wasser. Es wurde immer gewartet, bis sich ein Salz gelöst hatte, ehe das nächste zugesetzt wurde.

Chemikalien	20x Stammlösung	Endkonzentration in 1x PBS
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	35,59 g	10 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4,79 g	1,76 mM
KCI	3,95 g	2,68 mM
NaCl	160,12 g	137 mM
H <sub>2</sub> O	ad 1 I,	ad 1 l, pH 7,4
	0,2 μm sterilfiltriert	

.

Abkürzung	Name	pKs	Literatur	Hersteller
CAPSO	3-(Cyclohexylamino)-2- hydroxy-1-propansulfonsäure	9,60	McGregor <i>et al</i> . (1996), Roy <i>et al.</i> (1997), Szewczyk und Kozloff (1985)	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
Acetat	/	4,76		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
MOPS	3- (N-Morpholino)- propansulfonsäure	7,20	Stoll und Blanchard (1990)	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA
Phosphat	/	2,15; 7,2; 12,33		Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)- 1,3-propandiol	8,06		VWR Chemicals, Leuven, Belgien

Tabelle 2.2: Puffer und ihre pK<sub>s</sub>-Werte.

# 2.1.2 Antikörper

In dieser Arbeit wurde eine große Anzahl an Antikörpern sowohl für Immunfluoreszenz als auch im Western Blot verwendet. In Tabelle 2.3 sind die Primärantikörper aufgelistet. Tabelle 2.4 listet die Sekundärantikörper auf.

Antigen	Wirtspezies	Verdünnung	Anwendung	Katalog-Nr.	Hersteller	
Alexa488	Kaninchen, polyklonal	1:200	IF,WB	A11094	Thermo Fisher	
Biotin	Maus, monoklonal, BTN.4	1:500	WB	MA5-11251	Scientific, Waltham, Massachusetts,	
Avidin	Kaninchen, polyklonal	1:7000	WB	PA1-26812	USA	
Streptavidin	Kaninchen, polyklonal	1:5000	WB	ab6676		
ND6	Kaninchen, polyklonal	1:500	WB	ab81212	Abcam	
ATP6	Kaninchen, polyklonal	1:500	WB	ab192423	Cambridge, UK	
ATP-Synthase Untereinheit beta	Maus, monoklonal [4.3E8.D10]	1:200	IF	ab5432		
ND1	Kaninchen, polyklonal	1:1000	WB	19703-1-AP		
ND2	Kaninchen, polyklonal	1:500	WB	19704-1-AP		
ND4L	Kaninchen, polyklonal	1:500	WB	18737-1-AP	ProteinTech, Manchester, UK	
ND5	Kaninchen, polyklonal	1:1000	WB	55410-1-AP		
Cox3	Kaninchen, polyklonal	1:500	WB	55082-1-AP		
Cytochrom b	Kaninchen, polyklonal	1:500	WB	AV50256	Sigma-Aldrich	
ND3	Ziege, polyklonal	1:500	WB	sc-26760	Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, Kalifornien, USA	
Cox1	Kaninchen /	1:500	WB	/	M. Deckers	
Cox2	Kaninchen /	1:1000	WB	/	H.Herrmann	

**Tabelle 2.3:** Liste der Primärantikörper mit Details zu Eigenschaften und Einsatzbereich.**Abkürzungen**: IF =Immunfluoreszenz, WB = Western Blot.

Spezies-	Wirt-	Konnlung	Spektrale	Anwendung	Katalog-Nr	Hersteller
Reaktivität	spezies	Koppining	Eigenschaften	Verdünnung	Kutalog IVI.	Trefsteller
Kaninchen	Ziego	Meerrettich-	/	WP 1.10000	111-025-144	
Kannenen	Liege	Peroxidase	/	VVB, 1.10000	111-033-144	
Maure	71000	Meerrettich-	1	WR 1.10000	115 025 062	
iviaus	Liege	Peroxidase	/	VVB, 1.10000	115-055-002	
7:000	Feel	Meerrettich-	1	WD 1.10000	705 025 147	
Ziege	Esei	Peroxidase	/	VVB, 1:10000	/05-035-14/	Dianova, Hamburg, Deutschland
Kaninahan	7:000	KK114	Abs. 637 nm	15 1.500	111 005 003	
Kaninchen	ziege	selbst gekoppelt	Em. 660 nm	IF, 1:500	111-005-003	
Kaninchan	Ziege	Alexa594	Abs. 590 nm	IF, 1:500	111-005-003	
Kaninchen		selbst gekoppelt	Em. 617 nm			
Maure	Ziege	KK114	Abs. 637 nm	IF, 1:500	115-007-003	
ividus		selbst gekoppelt	Em. 660 nm			
Maur	Ziege	Alexa594	Abs. 590 nm	IF, 1:500	115 007 002	
iviaus		selbst gekoppelt	Em. 617 nm		113-007-003	
Patto	Ziogo	Alexa594	Abs. 590 nm	IE 1.500	112-005-167	
Natte	Ziege	selbst gekoppelt	Em. 617 nm	11, 1.500		
Kaninchen	Ziego	Atto490LS	Abs. 495 nm	IE 1·100	111-005-003	
Kannenen	ziege	Selbst gekoppelt	Em. 658 nm	11, 1.100		
						Jackson
Maus	Schaf	Atto490LS	Abs. 495 nm	IF, 1:100	515-055-003	Immuno-
ividu3	Jenu	Selbst gekoppelt	Em. 658 nm			Research,
						Suffolk, UK

**Tabelle 2.4:** Liste der Sekundärantikörper mit Details zu Eigenschaften und Einsatzbereich. Sekundärantikörper wurden vor

 Benutzung für 3 min bei RT und 16000 x g zentrifugiert.

 Abkürzungen: IF = Immunfluoreszenz, WB =Western Blot.

# 2.1.3 Funktionalisierte Sonden

In dieser Arbeit wurde eine Auswahl Azid- und Alkin-funktionalisierter Sonden eingesetzt, die entweder für den Nachweis in proteinbiochemischen Analysen (desthio-)biotinyliert waren, oder zur fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung verschiedene Fluorophore trugen (siehe Tabelle 2.5). Ihre Strukturformeln sind, sofern bekannt, in Abbildung 2.1 dargestellt.

 Tabelle 2.5: Azid- und Alkin-funktionalisierte Sonden.

Name	Absorption/Emission	Stammlösung	Katalog-Nr.	Hersteller
KK114 Azid	627 nm/660 nm		1	Synthese der
KK114-AZIU	037 1111/000 1111	4 11111 111 F D 3	/	Chemie-Facility
		Unbekannt,		Molecular Probes,
Alexa488-Azid	488-498 nm/520 nm	DMSO, Teil eines	C10337	Thermo Fisher
		Kits		Scientific, Waltham,
Alexa594-Azid	590 nm/617 nm	7,5 mM in DMSO	A10270	Massachusetts, USA
Desthiobiotin-PEG <sub>3</sub> -	1	100 mM in DMSO		
Azid	/		CLK-1107-25	Jana Diassiansa
Biotin-PEG <sub>3</sub> -Azid	/	100 mM in DMSO	CLK-AZ104P4-25	Jena-Bioscience,
Biotin-PEG <sub>4</sub> -	1	100 mM in DMSO		Jella, Deutschlahu
Acetylene	/		CLK-1A105-25	



**Abbildung 2.1:** Strukturformeln der funktionalisierten Sonden **a**) Natives Biotin mit Polyethylenglycol-Linker und Azid-Funktionalisierung **b**) Desthiobiotin mit Polyethylenglycol-Linker und Azid-Funktionalisierung **c**) Natives Biotin mit Polyethylenglycol-Linker und Alkin-Funktionalisierung **d**) KK114-azid, Absorption bei 637 nm, Emission bei 660 nm (Kolmakov *et al.*, 2012; Wurm, 2012). **e**) Alexa488-azid, Absorption bei 488-498 nm, Emission bei 520 nm, Kommerzieller Farbstoff (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).

# 2.2 Humane Zellkultur

# 2.2.1 Zellkultivierung, Passage und Aussaat

Alle Kulturmedien und Waschpuffer wurden in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die einzige Ausnahme war die Trypsin-Arbeitslösung (siehe Tabelle 2.7), die stets nur auf Raumtemperatur gebracht wurde. Alle Arbeiten wurden unter einer Sterilbank durchgeführt. Es wurde mit adhärent in Einzelzellschicht wachsenden Zelltypen (HeLa, U2OS, HDFa, U2OS, siehe Tabelle 2.6) gearbeitet. Die Zellen wurden in T75-Flaschen (75 cm<sup>2</sup>, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) im Kulturmedium DMEM (siehe Tabelle 2.7) in einem Brutschrank bei 37°C mit 5% (v/v) CO<sub>2</sub> kultiviert. Zum Passagieren wurde das Kulturmedium entfernt, die Zellen wurden einmal mit PBS (siehe Tabelle 2.1) gewaschen und anschließend mit Trypsin-Arbeitslösung im Brutschrank abgelöst (U2OS und HeLa 4-8min, HDFa bis zu 15min). Trypsin wurde durch Zugabe von 4 Volumen DMEM inhibiert, ein Aliquot der Zellsuspension wurde in eine neue T75-Flasche transferiert und mit DMEM aufgefüllt. Für die Aussaat (siehe Tabelle 2.8) wurde die Zellzahl der Suspension bestimmt (siehe Abschnitt 2.2.2). Die kultivierten Zellen wurden regelmäßig auf Kontaminationen mit Mykoplasmen untersucht (siehe Abschnitt 2.2.3).

Tabelle 2.6: Übersicht der Zelltypen.

Name	Spezies	Gewebe	Referenz
HeLa	human	Zervixkarzinom	(Masters, 2002)
U2OS	human	Osteosarkom	(Ponten & Saksela, 1967)
HDFa	human	Primäre, dermale Fibroblasten, adult	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 2.7: Medien und Gebrauchslösungen der Zellkultur.

Stammlösungen	Kulturmedium (DMEM)	Hersteller		
	Dulbecco's Modified Eagle's Medium mit	Gibco, Thermo Fisher		
Grundlage	high glucose 4.5 g/L GlutaMAX Phenolrot	Scientific, Waltham,		
	nigh glucose 4,5 g/l, GlucawiAA, Fhenoniot	Massachusetts, USA		
FBS (Fetal Bovine Serum)	10% v/v	Biochrom, Berlin, Deutschland		
Natrium Duruvat 100mM	1 mM	Sigma-Aldrich, Darmstadt,		
Nathum-Fyluvat 100mm		Deutschland		
Penicillin/Streptomycin	Penicillin 100 U/ml	Biochrom, Berlin, Deutschland		
10.000 U/ml / 10.000 µg/ml	Streptomycin 100 μg/ml			
	Trypsin/EDTA Arbeitslösung	Hersteller		
Trypsin/EDTA 0,5 %/0,2 %	Verdünnung 0,05 %/0,02 %	Biochrom, Berlin, Deutschland		

# 2.2.2 Zellzahlbestimmung

Zur vergleichbaren Aussaat wurde die Zellzahl mit einem automatischen Zellzähler mit 60µm-Sensoren (Scepter 2.0 Cell counter, Merck-Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) ermittelt. Die Zellsuspension wurde 1:10 in 1 ml PBS (siehe Tabelle 2.1) verdünnt. Vor der Messung wurde auf eine gute Durchmischung durch Invertieren geachtet. Die Zellzahl konnte (unter Berücksichtigung der
Verdünnung) direkt von einem Histogramm (gezählte Partikel in Abhängigkeit der Partikelgröße) abgelesen werden. Die Aussaat erfolge dann anhand von Tabelle 2.8.

Zelltyp	Zellzahl	Gefäß	Wachstumsphase	Anwendung
Hola	5 4v10 <sup>5</sup> -10 <sup>6</sup>	T75-Elasche	2-4 Tage	Proteinbiochemie, drei T75 pro
песа	5,4X10-10	175-Hasche	2-4 Tage	experimenteller Bedingung
U2OS	5,4x10⁵	T75-Flasche	6 Tage	Proteinbiochemie
	alle, die			Brotainhiachamia viar T75 pro
HDFa	verfügbar	T75-Flasche	bis Konfluenz, >20 Tage	experimenteller Redingung
	waren			experimentener bedingung
	3-6x10 <sup>4</sup>	6-Loch-Platte	2-4Tage	Fixierung für Mikroskopie

 Tabelle 2.8: Zellaussaatdichten und Wachstumsphasen.

# 2.2.3 Test auf Kontamination mit Mykoplasmen

Die Kulturen wurden regelmäßig auf eine Kontamination mit Mykoplasmen (Drexler & Uphoff, 2002) getestet. Dazu wurden von konfluenten Kulturen 500 µl Kulturmedium entnommen und bei 95°C für 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Aliquots zur PCR-Analyse einem externen Dienstleister zugesandt (Food Analytik&Consulting, Jena, Deutschland).

# 2.3 Markierung von Proteinsynthese für proteinbiochemische Analysen

Das Methionin-Analog L-Homopropargylglycin (HPG, siehe Abbildung 1.5) wurde von Molecular Probes (Katalog-Nr. C10186,Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) bezogen. Die Stammlösung wurde in Reinstwasser angesetzt (siehe Tabelle 2.9) und bei -25°C gelagert.

# 2.3.1 Ablauf der Methioninsubstitution

Alle Medien (siehe Tabelle 2.9) und PBS (siehe Tabelle 2.1) wurden vor Beginn der Arbeit vorbereitet und in einem Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die Cycloheximid-Stammlösung (siehe Tabelle 2.9) wurde immer frisch angesetzt. Die Thiamphenicol-Stammlösung (siehe Tabelle 2.9) musste vor jedem Einsatz für 1-2 min auf 95°C erhitzt werden, um für eine kurze Zeitspanne eine homogene klare Lösung zu ergeben. Die Zellen, nach Tabelle 2.8 in T75-Flaschen ausgesät, wurden einmal mit PBS gewaschen und zunächst mit 5 ml Mangelmedium (siehe Tabelle 2.9) für 25 min bei 37°C mit 5% v/v CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, durch 10 ml Inhibitor-Medium (siehe Tabelle 2.9) ersetzt und für 25 min bei 37°C mit 5% v/v CO<sub>2</sub> inkubiert. Das Medium wurde abgesaugt, durch 10 ml Markierungsmedium (siehe Tabelle 2.9) ersetzt und für 4,5 h bei 37°C mit 5% v/v CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für weitere 20 min mit Kulturmedium ohne Zusätze (siehe Tabelle 2.7) inkubiert. Wurde Emetin (Stammlösung 86 mg/ml, in H<sub>2</sub>O, Arbeitskonzentration 172 µg/ml) anstelle von Cycloheximid verwendet, musste es in diesem Schritt dem Medium ebenfalls zugesetzt werden. Danach folgte die Zellernte.

Stamm- lösungen	Mangelmedium	Inhibitor-Medium	Markierungs- medium	Hersteller
Grundlage	DMEM <b>ohne M</b>	Gibco, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA		
FBS dialysiert und 0,2 μm filtriert	10% v/v	10% v/v	10% v/v	Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA
L-Cystein 200mM in H <sub>2</sub> O	200 µM	200 µM	200 μM	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Cycloheximid 10 mg/ml in H <sub>2</sub> O	/	50μg/ml	50μg/ml	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Thiamphenicol 25 mg/ml in H <sub>2</sub> O	/	62,5µg/ml	62,5µg/ml	Sigma-Aldrich, Darmstadt, Deutschland
L-HPG 100 mM in H₂O	/	/	500 μM	Katalog-Nr. C10186, Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA

Tabelle 2.9: Liste der -Medien für die Methioninsubstitution.

## 2.3.2 Zellernte mit HeLa-Zellen

Dieser Schritt knüpft direkt an Abschnitt 2.1.1 an. Das Medium wurde abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und 3 ml Trypsin-Arbeitslösung (siehe Tabelle 2.7) wurden dazugegeben. Die Zellen wurden für 8-10 min bei 37°C mit 5% v/v CO<sub>2</sub> inkubiert. Es wurde mit jeweils 7 ml PBS aufgefüllt und die pro experimenteller Bedingung identisch behandelten T75-Flaschen wurden in einem 50 ml- Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vereint. Anschließend wurde die Zellzahl nach Abschnitt 2.2.2 in Doppelbestimmung ermittelt. Die Zellen wurden bei 165 x g, Raumtemperatur, für 2 min in einer Biofuge Primo mit Ausschwingrotor (Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) pelletiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet wurde sofort in 5 ml eiskalter Lösung A des Mitochondrien-Isolationsprotokolls resuspendiert (siehe Abschnitt 2.4, Tabelle 2.10) und bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten.

## 2.3.3 Zellernte mit HDFa-Zellen

Dieser Schritt knüpft direkt an Abschnitt 2.1.1 an. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Pro T75-Flasche wurden 2,5 ml Lösung A des Mitochondrien-Isolationsprotokolls zugegeben (siehe Abschnitt 2.4.1, Tabelle 2.10). Die Zellen wurden mit einem sterilen Zellschaber (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) abgeschabt und identisch behandelte T75-Flaschen wurden in einem 50 ml- Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) vereint. Die Zellsuspensionen wurden auf Eis gehalten und bei 500 x g, 4°C für 2 min

pelletiert. Der Überstand wurde vorsichtig verworfen und durch frische Lösung A ersetzt. Es wurde direkt mit der Isolation der Mitochondrien fortgefahren (siehe Abschnitt 2.4).

## 2.4 Isolation von Mitochondrien

In dieser Arbeit meint die Isolation von Mitochondrien die Anreicherung einer post-nuklären Phase mittels differentieller Zentrifugation. Die durchgeführte Prozedur ist die Adaption einer früheren Veröffentlichung (Bourgeron *et al.*, 1992). Sie unterschied sich in einigen Details von der Originalveröffentlichung; erstens wurde kein fettsäurefreies BSA zugegeben, um nicht die spätere Proteinkonzentrationsbestimmung zu stören und zweitens wurde auf den Einsatz von Phenylmethylsulfonylfluorid verzichtet, da in der anschließenden Lyse der Mitochondrien-Fraktion bereits für andere Protease-Inhibitoren gesorgt wurde (siehe Tabelle 2.11).

## 2.4.1 Isolation aus HeLa-Zellen

Die in der Originalveröffentlichung genannten Zentrifugalbeschleunigungen waren gut auf HeLa-Zellen übertragbar. Die Arbeit erfolgte vollständig auf Eis und auch die Lösungen A-C (siehe Tabelle 2.10) wurden auf Eis vorbereitet. Die dafür benötigte Saccharose-Lösung (siehe Tabelle 2.10) wurde immer frisch angesetzt und 0,2 µm-sterilfiltriert. Auch Digitonin (siehe Tabelle 2.10) wurde frisch vorbereitet, es wurde in Wasser (95°C) gelöst. Alle anderen Komponenten waren als Stammlösungen bei Raumtemperatur über längere Zeit stabil. Das biologische Ausgangsmaterial für dieses Protokoll waren die aus Abschnitt 2.4 hervorgegangenen Zellsuspensionen in 5 ml Lösung A (drei vereinte T75 pro experimenteller Bedingung, siehe Tabelle 2.10). Die Zellen wurden dreimal mit je 5 ml Lösung A gewaschen und jeweils bei 170 x g, 4°C für 2 min pelletiert (Kühlzentrifuge RC6+, mit HS-4-Ausschwingrotor, Sorvall, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Die Überstände wurden sehr vorsichtig abgenommen, um Materialverlust zu minimieren und verworfen. Die Pellets wurden in je 5 ml Lösung B resuspendiert und in vorgekühlte Handhomogenisatoren (Tissue Douncer) transferiert. Die Suspensionen wurden für 10-12 min auf Eis inkubiert und dann mit 60 langsamen Hüben pro Probe auf Eis homogenisiert. Dabei wurde Schaumbildung vermieden. Die Homogenisate wurden in neue 50 ml-Polypropylen-Röhrchen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) transferiert und die Handhomogenisatoren wurden noch einmal mit 5 ml Lösung B gespült. Dieses Waschvolumen wurde mit denselben Pipettenspitzen wie zuvor den Proben zugeführt. Die Proben wurden an einer Waage mit Lösung B tariert. Die Entfernung der Zellkerne und anderer großer Zelltrümmer erfolgte durch Zentrifugation bei 2500 x g, 4°C für 5 min. Die Überstände wurden vorsichtig in neue 50 ml-Polypropylen-Röhrchen transferiert, die Kerntrümmerpellets wurden verworfen. Die Proben wurden erneut an der Waage mit Lösung B tariert. Die Isolation der Mitochondrien-Fraktion aus dem Überstand erfolgte durch Zentrifugation bei 10000 x g, 4°C für 5 min. Die Überstände wurden vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden in 3 ml Lösung C resuspendiert, an der Waage tariert und erneut bei 10000 x g, 4°C für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschritt wurde noch zweimal wiederholt. Abschließend wurden vorsichtig 2 ml des Überstandes abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden im Restvolumen resuspendiert und in sterile 1,5 ml-Reaktionsgefäße transferiert. Die Proben wurden erneut bei 10000 x g, 4°C für 5 min in einer Kühlzentrifuge Biofuge Fresco, (Heraeus, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) mit Festwinkelrotor (7500)3328 zentrifugiert. Der restliche Überstand wurde vorsichtig abgenommen und verworfen. Die Pellets wurden in 3 ml Lysepuffer (siehe Tabelle 2.11) resuspendiert und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Das Lysat wurde aliquotiert und bei -25°C gelagert. Ein Gebrauchsaliquot wurde im Kühlschrank gelagert.

Stammlösungen	Lösu	ing A	Lösu	ing B	Lösung C		Hersteller
MOPSxNa <sup>+</sup>							ICN Biomedicals
200 mM nH 7 4	1:10	20 mM	1:10	20 mM	1:10	20 mM	Inc., Aurora,
200 mm pri 7,4							Ohio, USA
Saccharoco							Merck KGaA,
	1:4	100 mM	1:4	100 mM	1:1,333	300 mM	Darmstadt,
400 11111							Deutschland
							Sigma-Aldrich,
EGTA 208 mM	1:208	1 mM	1:208	1 mm	1:208	1 mM	Darmstadt,
							Deutschland
Tui ath an a lansin							Merck KGaA,
	/	1	1:10	10 mM	/	/	Darmstadt,
100 mivi							Deutschland
							Fluka, Sigma-
Dereell	,	,	1.20	E0//.	,	,	Aldrich,
Percoll	/	/	1:20	5% V/V	/	/	Darmstadt,
							Deutschland
Disitania							Sigma-Aldrich,
	/	/	1:100	100 µg/ml	/	/	Darmstadt,
TO IUR/IUI							Deutschland

**Tabelle 2.10:** Puffer für die Isolation von Mitochondrien.

#### Tabelle 2.11: Der Lysepuffer für die mitochondriale Fraktion.

Stammlösungen	Lysep	ouffer	Hersteller	
MOPSxNa <sup>+</sup> 200 mM pH 7,4	1:10	20 mM	ICN Biomedicals Inc., Aurora, Ohio, USA	
Protease-Inhibitor-Cocktail 7x in	1.7	1 v	Pacha Sigma Aldrich Darmstadt Doutschland	
H <sub>2</sub> O	1.7	IX	Koche, Sigma-Alunch, Darmstaut, Deutschland	
Dithiothreitol 1 M in $H_2O$	1:200	5 mM	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	
EDTA 250 mM pH 8,0	1:25	10 mM	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland	
Pepstatin A 1 mM in Methanol	1.1000	1	AppliCham GmbH Darmstadt Doutschland	
mit 10% Essigsäure	1.1000	τ μινι	Applichem Gribh, Darnstaut, Deutschland	
SDS 10% w/v in H <sub>2</sub> O	1:2,5	4%≙140 mM	Serva, Heidelberg, Deutschland	
Pierce Universal Nuclease, 25 kU	1:10000	2,5 U	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Waltham,	
		,	Massachusetts, USA	

#### 2.4.2 Isolation aus HDFa-Zellen

Die Isolation von Mitochondrien aus anderen Zelltypen erforderte eine Anpassung der Zentrifugalbeschleunigung, da ansonsten ein großer Materialverlust drohte. In allen anderen Aspekten folgte das Protokoll der Prozedur für HeLa-Zellen (siehe Abschnitt 2.4.1). Für HDFa-Zellen wurde nach der Ernte (siehe Abschnitt 2.3.3) zweimal mit Lösung A gewaschen und jeweils bei 500 x g, 4°C für 2 min pelletiert. Die Abtrennung der Kernfraktion erfolgte auch hier bei 2500 x g, 4°C für 5 min. Die Isolierung der Mitochondrien-Fraktion allerdings erfolgte nach Austarieren in einer Ultrazentrifuge Optima TLX (Beckmann Coulter, Krefeld, Deutschland) mit TLA 100.3 Festwinkelrotor in geeigneten 1,5 ml Zentrifugen-Gefäßen (*Microfuge Tube Polyallomer*, Beckman Instruments, Palo Alto, Kalifornien, USA). Zunächst wurde bei 20000 x g, 4°C für 15 min zentrifugiert, dann noch einmal bei 40000 x g, 4°C für 15 min. Das Ergebnis war ein loser Niederschlag im unteren Bereich der Probengefäße. Es wurde der obere klare Teil von Lösung B vorsichtig abgenommen, verworfen und mit Lösung C aufgefüllt/tariert. Es wurde erneut bei 40000 x g, 4°C für 15 min zentrifugiert. Das Vorgehen wurde noch zweimal wiederholt, dann war Lösung B weitgehend durch Lösung C ersetzt und die Mitochondrien-Fraktion war ein definiertes Pellet am Gefäßboden, das in 1 ml Lysepuffer lysiert wurde (siehe Tabelle 2.11).

## 2.5 Verarbeitung mitochondrialer Rohlysate

Das Produkt der Isolierung von Mitochondrien waren die Rohlysate, deren Weiterverarbeitung abhängig von der experimentellen Fragestellung war. Allen Folgemethoden gemein war, dass die Lysate vor Benutzung zunächst für 30-60 min bei 28°C, 550 rpm im Heizblock und gelegentlichem Vortexen inkubiert wurden, um etwaige SDS-Präzipitate in Lösung zu bringen. Wann immer Lysat-Aliquots verdünnt wurden, geschah dies in 4-6% w/v SDS in H<sub>2</sub>O. SDS wurde niemals unter seine kritische micellare Konzentration verdünnt.

## 2.5.1 Proteinkonzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration in Rohlysaten wurde der Bicinchoninsäure-Assay (P. K. Smith *et al.*, 1985) verwendet. Dieser Assay wurde ausgewählt, weil er hohe Konzentrationen von Detergenzien, auch SDS, toleriert (R. E. Brown, Jarvis, & Hyland, 1989), die nötig waren, um die hydrophoben mitochondrialen Zielproteine in Lösung zu halten. Für die Durchführung wurde ein kommerziell erhältliches Kit (Pierce BCA Protein Assay Kit, Katalog-Nr. #23225, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Der Lysepuffer (siehe Tabelle 2.11) war so komponiert, dass kein Bestandteil den Grenzwert des Herstellers zur Störung des Assays überschritt. Das Kit wurde nach Protokoll des Herstellers benutzt. Es wurde das *Enhanced protocol* im Wasserbad bei 60°C durchgeführt, das eine höhere Sensitivität für geringe Proteinmengen hat. Durch die geringen verfügbaren Probenmengen wurde der Ablauf leicht angepasst: Aliquots der Rohlysate wurden im

Verhältnis 1:33 bis 1:7,5 in 50 µl MOPS 20 mM pH 7,4 verdünnt. Anschließend wurde 1 ml des Kit-Reagenz zugegeben und die Reaktion wurde nach Kit-Anleitung durchgeführt. Die Proben wurden immer in 2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt, um vor der Messung der OD<sub>562</sub> ein zügiges und vollständiges Dekantieren in die Polystyrol-Küvetten (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) zu gewährleisten.

## 2.5.2 Präzipitation von Proteinen

Die Fällung von Proteinlysaten war häufiger Bestandteil des experimentellen Arbeitsflusses. Die Methode der Wahl war die Fällung mit Methanol/Chloroform (Wessel & Flügge, 1984). Sie wurde ausgesucht, weil Bicinchoninsäure (BCA), die eine Kernkomponente der kupferkatalysierten 1,3dipolaren Cycloaddition war (siehe Abschnitt 2.6), nur im neutralen bis basischen Bereich löslich ist. Dieser Umstand machte eine Fällung mit Trichloressigsäure (Polacheck & Cabib, 1981) zur Aufreinigung der Proteine nach einer Cycloaddition unbrauchbar. Zudem stellten Methanol und Chloroform sicher, dass kontaminierende Lipide bereits früh aus der Probe extrahiert wurden.

## 2.5.2.1 Proteinfällung nach Wessel und Flügge

Es wurde sich eng an die Original-Publikation (Wessel & Flügge, 1984) gehalten. Es wurde stets bei Raumtemperatur im Abzug gearbeitet. Eine Probe wurde mit 4 Volumen Methanol versetzt und für 10 s gevortext. Dann wurde 1 Volumen Chloroform zugesetzt und für 10 s gevortext. Es wurden 3 Volumen H<sub>2</sub>O zugesetzt und für 20 s gevortext. Mit diesem Schritt wurden die Proben milchig weiß. Es wurde mit einer Zentrifuge 5415 C mit Standard-Festwinkelrotor (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bei 9000 x g, Raumtemperatur, für 5 min zentrifugiert. Die (nun wieder) klare, obere, wässrige Phase wurde vorsichtig so vollständig wie möglich abgenommen und verworfen, ohne das Proteinpellet an der Interphase zu verletzen. Es wurden 600 µl Methanol zugesetzt und die Lösung durch Invertieren durchmischt. Hier war es wichtig, das Probengefäß nicht zu stark zu erschüttern, da besonders kleine Proteinmengen häufig zu fragilen Proteinpellets führten und ein Zerfall der Pellets das Risiko von Materialverlust deutlich erhöhten. Waren die Pellets aufgrund geringer Mengen unsichtbar, hat die Methode dennoch stets verlässlich gearbeitet. Die Proben wurden erneut bei 9000 x g, Raumtemperatur, für 5 min zentrifugiert und der Überstand (die organische Phase) wurde abgenommen. Es wurde noch einmal mit 600 µl Methanol gewaschen (Zentrifugation bei 9000 x g, Raumtemperatur, für 5 min) und der Überstand wurde verworfen. Die Probengefäße mit den Pellets wurden offen im Abzug für 20-60 min getrocknet. Wichtig war die Pellets nicht zu übertrocknen, da die Resuspension sonst unmöglich werden kann. Nach 60 min wurde spätestens der nächste Puffer auf die Pellets gegeben.

## 2.5.2.2 Proteinfällung nach Friedman, Hoving und Westermeier

Die Fällung nach Friedman (Friedman, Hoving, & Westermeier, 2009) ist im Grunde eine Adaption der Fällung aus Abschnitt 2.5.2.1, die die Zugabereihenfolge der Lösungsmittel ändert: Auf eine Probe werden erst 3 Volumen H<sub>2</sub>O gegeben, gefolgt von 4 Volumen Methanol und zuletzt 1 Volumen Chloroform. Die gesamte Handhabung blieb dieselbe wie in Abschnitt 2.5.2.1. Dieses Vorgehen wurde für die Beendigung der kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition eingesetzt (siehe Abschnitt 2.6), bei der die 3 Volumen H<sub>2</sub>O als Stop-Lösung um weitere Komponenten ergänzt wurden (siehe Tabelle 2.14).

## 2.5.3 Alkylierung von Aminosäuren mit Iodessigsäure

lodessigsäure ist ein starkes Alkylierungsreagenz, das Cystein, Histidin, Lysin, Methionin und Nterminale α-amino-Gruppen angreift (Gurd, 1967). Tabelle 2.12 zeigt die Zusammensetzung der benötigten Puffer. Der pH-Wert des basischen Alkylierungspuffers wurde ermittelt, indem die absolute Protonenkonzentration (frei in Lösung und assoziiert mit Acetat) des 1:1 Gemisches von saurem Resuspensionspuffer und saurem Alkylierungspuffer bei bekannter Essigsäurekonzentration und Volumen nach der Hendersson-Hasselbalch-Gleichung (Good & Izawa, 1972) abgeschätzt wurde und von der für den Ziel-pH-Wert nötigen absoluten Protonenkonzentration (wiederum bei bekannter CAPSO-Konzentration und Volumen) abgezogen wurde. Der basische Alkylierungspuffer wurde dann mit einem um diese Differenz erhöhten pH-Wert angesetzt. Die Iodessigsäure selbst spielte bei dieser Berechnung keine Rolle, da sie mit einem pK<sub>s</sub> von 3,12 bereits in dem sauren Alkylierungspuffer vollständig deprotoniert war.

Der Alkylierung voran ging eine Präzipitation von 10 µg mitochondrialem Rohlysat (siehe Abschnitte 2.4 und 2.5.2.1). Zu den Pellets wurde 50 µl saurer Resuspensionspuffer (siehe Tabelle 2.12) gegeben und die Proben wurden für mindestens 60 min bei 28°C in einem Thermomixer inkubiert. Die Proben wurden gevortext und kurz mit einer Tischzentrifuge (Minifuge bis 2000 x g, Labnet International Inc., Woodbridge, New Jersey, USA) zentrifugiert. Es wurden 50 µl saurer Alkylierungspuffer (siehe Tabelle 2.12) zugegeben, gevortext und erneut zentrifugiert. Die Proben wurden bei 28°C im Thermomixer unter Lichtausschluss für mindestens 2 h inkubiert. Es wurden 100 µl basischer Alkylierungspuffer (siehe Tabelle 2.12) dazugegeben, kräftig gevortext und zentrifugiert. Die Proben wurden für 15-24 h bei 28°C, 550 rpm und Lichtausschluss im Thermomixer inkubiert. Die Proben wurden kurz zentrifugiert und nach Abschnitt 2.5.2.1 gefällt.

Stamm-	Saurer		Saurer		Basischer		Henetellen
lösungen	Resuspe	ensionspuffer	Alkylieru	ungspuffer	Alkylieru	Ingspuffer	Hersteller
Acetat							Merck KGaA,
100 mM	1:5	20 mM	1:20	5 mM	/	/	Darmstadt,
pH 5,5							Deutschland
CAPSO	-						Sigma-Aldrich,
100 mM	/	/	/	/	1:2	50 mM	Darmstadt,
pH 9,75							Deutschland
SDS 10% w/v		8%					Serva,
in H <sub>2</sub> O	1:1,25	≏280 mM	/	/	/	/	Heidelberg,
							Deutschland
Pepstatin A							AppliChem
1 mM in							GmbH,
Methanol	1:1000	1 µM	/	/	/	/	Darmstadt,
mit 10%							Deutschland
Essigsaure							
TOED							Thermo Fisher
ICEP	,	,	4 4 0 0 0	400 14	4 500	200 14	Scientific,
100 mM in	/	/	1:1000	100 µM	1:500	200 µM	waitham,
H <sub>2</sub> O							Massachusetts,
							USA
							Fluka, Sigma-
lodessig-	/	/	18,6 mg	10 mM	37,3 mg	10 mM	Alarich,
saure							Darmstadt,
			-	70		47	Deutschland
pH-Wert	1	5,5	5	,/3	9	,1/	

Tabelle 2.12: Puffer, die zur Alkylierung von Rohlysaten mit Iodessigsäure verwendet wurden.

# 2.6 Kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC)

Die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition zwischen einem organischen Azid und einem terminalen Alkin (CuAAC, siehe Abschnitt 1.4) war die zentrale chemische Reaktion dieser Arbeit. Das Alkin wurde in Form der nicht-kanonischen Aminosäure HPG (siehe Abbildung 1.5) direkt in die Proteine eingebracht. Das korrespondierende organische Azid waren verschiedene funktionalisierte Sonden (siehe Tabelle 2.5). Alle Komponenten wurden durchgängig auf 28°C gehalten. Proteinpellets (ca. 30 µg pro Probe, siehe Abschnitt 2.5.2.1) wurden in 22,5 µl CuAAC-Resuspensionspuffer (MOPS 20 mM pH 7,4, 8% w/v SDS) für mind. 75 min bei 28°C, 550 rpm im Heizblock inkubiert. Parallel wurde der Master-Mix für die CuAAC-Reaktion vorbereitet (siehe Tabelle 2.13). Auf 22,5 µl Lysat wurden 123 µl Master-Mix gegeben und gevortext. Nun wurden die Proben einzeln behandelt: Es wurden 2,25 µl CuSO<sub>4</sub> 200 mM in H<sub>2</sub>O aufgezogen wurden. Diese wurden sofort zugegeben und die Probe wurde für 15 s gevortext (Gesamtvolumen 150 µl, Endkonzentrationen SDS 42 mM, TCEP 1,5 mM, CuSO<sub>4</sub> 3 mM). Die Inkubation der Proben erfolgte bei 28°C, siehe Tabelle 2.14), was gleichzeitig der erste

Schritt der Fällung war (siehe Abschnitt 2.5.2.2). Mit der Methanol-Zugabe der Fällung wurde bei Raumtemperatur fortgefahren.

**Tabelle 2.13:** Komponenten des CuAAC-Master-Mix, aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Zugabe. In den Master Mix musste bei den angegebenen Stammlösungen kein Wasser mehr zugegeben werden. 123 μl Master Mix wurden mit Lysat, CuSO<sub>4</sub> und TCEP auf 150 μl pro Reaktion aufgefüllt. Die Spalte "Endkonzentration" bezieht sich auf die 150 μl Reaktionsgesamtvolumen. \* = Stammlösung bildet nach einiger Zeit Kristalle bei RT. Die Lösung wurde deshalb vor Gebrauch für 3-4 h bei 50°C gerührt und invertiert. \*\* = Stets die freie Säure (Katalog-Nr. 14335) verwendet, nicht das Kalium-Salz. \*\*\* = Azid-Sonde waren verschiedene Biotin-Derivate, siehe Tabelle 2.5.

Stammlösungen	ungen Master Mix		Endkonzentration	Hersteller
Chucaral 44.6% w/w*		~16 179/	12 20/	Merck KGaA, Darmstadt,
Giycerol 44,0% W/V*	auffüllon	10,17%	15,270	Deutschland
D Mannital 652 mM*	autulien	~226 mM	104 mM	Sigma-Aldrich, Darmstadt,
D-Mannitor 052 milli		250 11101	194 11101	Deutschland
	1.20 512	195 mM	160 mM	Merck KGaA, Darmstadt,
	1.20,512	193 1111	100 11101	Deutschland
	1.0 765	10.24 mM	8.4 mM	ICN Biomedicals Inc.,
MOPS 100 IIIVI pH 8,23	1.9,705	10,24 11101	0,4 111111	Aurora, Ohio, USA
CARSO 100 mM pH 11	1.20 533	4.87 mM	4 mM	Sigma-Aldrich, Darmstadt,
CAF 50 100 min pri 11	1.20,355	4,87 11101	4 11111	Deutschland
BCA 100 mM** in	1.50	2 mM	1.64 mM	Fluka, Sigma-Aldrich,
MOPS 20 mM pH 7,5	1.50	2 111111	1,04 11111	Darmstadt, Deutschland
Azid-Sonde*** 100 mM in	1:41.152	2.43 mM	2 mM	Siehe Tabelle 2.5
DMSO	1.11,132	2,10 1111		
				J.T. Baker, Avantor
tert-Butanol	1:2,538	39% v/v	32%	Performance Materials,
				LLC., Pennsylvania, USA

**Tabelle 2.14:** Komponenten der Stop-Lösung, aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Zugabe. Die Endkonzentration bezieht sich auf die Mischung von 150 μl CuAAC-Reaktions-Cocktail mit 450 μl Stop-Lösung.

Stammlösungen	Stop-Lösung		Endkonzentration	Hersteller
	1.50	80 mM	~100 mM	Merck KGaA, Darmstadt,
	1.50	60 IIIIvi		Deutschland
TDEN 100 mM in Mathanal	1:50	2	~1,5 mM bei ~0,75 mM	Sigma-Aldrich, Darmstadt,
IPEN 100 mivi in ivietnanoi		2 111111	CuSO <sub>4</sub>	Deutschland
	1.0 222	1 20/ 0 42 14	~42 mM	Serva, Heidelberg,
SDS 10% III H <sub>2</sub> O	1.8,333	1,2%=42 11101	42 11111	Deutschland

# 2.7 Aufreinigung desthiobiotinylierter Proteine

Die Aufreinigung mitochondrial translatierter Proteine aus Proteinlysaten erfolgte über Desthiobiotin (siehe Abschnitt 2.1.3), ein Stoffwechselintermediat der Biotin-Biosynthese (Lin & Cronan, 2011), das mit deutlich geringerer Affinität an Avidin und seine Derivate (Bayer & Wilchek, 1990; Diamandis & Christopoulos, 1991) bindet und deswegen leicht unter physiologischen Bedingungen eluiert werden kann (Finn, Titus, & Hofmann, 1984; Hirsch *et al.*, 2002). Die Desthiobiotinylierung durch CuAAC (siehe Abschnitt 2.6) endete mit einem trocknen Proteinpellet (5-30 µg), das nun in 300-600 µl Aufreinigungspuffer resuspendiert wurde (MOPS 20 mM pH 7,4, SDS 2% w/v), Inkubation für mehrere Stunden bis über Nacht bei Raumtemperatur. Die Säulen (Pierce Centrifuge Columns, 0,8 ml, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wurden vorbereitet, indem sie zunächst zweimal mit je 400 μl Aufreinigungspuffer äquilibiriert wurden (Zentrifugation mit einer Tischzentrifuge (Minifuge bis 2000 x g, Labnet International Inc., Woodbridge, New Jersey, USA). Beim Zentrifugieren von SDS-Puffer durch Säulenmaterial wurde der Schraubdeckel der Säule stets leicht geöffnet, um Schaumbildung in der Säule zu vermeiden. Zum Binden der desthiobiotinylierten Proteine wurden Agarose-Beads gekoppelt mit Streptavidin (High Capacity Streptavidin Agarose Resin, Katalog-Nr. #20357, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) verwendet. Die Agarose wurde aufgeschüttelt und Beads wurden auf die Säulen pipettiert. Mit einer Feinwaage wurde nach gründlicher Zentrifugation wie oben das Trockengewicht der Säulen bestimmt (9-11 mg Beads auf 4-5 µg mitochondriales Protein). Die Beads wurden dreimal mit je 600 µl Aufreinigungspuffer gewaschen (Zentrifugation wie oben). Anschließend wurden die Säulen mit etwas Parafilm verschlossen und die Proben wurden darauf gegeben. Die Bindephase erfolgte bei Raumtemperatur auf einem Rotator SB2 (Stuart Equipment, Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK) für 3-4 h. Der Parafilm-Verschluss wurde entfernt, die Säulen wie oben zentrifugiert und 5-10x mit je 600 µl Aufreinigungspuffer gewaschen. Jeder Waschschritt dauerte mind. 10 min auf dem SB2-Rotator, konnte aber auch über Nacht ausgedehnt werden. Für jeden Waschschritt wurde die Säule wieder mit frischem Parafilm verschlossen. Für die Elution wurden die Säulen gründlich wie oben zentrifugiert und der Durchfluss wieder mit Parafilm verschlossen. Dann wurden 200 µl Elutionspuffer auf jede Säule gegeben (Biotin 162 mM in MOPS 6 mM pH 8 mit SDS 1% w/v). Die Proben wurden bei Raumtemperatur für 1,5 h auf dem SB2-Rotator inkubiert. Die Eluate wurden durch Zentrifugation in frische 1,5 ml Probengefäße gesammelt und gefällt (siehe Abschnitt 2.5.2.1). Die Resuspension erfolgte in je 15 µl Auftragspuffer (siehe Tabelle 2.15). Die Proben wurden bei 40°C, 550 rpm im Heizblock für 2 h inkubiert. Anschließend folge die Analyse der Proben in der PAGE (siehe Abschnitt 2.8.1).

Stammlösungen	Auftragspuffer		
Tris 625 mM pH 7,5 mit H₃PO₄	1.10	62,5 mM	
mit 0,01% Bromphenolblau	1.10	0,001%	
Glycerol 50% w/v	1:2,5	20%	
DTT 1 M	1.100	10 mM	
EDTA 250 mM pH 8	1:250	1 mM	
SDS 10% w/v	1:5	2% w/v	

**Tabelle 2.15:** Zusammensetzung des Auftragspuffers. Der Puffer war der Standard-Puffer für alle Polyacryamid-Gelektrophoresen (siehe Abschnitt 2.8.1).

## 2.8 Proteinbiochemische Analyseverfahren

## 2.8.1 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die denaturierende elektrophoretische Auftrennung von Proteingemischen, PAGE (*Polyacrylamide gel electrophoresis*), wurde in zwei Varianten angewandt. Das Tricin-System zur Auftrennung kleiner Proteine nach Schägger und von Jagow (Schägger & von Jagow, 1987) wurde routinemäßig eingesetzt. Zusätzlich wurden auch Gele im Glycin-System gefahren (Laemmli, 1970).

## 2.8.1.1 Das Tricin-System

Die Komposition der Puffer wurde der Originalveröffentlichung (Schägger & von Jagow, 1987) entnommen und ist in Tabelle 2.16 zusammengefasst. Die einzigen Änderungen waren die Konzentrationen von Ammoniumpersulfat (APS) und Tetramethylethylendiamin (TEMED), die jeweils um den Faktor 10 erhöht wurden, um die Polymerisation der Gele zu beschleunigen. Das Trenngel und das Zwischengel wurden zeitgleich angesetzt und gemeinsam polymerisiert, um eine harte Grenze zwischen beiden zu vermeiden. Anschließend wurde das Sammelgel aufgegossen. Die PAGE wurde in Mini Protean Tetra Cell-Gelkammern (Biorad, Hercules, Kalifornien, USA) durchgeführt. Mit dem Kathodenpuffer (Tris 100 mM, Tricin 100 mM, SDS 0,1% w/v, pH nicht eingestellt ~8,25) wurden die Gele überschichtet. Die Kammer wurde mit Anodenpuffer (Tris 200 mM, pH 8,9) befüllt. Pro Tasche wurden 10-20 µl Probe in Auftragspuffer (siehe Tabelle 2.15) aufgetragen. Als Größenstandard wurde 4 µl PageRuler Prestained Protein Ladder 10-180 kDa (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) aufgetragen. Typische Elektrophorese-Bedingungen waren 40-50 mA (konstant) pro Gel für 1,5-2 h. Nach dem Gellauf wurde mit einem Western Blot fortgefahren (siehe Abschnitt 2.8.2).

Stammlösungen	Trenngel		Zw	vischengel	Sammelgel	
Gelpuffer 3x		Tric 1 M		Tric 1 M		Tris 750 mM
Tris 3 M pH 8,45	1:3		1:3		1:4	SDS
SDS 0,3% w/v		3D3 0,1% W/V		3D3 0,1% W/V		0,075% w/v
Lösung AB-3		16% Acryl-		9,6% Acryl-		3,84% Acryl-
Acrylamid 48% w/v	1.2	amid	1.E	amid	1:12,5	amid
Bisacrylamid 1,5% w/v	1.5	0,5% Bisacryl-	1.5	0,3% Bisacryl-		0,12 %Bisacryl-
(32:1)		amid		amid		amid
Glycerol 50% w/v	1:4,672	10,7% v/v	/	/	/	/
APS 10% w/v	1:100	0,1% w/v	1:100	0,1% w/v	1:100	0,1% w/v
TEMED	1:1000	0,1% v/v	1:1000	0,1% v/v	1:1000	0,1% v/v

Tabelle 2.16: Zusammensetzung der Gele für das Tris-Tricin-System. Die Reihenfolge der Auflistung entspricht der Zugabereihenfolge.

## 2.8.1.2 Das Glycin-System

Die Gele für das klassische System nach Laemmli (Laemmli, 1970) sind in Tabelle 2.17 aufgelistet. In diesem System wurde nicht zwischen Kathoden- und Anodenpuffer unterschieden, der

Elektrophoresepuffer enthielt Tris 25 mM, Glycin 192,5 mM und SDS 0,1% w/v. Der pH-Wert wurde nicht eingestellt und lag bei ~8,3. Die Elektrophorese-Bedingungen waren 60-80 mA (konstant) pro Gel für ca. 40 min. Die übrigen Rahmenbedingungen unterschieden sich nicht vom Tricin-System (siehe Abschnitt 2.8.1.1).

 Tabelle 2.17: Zusammensetzung der Gele f
 Glycin-System
 Die Reihenfolge der Auflistung entspricht der Zugabereihenfolge.

Stammlösungen		Trenngel	Sammelgel		
Tris 1,5 M pH 8,8	1:4	375 mM	/	/	
Tris 500 mM pH 6,8	/	/	1:4	125 mM	
Acrylamid 30%	1.2.4	12,5% Acrylamid	1.000	5,1% Acrylamid	
Bisacrylamid 0,8% (37,5:1)	1.2,4	0,33% Bisacrylamid	1.5,002	0,13% Bisacrylamid	
SDS 10% w/v	1:100	0,1% w/v	1:100	0,1% w/v	
APS 10% w/v	1:100	0,1% w/v	1:100	0,1% w/v	
TEMED	1:1000	0,1% v/v	1:1000	0,1% v/v	

## 2.8.2 Western Blot

Nach der Größenauftrennung der Proteine im Polyacrylamid-Gel wurden die Proben im Western Blot auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen (Towbin, Staehelin, & Gordon, 1979). Routinemäßig wurde dafür 0,2 µm-Nitrocellulose (Amersham Protran, GE Healthcare, Little Chalfond, UK) verwendet. Im Hinblick auf den hohen (theoretischen) pl-Wert mancher mitochondrialer Proteine wurde ein basischer Transferpuffer (Szewczyk & Kozloff, 1985) gewählt, um eine möglichst vollständige Übertragung zu gewährleisten (CAPSO 25 mM pH 10 mit 20% v/v Methanol, siehe auch Tabelle 2.2). Der Puffer wurde vor Benutzung auf 4°C vorgekühlt. Nach der Benutzung wurde der pH-Wert mit Indikator-Stäbchen (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) kontrolliert. Der Puffer konnte zum Transfer zweier Tricin-Gele (siehe Tabelle 2.16) verwendet werden, danach musste er ersetzt werden. Der Blot wurde über Nacht bei 4°C mit konstanten 90 mA pro Membran gefahren. Nach Beendigung der Prozedur wurde das Gel kurz mit destilliertem Wasser gespült und zur Kontrolle in kolloidaler Coomassie-Färbelösung (Kang et al., 2002), mit angepasstem Rezept nach Dyballa und Metzger (2009), gefärbt. Die Inkubation erfolgte schwenkend bei Raumtemperatur für 4-5 h. Die Färbelösung wurde recycelt und die Gele eingescannt. Parallel wurde die Membran kurz mit destilliertem Wasser gespült und sofort in Ponceau-Färbelösung (Ponceau-S 2,5 g/l, mit 15% v/v Essigsäure und 40% v/v Methanol) gelegt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur schwenkend für 5-10 min. Die Färbelösung wurde recycelt und die Membran eingescannt. Mit der Membran wurde, je nach experimenteller Fragestellung, mit der Entwicklung fortgefahren (siehe Abschnitt 2.8.2.1 und/oder Abschnitt 2.8.2.2).

## Material und Methoden

## 2.8.2.1 Klassische Antigen-Dekorierung

Die klassische Entwicklung meint die Dekoration eines Antigens mit Primärantikörper und dessen Nachweis mit einem Sekundärantikörper. Aufgrund der Arbeit mit sehr hydrophoben Proteinen wurde auf möglichst geringe extrahierende Eigenschaften der Block- und Waschpuffer geachtet; es wurde auf Detergenzien verzichtet. Es wurde auf der Basis von Tris-gepufferter Salzlösung (TBS, Tris 20 mM, NaCl 62 mM, pH 7,5) gearbeitet. PBS wurde nur verwendet, wenn der Antikörper in TBS nicht funktionierte. Dies war der Fall für den Antikörper BTN.4 gegen Biotin (siehe Tabelle 2.3). Die Membranen wurden nach der Ponceau-Färbung (siehe Abschnitt 2.8.2) direkt in Blockpuffer (5% w/v Magermilchpulver in TBS) überführt und bei Raumtemperatur schwenkend für 30-60 min inkubiert. Die Primärantikörper wurden in Waschpuffer (2% w/v Magermilchpulver in TBS) verdünnt (siehe Tabelle 2.3). Die Membranen wurden zur Inkubation einzeln in Folie eingeschweißt. Die Primärantikörper-Inkubation erfolgte schwenkend, entweder bei Raumtemperatur für 1 h oder bei 4°C über Nacht. Die Antikörper-Lösungen wurden recycelt und bei -25°C gelagert. Die Membranen mit Waschpuffer gewaschen, 3x10 min, Raumtemperatur, schwenkend. wurden Der Sekundärantikörper wurde in Waschpuffer verdünnt (siehe Tabelle 2.4) und für 1 h mit den Membranen inkubiert (Raumtemperatur, schwenkend). Die Membranen wurden erneut 3x10 min mit Waschpuffer gewaschen, Raumtemperatur, schwenkend. Die Entwicklung der Membranen erfolgte mittels der ECL-Reaktion (Enhanced Chemiluminescence) mit einer kommerziellen Lösung (Western Lightning, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben.

## 2.8.2.2 Neutravidin-System für sehr geringe Mengen Antigen

Die geringen Mengen mitochondrialer Syntheseprodukte in einem Lysat erforderte eine noch größere Signalverstärkung, um Proteinbanden sichtbar zu machen. Zu diesem Zweck wurde das Neutravidin-System entwickelt. Neutravidin ist der kommerzielle Name deglycosylierten Avidins (Bayer *et al.*, 1995). Die Grundlage bildete CAPSO-gepufferte Salzlösung (CBS, CAPSO 20 mM, NaCl 50 mM, pH 9,5). Die Membranen wurden nach der Ponceau-Färbung (siehe Abschnitt 2.8.2) direkt in Blockpuffer (5% w/v BSA und 0,05% w/v Tween20 in CBS, pH 9,5) überführt, Inkubation schwenkend bei RT für 30-60 min. Neutravidin 10 mg/ml (Katalog-Nr. #3100, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) wurde 1:10000 in Waschpuffer (1% w/v BSA und 0,05% w/v Tween20 in CBS, pH 9,5) verdünnt und für 40 min auf die Membran gegeben (schwenkend, Raumtemperatur). Es wurde 3x10 min mit Waschpuffer gewaschen (schwenkend, Raumtemperatur). Der Primärantikörper gegen Avidin (siehe Tabelle 2.3) wurde 1:7000 in Waschpuffer verdünnt und die Membranen wurden einzeln damit eingeschweißt. Die Inkubation erfolgte bei Raumtemperatur, schwenkend für mind. 1 h. Die Antikörper-Lösung wurde recycelt und bei -25°C gelagert. Es wurde 3x10 min mit Waschpuffer gewaschen (schwenkend, Raumtemperatur). Der Sekundärantikörper wurde in Waschpuffer verdünnt (siehe Tabelle 2.4) und für 1 h mit den Membranen inkubiert (Raumtemperatur, schwenkend). Es wurde 3x10 min mit Waschpuffer gewaschen (schwenkend, Raumtemperatur). Die Entwicklung der Membranen erfolgte mittels der ECL-Reaktion (*Enhanced Chemiluminescence*) mit einer kommerziellen Lösung (Western Lightning, PerkinElmer Inc., Waltham, Massachusetts, USA) nach Herstellerangaben.

## 2.9 Massenspektrometrische Analyse

Proben für die massenspektrometrische Analyse waren, je nach experimenteller Fragestellung, Rohlysate mitochondrialer Fraktionen (siehe Abschnitt 2.4), oder CuAAC-(desthio-)biotinylierte Proben mit oder ohne Aufreinigung nach Abschnitt 2.7. Die Analyse wurde in der Massenspektrometrie-Facility von Prof. Henning Urlaub durchgeführt. Die Proben wurden in 15 µl Auftragspuffer (siehe Tabelle 2.15) der Facility übergeben. Dort wurden sie zunächst per SDS-Polyacrylamidelektrophorese aufgetrennt und Coomassie-gefärbt. Anschließend wurde der gewünschte Größenbereich aus jeder Spur ausgeschnitten und die darin enthaltenen Proteine wurden im Gel proteolytisch verdaut (Shevchenko et al., 2006). Für den Verdau wurden Trypsin und Chymotrypsin eingesetzt (Giansanti et al., 2016; Olsen, Ong, & Mann, 2004) und am Ende lagen die (chymo)-tryptischen Peptide in Probenpuffer vor (Acetonitril 2% (v/v) und Trifluoressigsäure 0,1% (v/v)). Die angewandte Tandem-massenspektrometrische Analyse LC-ESI (liquid chromatography electrospray ionization) beruhte auf Flüssigkeitschromatographie kombiniert mit Elektrosprayionisation (Mann, Hendrickson, & Pandey, 2001) und wurde in einem Zusammenschluss aus einem UltiMate 3000-RSLCnano HPLC-System und einem Q Exactive-Massenspektrometer (beide Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) durchgeführt. Zunächst wurden die Peptide durch RPC (reverse phase chromatography) für 3 min bei einer Flussgeschwindigkeit von 10 μl/min und maximalem Gegendruck über eine C18-Vorsäule (3 cm Länge, 100 µm innerer und 360 µm äußerer Durchmesser) entsalzt, dann wurde die eigentliche Analyse gestartet, indem der Vorsäule eine analytische C18-Säule nachgeschaltet wurde (30 cm Länge, 75 μm innerer Durchmesser, Eigenherstellung auf Basis von ReproSil-Pur C18 AQ 1.9 µm reversed phase resin, Dr. Maisch GmbH, Ammerbuch, Deutschland). Die Peptide wurden für 60 min und 50°C in einem linearen Gradienten von 5-35% (v/v) Puffer B (Acetonitril 80% (v/v) und Ameisensäure 0,1% (v/v)) bei einer Flussgeschwindigkeit von 300 nl/min und einem Gegendruck von 500 bar aufgetrennt. Der erste Datensatz (MS) wurde gewonnen, indem Vorläufer-Ionen mit einem Masse: Ladungs-Verhältnis (m/z) von 350 bis 1600 m/z bei einem Auflösungsvermögen von 70000 bei m/z 200 gescannt wurden. Für den zweiten Datensatz (MS2) wurden jeweils die 20 häufigsten Vorläufer-Ionen ausgewählt (DDA, data-dependent acquisition) und bei einem Auflösungsvermögen von 15000 bei m/z 200 bei einer maximalen Injektionszeit von 50 ms analysiert. Die Auswertung der Daten erfolgte mit Version 1.5.2.8

der Software Max Quant (Cox & Mann, 2008) und Version 1.5.5.3 Perseus (Tyanova *et al.*, 2016). Die Referenz-Datenbank war, neben Software-internen Kontrollmatrizen, die UniProtKB (*protein knowledgebase*)-Datenbank (www.uniprot.org).

## 2.10 Probenvorbereitung für die Fluoreszenzmikroskopie

Zur Untersuchung der räumlichen Verteilung der Proteinsynthese in Mitochondrien wurde die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition mit modifizierter Zusammensetzung angewendet, um Azid-funktionalisierte Fluoreszenzsonden (siehe Tabelle 2.5 und Abbildung 2.1) an die Zielproteine zu koppeln. Die mikroskopische Auswertung erfolgte entweder direkt, oder nach indirekter Signalverstärkung, indem ein Antigen mit einem Primärantikörper (siehe Tabelle 2.3) dekortiert wurde und anschließend selbst mit einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper (siehe Tabelle 2.4) nachgewiesen wurde.

## 2.10.1 Anpassungen der Methioninsubstitution

Die Zellen wurden nach Tabelle 2.8 auf Deckgläschen (Ø 12 mm, Paul Marienfeld GmbH & Co.KG, Lauda-Königshofen, Deutschland) in 6-Loch-Platten (je 4 Deckgläschen pro Kavität, Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) ausgesät. Für die Methioninsubstitution wurde je ein Deckgläschen in eine Kavität einer 24-Loch-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) transferiert. Die Methioninsubstitution erfolgte wie in Abschnitt 2.3.1 beschrieben mit dem Unterschied, dass in jedem Schritt je 1 ml Medium pro Kavität eingesetzt wurde. Die Inkubationsdauer in Mangel- und Inhibitor-Medium (siehe Tabelle 2.9) betrug jeweils 15 min, anschließend wurden die Zellen für 2,5 h oder für 15 min in Markierungsmedium (siehe Tabelle 2.9) inkubiert. Die Dauer der abschließenden Inkubation in Kulturmedium ohne Zusätze (siehe Tabelle 2.7) war abhängig von der Dauer der Inkubation in Markierungsmedium: Nach 2,5 h Markierung betrug sie 15 min und nach 15 min Markierung betrug sie 3,5 min. Anschließend wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und dann mit 4% w/v Formaldehyd in PBS pH 7,4 für 15 min fixiert, welches zuvor auf 37°C erwärmt worden war. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen. Die Platte wurde mit Parafilm versiegelt und bis zur Weiterverarbeitung in den Kühlschrank gestellt.

## 2.10.2 CuAAC auf fixierten Zellen

Die Vorbereitung und die CuAAC wurden in einer 24-Loch-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) mit je einem Deckgläschen pro Kavität durchgeführt. Die Zellen wurden bei RT für 15 min in je 2 ml Extraktionspuffer (siehe Tabelle 2.18) geschwenkt und anschließend bei RT viermal für 5 min und einmal für 30 min mit Waschpuffer (siehe Tabelle 2.18) gewaschen. Der CuAAC-Reaktionscocktail wurde nach Tabelle 2.19 vorbereitet, wobei Ascorbinsäure und CuSO<sub>4</sub> erst unmittelbar vor dem Einsatz zugegeben wurden. Jedes Deckgläschen wurde mit 500 µl überschichtet und bei RT für 30 min unter Lichtausschluss schwenkend inkubiert. Die Lösung wurde abgenommen und einmal durch frische 500 µl ersetzt und weitere 30 min inkubiert. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml Stop-Puffer (siehe Tabelle 2.19) gewaschen. Auf den Zellen wurde nun entweder eine klassische Immunmarkierung durchgeführt (siehe Abschnitt 2.10.3), oder sie wurden dreimal kurz mit je 1 ml PBS gewaschen, mit 6 µl Einbettmedium (Glycerol 25% w/v, Mowiol 4-88 9% w/v und Triethylendiamin (DABCO) 0,1% w/v in Tris 100 mM pH 8,5) eingedeckelt und bis zur Messung am Fluoreszenzmikroskop im Kühlschrank aufgehoben.

Stammlösungen	Extraktionspuffer		Waschpuffer		Hersteller
PBS 20x	1:20		/	/	Siehe Tabelle 2.1
	/	/	1.10	20	ICN Biomedicals Inc.,
WOP5XNa <sup>+</sup> 200 ΠIW μπ 7,4	/		1.10	20 11111	Aurora, Ohio, USA
Triton X100 5% w/v in H-O	1:10	0,5% w/v	/	/	Merck KGaA, Darmstadt,
					Deutschland
D. Manaital 1 M in H.O.	1.5	200 14	1.5	200 14	Sigma-Aldrich, Darmstadt,
	1.5	200 11101	1.5	200 11101	Deutschland
	1.250	1 mM	,	1	AppliChem GmbH,
LDTA 250 IIIWI PH 6	1.230	T 1111A1	/	/	Darmstadt, Deutschland

Tabelle 2.18: Komposition von Extraktions- und Waschpuffer.

**Tabelle 2.19:** Komposition des CuAAC-Reaktionsgemisches und des Stop-Puffers. Die Komponenten sind aufgelistet in derReihenfolge ihrer Zugabe. \* Sonden siehe Tabelle 2.5.

Stammlösungen	CuAAC-Re	CuAAC-Reaktionscocktail		o-Puffer	Hersteller
					Sigma-Aldrich,
Mannitol 1 M in H <sub>2</sub> O	1:5	200 mM	1:5	200 mM	Darmstadt,
					Deutschland
MOPS 100 mM					ICN Biomedicals
	1:9,765	10,2 mM	1:10	20 mM	Inc., Aurora, Ohio,
μπ 8,23					USA
					Sigma-Aldrich,
CAPSO 100 mM pH 11	1:20,533	4,87 mM	/	/	Darmstadt,
					Deutschland
PCA 100 mM** in					Fluka, Sigma-
	1:33,33	3 mM	/	/	Aldrich, Darmstadt,
MOPS 20 mivi pH 7,5					Deutschland
Azid-Sonde*	1:400	/	/	/	/
Ascorbinsäure					Sigma-Aldrich,
100 mM in MOPS	1:44,5	2,25 mM	/	/	Darmstadt,
50 mM pH 7,4					Deutschland
					Sigma-Aldrich,
$CuSO_4200~mM$ in $H_2O$	1:44,5	4,5 mM	/	/	Darmstadt,
					Deutschland
					AppliChem GmbH,
EDTA 250 mM pH 8	/	/	1:25	10 mM	Darmstadt,
					Deutschland

## 2.10.3 Indirekte Immunfluoreszenzmarkierung

Die Deckgläschen wurden in einer 24-Loch-Platte (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) für 20 min bei RT in je 1 ml Blockpuffer (BSA 5% w/v in 1xPBS) inkubiert. Jedes Deckgläschen wurde in eine

Feuchtekammer transferiert und mit je 200  $\mu$ l Primärantikörper-Lösung überschichtet (Antikörper nach Tabelle 2.3 verdünnt in Blockpuffer). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT unter Lichtausschluss. Die Primärantikörper-Lösung wurde abgetropft, die Deckgläschen in der 24-Loch-Platte dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und erneut in die Feuchtekammer transferiert. Die Deckgläschen wurden mit je 200  $\mu$ l Sekundärantikörper-Lösung überschichtet (siehe Tabelle 2.4, Verdünnung in Blockpuffer) und für 1 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung wurde abgetropft, die Deckgläschen wurden in der 24-Loch-Platte dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und erneut in die Feuchtekammer transferiert. Die sekundärantikörper-Lösung überschichtet (siehe Tabelle 2.4, Verdünnung in Blockpuffer) und für 1 h bei RT unter Lichtausschluss inkubiert. Die Sekundärantikörper-Lösung wurde abgetropft, die Deckgläschen wurden in der 24-Loch-Platte dreimal mit je 1 ml PBS gewaschen und anschließend mit 6  $\mu$ l Einbettmedium eingedeckelt und bis zur Messung am Fluoreszenzmikroskop im Kühlschrank aufgehoben.

## 2.11 Mikroskopie

## 2.11.1 Konfokale Mikroskopie

Für konfokale Aufnahmen wurde in dieser Arbeit ein Leica TCS SP8 Mikroskop (Leica, Wetzlar, Deutschland) verwendet. Dieses war mit Anregungswellenlängen von 458, 476, 488, 496, 514, 561 und 633 nm ausgestattet und verfügte zudem über eine UV-Diode für eine Anregung bei 405 nm. Ein AOBS (*acousto-optical-beam-splitter*) trennte Anregung und Emission voneinander. Das Mikroskop detektierte die Emission mit zwei PMTs (*photomultiplier tube*) und war zusätzlich mit einem Leica HyD Hybrid-Detektor für schwache Fluoreszenzsignale, mit einem Durchlichtkanal und einer monochromen 12 bit CCD-Kamera ausgestattet. Alle Aufnahmen wurden mit einem Öl-Immersionsobjektiv (HC PL APO CS2 63x/1.40 Öl) bei einer Scan-Geschwindigkeit von 200 Hz und einer Pinhole-Größe von einer Airy-Scheibe gemacht, wobei die Voxel-Größe nach dem Nyquist-Kriterium gewählt wurde. Alle Messungen waren z-Stapel und für die einzelnen Ebenen wurden jeweils drei Einzelaufnahmen gemittelt (*line average*).

## 2.11.2 STED-Mikroskopie

Hochauflösende STED-Aufnahmen entstanden an einem Zweifarben-STED 775 QUAD scanning Nanoskop von Abberior Instruments (Göttingen, Deutschland). Dieses war ein Mehrfarbkanalkonfokales System auf Basis eines Olympus IX83 Mikroskops mit Vierfarb-LED-Beleuchtungsquelle und einer monochromen Weitfeldkamera und der zusätzlichen Option zweier hochauflösender STED-Kanäle. Zwei Laser dieses Systems entsprachen nicht der Standardausstattung: Der 775 nm STED-Laser war ein Katana-08 HP (Onfive GmbH, Regensdorf, Schweiz) und der 640 nm Anregungslaser war ein LDH-D-C-640 (PicoQuant, Berlin, Deutschland). Alle Aufnahmen wurden mit einem Öl-Immersionsobjektiv (Olympus UPlanSApo 100x/1,40 Oil [infinity]/0,17 / FN26,5) und einer Pinhole-Größe von 0,8 Airy-Scheiben gemacht.

Die Untersuchung der räumlichen Verteilung mitochondrialer Proteinsynthese erfordert eine Methode, die selektiv naszierende mitochondrial codierte Proteine markiert. Der Einbau nichtkanonischer Aminosäuren in naszierende Proteine anstelle einer kanonischen ist sowohl in Bakterien (Kiick *et al.*, 2002; van Hest *et al.*, 2000), als auch für die cytosolische Proteinsynthese eukaryotischer Zellen (Beatty & Tirrell, 2008; Dieterich *et al.*, 2006) gut belegt. In dieser Arbeit wurde die metabolische Markierung erstmalig auch auf die mitochondriale Proteinsynthese übertragen.

# 3.1 Etablierung eines CuAAC-Reaktionscocktails

Der erste Schritt bestand in der Etablierung eines wässrigen CuAAC-Reaktionscocktails, in dem sehr geringe Mengen sehr hydrophoben Proteins schonend umgesetzt werden konnten.

## 3.1.1 Schutz der Proteine durch die Wahl der Reaktionskomponenten

Obwohl die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition (CuAAC) zwischen terminalem Alkin und organischem Azid umfangreich untersucht (Bock *et al.*, 2006; C. L. Wang *et al.*, 2016) und in Verbindung mit biologischem Material eingesetzt wird (Agard *et al.*, 2006; Best, 2009), stellt ihr Einsatz mit komplexen Biomolekülen wie Proteinen eine Herausforderung dar. Cu<sup>+</sup> ist unentbehrlich für die



**Abbildung 3.1:** Einfluss des Reduktionsmittels auf die Proteine. HeLa-Zellen wurden für 24 h mit 50  $\mu$ M HPG inkubiert, anschließend wurde Alexa488 per CuAAC an HPG-positive Proteine aus Gesamtzellextrakt gekoppelt und im Western Blot per Antikörper gegen Alexa488 nachgewiesen. **M**: Größenstandard in kDa. **a**: Ponceau-Färbung. **b**: ECL-Reaktion. **1**: CuAAC mit Ascorbinsäure/CuSO<sub>4</sub>/BCA (Verhältnis 10:1:1). **2**: Unbehandeltes Lysat, keine CuAAC. **3**: CuAAC mit TCEP/CuSO<sub>4</sub>/BCA (Verhältnis 1:1:2).

Reaktion, ist aber auch instabil und wird daher häufig in situ durch Reduktion von Cu<sup>2+</sup>, bevorzugt durch Ascorbinsäure (Meldal & Tornoe, 2008; Rostovtsev et al., 2002), generiert. Auch in dieser Arbeit wurde zunächst die Kombination aus Ascorbinsäure und Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>) erprobt, die zwar zuverlässig den Nachweis cytosolischer Proteinsynthese in HeLa-Zellen erlaubte, im Vergleich zum Lysat ohne CuAAC allerdings auch zu schweren Schäden an den Proteinen führte. Derartige Schäden äußerten sich im Verblassen einzelner Proteinbanden zu einem Schmier (siehe Abbildung 3.1). Zum Schutz dieser besseren sollte auf Ascorbinsäure als Reduktionsmittel

verzichtet werden. Ein weiteres Reduktionsmittel, das in der Literatur in Zusammenhang mit biologischen Proben in der CuAAC Erwähnung findet, ist Tris-(carboxyethyl)-phosphin, TCEP, (Speers,

Adam, & Cravatt, 2003; Speers & Cravatt, 2004; Q. Wang *et al.*, 2003). TCEP (siehe Abbildung 3.2) wurde ursprünglich als geruchsloses, schwefelfreies Reduktionsmittel für Disulfidbrücken beschrieben (Burns *et al.*, 1991). Q. Wang *et al.* (2003) zeigen, dass TCEP nur dann in der Lage ist die CuAAC ablaufen zu lassen, wenn ein Cu<sup>+</sup>-stabilisierender Ligand eingesetzt wird. In dieser Arbeit wurde die Idee von Christen *et al.* (2012) aufgegriffen, Bicinchoninsäure (BCA) als Liganden einzusetzen (siehe Abbildung 3.2). Dabei wurde die freie Säure von BCA verwendet, da das sonst übliche Kalium-Salz nicht eingesetzt werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.4). Das Ansetzen von BCA-Stammlösungen zeigte schnell, dass die freie Säure offenbar vollständig deprotoniert werden musste, um in Lösung gehen zu können. BCA besitzt zwei Carboxylgruppen und benötigte zur Solubilisierung stöchiometrisch die doppelte Menge Natronlauge. Zudem mussten gepufferte Stammlösungen mindestens einen pH-Wert von 7,5 haben. Die Folge daraus war, dass auch der pH-Wert des CuAAC-Reaktionscocktails nicht unter 7 sinken durfte, um den "Zusammenbruch des Reaktionscocktails", eine Präzipitation des [2 BCA x Cu<sup>+</sup>]-Komplexes (dargestellt in Abbildung 3.2), zu vermeiden. In Lösung hat der [2 BCA x Cu<sup>+</sup>]-Komplex einen charakteristischen lila Farbton (P. K. Smith *et al.*, 1985). Kam es allerdings zum



Zusammenbruch des Reaktionscocktails, entfärbte sich dieser bei gleichzeitigem Auftreten eines grünlichen Präzipitats. Die Zugabe einer geringen Menge Natronlauge konnte einen solchen Zusammenbruch umkehren und den stabilen

**Abbildung 3.2** Kernkomponenten der CuAAC. **a**: Tris-(carboxyethyl)-phosphin (TCEP). Es verfügt über drei Carboxylgruppen und bringt ein weiteres Molekül HCl mit. **b**: Cu<sup>+</sup> von zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA) cheliert. Dieser Komplex hat einen charakteristischen tief lila Farbton und ist sowohl im BCA-Assay (P. K. Smith *et al.*, 1985) als auch bei der Etablierung des CuAAC-Reaktionscocktails in dieser Arbeit die relevante Messgröße.

wiederherstellen. Der lila Farbton lieferte in dieser Arbeit einen wichtigen Anhaltspunkt

Farbumschlag

für die Etablierung eines effizienten CuAAC-Reaktionscocktails, da Cu<sup>+</sup> erst bei der Mischung von CuSO<sub>4</sub> und TCEP entsteht und die Geschwindigkeit des Farbumschlags genutzt wurde, um die Effizienz der Reduktion von CuSO<sub>4</sub> durch TCEP zu beurteilen. Dieser lief je nach gewählter Stöchiometrie von TCEP zu Kupfer zu BCA so langsam oder gar nicht ab, dass er mit bloßem Auge verfolgt werden konnte. Während der Farbumschlag in Gegenwart von Ascorbinsäure stets deutlich weniger als eine Sekunde brauchte, wurde dies für TCEP nur unter optimalen stöchiometrischen Bedingungen beobachtet. Dieses optimale Verhältnis von TCEP zu Kupfer wurde mit 1:2 ermittelt. Ein Überschuss von TCEP

gegenüber Kupfer verlangsamte den Farbumschlag immens, was gleichbedeutend mit einer sehr geringen Reduktionseffizienz war. Diese Beobachtung steht in Einklang mit Q. Wang *et al.* (2003), die ebenfalls zeigen, dass zu viel TCEP die CuAAC inhibiert. Eine effiziente CuAAC war nur möglich, wenn sowohl ein schneller Farbumschlag erreicht, als auch der Zusammenbruch des Reaktionscocktails verhindert wurde. In vielen Studien wird die CuAAC nicht im rein wässrigen System durchgeführt (Meldal & Tornoe, 2008), weshalb auch in dieser Arbeit, im Bestreben die Effizienz der Reduktion von CuSO<sub>4</sub> durch TCEP weiter zu erhöhen, der wässrige Reaktionscocktail um verschiedene organische Lösungsmittel ergänzt wurde . Dabei wurde entdeckt, dass die Zugabe von tert-Butanol (siehe Abbildung 3.3) zum CuAAC-Reaktionscocktail den pH-abhängigen Zusammenbruch verhinderte und den Farbumschlag stark beschleunigte. Damit nahm tert-Butanol eine zentrale Rolle für die Erhöhung



**Abbildung 3.3:** Struktur der eingesetzten Radikalfänger a: tert-Butanol. b: Mannitol. Der Einsatz dieser Moleküle, insbesondere der von a, ermöglichte den Einsatz von TCEP als Reduktionsmittel in der CuAAC. der Reduktionseffizienz von CuSO<sub>4</sub> durch TCEP ein. Tert-Butanol ist ein Radikalfänger (Cederbaum, Qureshi, & Cohen, 1983; von Piechowski *et al.*, 1992). Deshalb wurde auch Mannitol (Goldstein & Czapski, 1984; Smirnoff & Cumbes, 1989), ein weiterer Radikalfänger (siehe Abbildung 3.3), erprobt. Mannitol wirkte ähnlich positiv auf den Farbumschlag, war aber schwächer als tert-Butanol und konnte den Zusammenbruch des Cocktails nur bei niedriger Kupferkonzentration verhindern. Am Ende wurden beide Radikalfänger kombiniert eingesetzt (Mannitol ca. 200 mM,

tert-Butanol ca. 32% v/v). Der Einsatz von tert-Butanol in der CuAAC ist bereits berichtet worden (Meldal & Tornoe, 2008; Speers *et al.*, 2003). Erst mit der Gegenwart von tert-Butanol und BCA als Ligand war eine erfolgreiche CuAAC mit TCEP als Reduktionsmittel überhaupt möglich. Dabei wurde das Ziel, die Proteine durch den Einsatz von TCEP besser zu schützen, erreicht. Dies wurde zunächst im Gesamtzellextrakt für cytosolische Proteinsynthese daran gezeigt, dass das im Polyacrylamidgel erzeugte Bandenmuster einer Probe deutlich besser mit dem Muster unbehandelten Extrakts übereinstimmte, wenn anstelle von Ascorbinsäure TCEP als Reduktionsmittel eingesetzt wurde (siehe Abbildung 3.1).

Gleichzeitig allerdings verringerte sich durch den Einsatz von TCEP aber auch die Effizienz der CuAAC, was sich im Western Blot in einem schwächeren Nachweis für cytosolische Proteinsynthese äußerte (siehe Abbildung 3.1). Die Erhöhung der CuSO<sub>4</sub>-Konzentration in der CuAAC steigerte die Effizienz der Reaktion mit TCEP, säuerte den Cocktail aber auch stärker an, was das Risiko des Zusammenbruchs trotz des Einsatzes von tert-Butanol wieder erhöhte. Um den Reaktionscocktail endgültig pH-stabil zu halten, mussten der CuAAC noch Puffer zugesetzt werden. Die Wahl für die Hauptkomponente fiel auf

3-(N-Morpholino)-propansulfonsäure (MOPS, siehe Tabelle 2.2), die – im Gegensatz zu vielen anderen Puffern – eine vernachlässigbar geringe Interaktion mit Metall-Ionen zeigt (Good & Izawa, 1972) und damit nicht störend mit dem Kupfer-Katalysator interagierte. Der Nachteil von MOPS war der pK<sub>5</sub> von 7,2, da der Cocktail mindestens pH 7 halten musste und die Ansäuerung durch die Zugabe von Kupfer sehr stark ausfiel. Gleichzeitig aber beeinträchtigten hohe Konzentrationen an Puffer, egal welchem, die Reduktionseffizienz. Systematische Tests an Cocktails, die nur aus H<sub>2</sub>O, tert-Butanol, BCA, TCEP, CuSO<sub>4</sub> und den jeweiligen Puffern bestanden, ergaben, dass eine Kombination aus 8,4 mM MOPS und 4 mM 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure (CAPSO, siehe Tabelle 2.2 und Abschnitt 2.6) sogar der Ansäuerung durch 4,5 mM CuSO<sub>4</sub> standhalten konnte (siehe Tabelle 3.1). Ausschlaggebend dafür waren derart alkalische Puffer-Stammlösungen, dass die Puffer nahezu vollständig deprotoniert vorlagen (pH 8,2 für MOPS und pH 11 für CAPSO, siehe Tabelle 2.13) und nach der Mischung von BCA, TCEP und CuSO<sub>4</sub> auch gering konzentriert genügend Kapazität hatten, die fortlaufende Ansäuerung abzufangen. Um dieser Puffer-Kombination mehr Spielraum zu lassen und weil es für eine effiziente CuAAC ausreichend war, wurden im finalen CuAAC-Reaktionscocktail 3 mM CuSO<sub>4</sub> eingesetzt.

Durch den Einsatz des Reduktionsmittels TCEP wurden die Proteine in der CuAAC deutlich besser geschützt. Die Wahl von TCEP und dem Liganden BCA stellten allerdings selbst hohe Anforderungen an die Kernkomponenten der CuAAC, die das Verhältnis von TCEP zu CuSO<sub>4</sub>, den Einsatz des Radikalfängers tert-Butanol und die umsichtige Kontrolle des pH-Wertes der Reaktion umfassten.

Tabelle	3.1:	Optimierung	des	pH-Wertes	bei	angegebenen	Puffer-	und	Kupferkonzentrationen,	jeweils	in	Doppel-
bestimm	nung.	Die Vorbereitu	ung d	les Master-N	1ix e	rfolgte nach de	m Schen	na vor	n Tabelle 2.13. Der pH-We	ert wurde	e jev	weils vor
der Zuga	abe v	on TCEP bestir	mmt,	unmittelba	r dar	nach und ansch	ließend	nach	der Zugabe von CuSO <sub>4</sub> fi	ir 2 min,	bis	er nicht
mehr we	eiter g	gesunken ist.										

Puffer im Master-Mix	pH Master-Mix	pH mit TCEP	pH mit CuSO <sub>4</sub>	
MOPS pH 8	7,54	7,57	6,27	
CuSO₄ <b>4,5</b> mM	7,52	7,56	6,33	
MOPS pH 8,2	7,66	7,7	6,48	
CuSO₄ <b>4,5</b> mM	7,62	7,69	6,4	
MOPS pH 8	7,5	7,61	7,04	
CuSO₄ <b>1,5</b> mM	7,56	7,62	7,06	
MOPS pH 8,2	7,63	7,74	7,17	
CuSO₄ <b>1,5</b> mM	7,65	7,73	7,15	
MOPS pH 8,2	8,63	8,41	6,86	
CAPSO pH 10	9 57	8 36	6.95	
CuSO₄ <b>4,5</b> mM	0,54	0,50	0,00	
MOPS pH 8,2	9	8,7	6,97	
CAPSO pH 10,5	8 00	8 71	6.05	
CuSO4 <b>4,5</b> mM	0,55	0,71	0,95	
MOPS pH 8,2	9,2	8,93	7,04	
CAPSO pH 11	0.16	9.01	7.05	
CuSO4 <b>4,5</b> mM	5,10	0,91	7,05	

## 3.1.2 Optimierung der Stöchiometrie der Reaktanden

Bis hierhin werden die Kernkomponenten des CuAAC-Reaktionscocktails genannt, die den Einsatz von TCEP als Reduktionsmittel ermöglichten. Von besonderer Bedeutung für die CuAAC ist der Ligand, hier BCA, dessen Einfluss auf die Reaktionseffizienz im Folgenden anhand einer Konzentrationsreihe im Verhältnis zu CuSO<sub>4</sub> untersucht wird. Zahlreiche Veröffentlichungen zeigen, dass eine ganze Reihe an



**Abbildung 3.4:** Konzentrationsreihe von BCA bei konstanter Konzentration von CuSO<sub>4</sub> (3 mM) in der CuAAC. Biotin-PEG<sub>3</sub>-azid wurde an HPGpositive Proteine aus HeLa-Gesamtzellextrakt gekoppelt und im Western Blot per Antikörper gegen Biotin nachgewiesen **M**: Größenstandard in kDa. **1**: CuAAC ohne BCA. **2**: Verhältnis CuSO<sub>4</sub>:BCA 1:0,66. **3**: Verhältnis 1:1. **4**: Verhältnis 1:1,33.

Liganden die Effizienz der CuAAC steigern können, ein Überschuss aber in den meisten Fällen zu der Inhibierung der Reaktion führt (Christen et al., 2012; Lewis et al., 2004; Q. Wang et al., 2003). Dieser Zusammenhang wurde auch hier experimentell gezeigt, zu Testzwecken zunächst erneut in HeLa-Gesamtzellextrakt cytosolische für Proteinsynthese. Dabei wurde bei konstanter Konzentration von CuSO4 die Konzentration von BCA variiert und gezeigt, dass stöchiometrisch bei einem Molekül CuSO<sub>4</sub> auf 0,66 Moleküle BCA die höchste Reaktionseffizienz erreicht wurde (siehe Abbildung 3.4). Schon äquimolare Mengen von CuSO<sub>4</sub> und BCA senkten die Reaktionseffizienz, obwohl Kupfer von BCA im Verhältnis 1:2 koordiniert wird (siehe Abbildung 3.2). Je mehr BCA darüber hinaus eingesetzt wurde, desto schlechter lief die

CuAAC und auch der Verzicht auf BCA verringerte die Reaktionseffizienz deutlich. Für den Nachweis mitochondrialer Proteine lag das finale Verhältnis von CuSO<sub>4</sub> zu BCA mit 1:0,54 bei noch weniger BCA. Obwohl nur wenig BCA erforderlich war, war dessen positiver Einfluss auf die Effizienz der CuAAC dennoch stark.

Auch die Konzentrationen von terminalem Alkin und der Azid-Sonde waren von Bedeutung. Erstere stellte insofern eine Herausforderung dar, als es keine Möglichkeit gab, den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure HPG in Proteine zu quantifizieren. Damit war die Konzentration vorhandener Alkin-Reste in den Protein-Lysaten unbekannt. In dieser Arbeit wurden Zellen mit Konzentrationen von 5-500  $\mu$ M HPG über verschiedene Zeiträume inkubiert. Der Nachweis cytosolischer Proteinsynthese erfolgte nach Inkubation der Zellen mit 50  $\mu$ M HPG für 28 h (siehe Abbildung 3.1 und Abbildung 3.4). Für den Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese (siehe Abschnitt 3.2) waren aber, aufgrund der Fragestellung dieser Arbeit nach der räumlichen Verteilung und auch technisch bedingt durch den Einsatz der Proteinsynthese-Inhibitoren Cycloheximid und Thiamphenicol, deutlich kürzere Zeiträume von bis zu <1h nötig. Dafür wurde die HPG-Konzentration auf 500  $\mu$ M angehoben. Die

Konzentration der Azid-Sonde wurde direkt bestimmt und das Optimum lag bei 2 mM Azid-Sonde in 150  $\mu$ l CuAAC-Reaktionscocktail. Zusammen mit der sehr hohen Kupfer-Konzentration (3 mM) wurde die sehr geringe Menge an Alkin so kompensiert, was den Nachweis der geringen Proteinmenge, die die HPG-positive Population mitochondrial translatierter Proteine darstellte, ermöglichte.

## 3.1.3 Stabilisierung der Proteine durch Alkylierung

Trotz aller Schutzmaßnahmen, die mit der Komposition des TCEP-basierten CuAAC-Reaktionscocktails ergriffen wurden, liegen in der Primärstruktur jedes Proteins viele Risiken, unspezifisch angegriffen zu werden, insbesondere wenn ein Übergangsmetall wie Kupfer in erhöhter Konzentration in der Lösung vorliegt. Ein Beispiel ist die sequenzspezifische Peptidspaltung, die auftreten kann, wenn Histidin-Reste, die in unmittelbarer Nachbarschaft zu Threonin- oder Serin-Resten sitzen, Cu<sup>2+</sup> binden (Allen & Campbell, 1996). In Tabelle 3.2 sind alle His/Thr- und His/Ser-Sequenzen in den 13 humanen mitochondrialen Proteinen zusammengefasst. 9 der 13 Proteine sind dem Risiko einer solchen Degradation ausgesetzt.

Auch die CuAAC kann zu Nebenprodukten führen. Das terminale Alkin birgt die größten Risiken unerwünschter Seitenreaktionen. So sind Alkin-Alkin-Dimerisierungen (Hein & Fokin, 2010) eine Gefahr, aber auch die Thiol-Gruppe von Cystein-Resten kann in einer Alkin-Hydrothiolierung sogar von nicht aktivierten Alkinen angegriffen werden, wenn das Thiol zuvor selbst ein Radikal gebildet hat (Dondoni & Marra, 2014). Im Falle HPG-positiver Proteine drohen hier unerwünschte kovalente Verknüpfungen zwischen den Proteinen. Tabelle 3.2 listet auch die Cystein-Reste der mitochondrialen Proteine auf und zeigt, dass 10 der Proteine Cystein-Reste tragen.

Protein	Gesamtlänge	Thr/His	Ser/His	Cys-Reste	Met-Reste
ND1	318	0	0	0	16 (5%)
ND2	347	2	1	0	25 (7,2%)
ND3	115	0	0	1 (0,8%)	8 (6,9%)
ND4	459	3	2	3 (0,6%)	27 (5,8%)
ND4L	98	1	2	3 (3%)	10 (10,2%)
ND5	603	3	2	6 (0,9%)	26 (4,3%)
ND6	174	0	0	1 (0,5%)	10 (5,7%)
Cytochrom b	380	0	3	2 (0,5%)	15 (3,9%)
Cox1	513	1	2	1 (0,2%)	32 (6,2%)
Cox2	227	0	2	3 (1,3%)	10 (4,4%)
Cox3	261	2	4	1 (0,3%)	11 (4,2%)
ATP6	226	0	0	0	12 (5,3%)
ATP8	68	0	1	1 (1,4%)	6 (8,8%)

**Tabelle 3.2:** Informationen zur Primärstruktur der 13 humanen mitochondrialen Proteine. Es werden die Summen aller Threonin/Histidin (**Thr/His**) und Serin/Histidin (**Ser/His**) Sequenzabschnitte angegeben (jeweils von N- und C-Terminus ausgehend). In Gegenwart von Cu<sup>2+</sup> können hier Peptidspaltungen auftreten. Die Gesamtzahl der Cystein und Methionin-Reste (**Cys** und **Met**) wird angegeben, ebenso wie ihr prozentualer Anteil an der Gesamtsequenz.

Um die Proteine besser zu schützen, wurden sie mit Iodessigsäure alkyliert (siehe Abbildung 3.5 **a**). Diese greift Cystein, Histidin, Lysin, Methionin und N-terminale α-amino-Gruppen an (Gurd, 1967). Die Spezifität gegenüber einzelnen Aminosäuren ist abhängig von der Ionisierung ihrer Seitenketten und kann somit über den pH-Wert kontrolliert werden (Cole, Stein, & Moore, 1958; Crestfield, Moore, & Stein, 1963; Gundlach, Stein, & Moore, 1959; Gurd, 1967). Die einzige Ausnahme ist Methionin, das bei allen pH-Werten umgesetzt wird (Vithayathil & Richards, 1960). Um die erwähnten Aminosäuren effizient mit Iodessigsäure zu modifizieren, wurde die Alkylierung konsekutiv bei zwei pH-Werten (~5,4 und ~9) durchgeführt (siehe Tabelle 3.3). Die Pufferkompositionen waren so berechnet, dass der pH-Wert während der Alkylierung nicht durch Titration angepasst werden musste, was durch pH-Messung an einem Protein-freien Testcocktail bestätigt wurde (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Pufferkonzentration und pH-Werte während der Alkylierung. **pH**<sub>s</sub> ist der Soll-pH-Wert, **pH**<sub>Exp</sub> der gemessene nach Mischung der Alkylierungslösungen. Das Protokoll der Alkylierung ist in Abschnitt 2.5.3 aufgeführt.

	Saure Alkylierung	Basische Alkylierung
Essigsäure	22,5 mM	11,25 mM
CAPSO	/	25mM
Gesamtvolumen	100 μl	200 µl
pHs	5,4	9
pH <sub>Exp</sub>	5,45	8,98



**Abbildung 3.5: a)** Alkylierungsreagenz Iodessigsäure. **b)** Nachweis von ND5 im Western Blot auf mitochondriale Fraktion ohne Alkylierung (links) und mit Alkylierung (rechts). **c)** Ponceau-Färbung von jeweils 4,5 μg mitochondrialer Fraktion nach der CuAAC ohne Alkylierung (**1**) und mit Alkylierung (**2**). Größenstandard in kDa.

Mit Hilfe der Alkylierung konnten die Proteine in der CuAAC noch besser geschützt werden. Im Vergleich unbehandeltem und alkyliertem von Lysat mitochondrialer Fraktion in einer Ponceau-Färbung zeigt sich der stabilisierende Einfluss der Alkylierung durch eine höhere Bandenschärfe in der alkylierten Probe (siehe Abbildung 3.5 c). Vor allem im Bereich von 70-180 kDa zeigt sich ohne Alkylierung eher ein Schmier, einzelne Banden stechen kaum noch hervor. Das Ausmaß ist nicht so groß wie bei Einsatz von Ascorbinsäure (siehe Abbildung 3.1), aber im Vergleich wird dennoch ersichtlich, dass die

Alkylierung die Proteine noch besser vor unerwünschten Seitenreaktionen schützen kann, auch wenn TCEP als mildes Reduktionsmittel zum Einsatz kommt.

Sichtbar wurde dieser Einfluss auch beim Nachweis des mitochondrialen Proteins ND5 mit Antikörper im Western Blot (siehe auch Abschnitt 3.2.3). ND5 änderte nach Alkylierung sein Laufverhalten leicht (siehe Abbildung 3.5 b). Ein ähnliches Verhalten zeigte Cox3, nicht aber Cox1 (beide siehe Abschnitt 3.2.3), sodass das veränderte Laufverhalten nicht einfach auf die Veränderung der Masse

der Proteine zurückgeführt werden konnte, sondern von einem schützenden Effekt durch die Alkylierung ausgegangen wurde. Dazu passte auch die Beobachtung, dass der Nachweis mitochondrialer Syntheseprodukte in den anspruchsvollen, weil sehr langsam wachsenden primären Fibroblasten generell nur nach Alkylierung gelang (siehe Abschnitt 3.2.2, Abbildung 3.11).

#### 3.1.4 Optimierung der CuAAC für den Nachweis hydrophober Proteine

Alle 13 mitochondrial translatierten Proteine sind integrale Membranproteine. Um diese in der CuAAC nachweisen zu können, müssen sie während der Reaktion in Lösung gehalten werden. Da diese Arbeit keine intakt gefalteten Proteinstrukturen erforderte und die Zielproteine lediglich solubilisiert werden mussten, wurde mit Natrium-Dodecylsulfat (SDS) gearbeitet. Tert-Butanol war für die CuAAC mit TCEP unerlässlich (siehe Abschnitt 3.1.1). Allerdings verringerte es gleichzeitig die Löslichkeit von SDS und sorgte so für Proteinverlust, erkennbar an deutlichem Präzipitat und erfolgloser CuAAC. Dieses Problem konnte behoben werden, indem dem CuAAC-Reaktionscocktail Glycerol in einer Endkonzentration von ca. 13% w/v und 160 mM NaCl zugesetzt wurden. Nur gemeinsam konnten diese Chemikalien die Löslichkeit von SDS in Gegenwart von tert-Butanol erhöhen.

Bedingt durch die hohe NaCl-Konzentration musste nun wiederum ein besonderer Fokus auf zwei physikalische Eigenschaften von SDS gelegt werden: Die kritische mizelläre Konzentration (critical micellar concentration, CMC) und die kritische mizelläre Temperatur (critical micellar temperature, CMT, auch Krafft-Punkt). Die CMC beschreibt die nötige Konzentration von SDS, ab der sich Mizellen bilden und CMT die Temperatur, ab der dies möglich ist. Beide Prozesse sind im Falle von SDS in erheblichen Maße abhängig von der NaCl-Konzentration. Die CMT steigt mit steigender NaCl-Konzentration auf etwa 21°C bei 150 mM NaCl (Mazer, Benedek, & Carey, 1976). Damit musste bereits bei Raumtemperatur mit einem Verlust von Proteinen gerechnet werden. Aus diesem Grund wurden Proteinlysate in SDS behandelt mit Protease-Inhibitoren und nach Reduktion von Disulfidbrücken bei 28°C inkubiert, sowohl vor als auch während der CuAAC. Erst nach der Fällung der Proteine wurde wieder auf Raumtemperatur gearbeitet. Auch auf die CMC musste genau geachtet werden. Nicht so sehr während der CuAAC, weil sie mit steigender NaCl-Konzentration von etwa 8 mM in Wasser auf ca. 1,4 mM bei 100 mM NaCl sinkt (Reynolds & Tanford, 1970). Bei der Beendigung der CuAAC hingegen war es umso wichtiger, weil beobachtet wurde, dass selbst der letzte Arbeitsschritt vor der Fällung von Proteinen mit Methanol zu nahezu vollständigem Materialverlust führte, wenn SDS dadurch unter seine CMC verdünnt wurde. Um mitochondriale Proteine oder deren Modifikation im Western Blot nachweisen zu können, musste bis zur PAGE immer auf CMC und CMT von SDS geachtet werden. Im finalen CuAAC-Reaktionscocktail (150 µl Gesamtvolumen) lag die SDS-Konzentration bei 42 mM ( $\triangleq$  1,2% w/v). So waren während der CuAAC etwa 1800 µg SDS in dem System vorhanden und pro Reaktion wurden 30 bis maximal 90 µg Protein eingesetzt, um stets einen hohen Überschuss an

SDS über Protein zu haben. Auch die CuAAC-Stopp-Lösung wurde so angesetzt, dass SDS nach Zugabe bei 42 mM blieb.

Ein weiterer Punkt in Bezug auf den Einsatz von Natrium-Dodecylsulfat war die konsequente Vermeidung von Kalium-Ionen. Diese bilden mit Dodecylsulfat das praktisch unlösliche Kalium-Dodecylsulfat (H. Suzuki & Terada, 1988; Trask, Didonato, & Muller, 1984). Um Proteinverlust zu vermeiden, wurden Kalium-Ionen in den Proteinlysaten und in der CuAAC vermieden. Betroffen war davon BCA, da es kommerziell vor allem als Kalium-Salz erhältlich ist. Stattdessen wurde die freie Säure von BCA eingesetzt.

Die Hydrophobizität der mitochondrial translatierten Proteine war eine weitere Herausforderung, die den CuAAC-Nachweis erschwerte. Diesem Problem wurde mit dem Detergenz SDS begegnet, was, ähnlich dem Einsatz von TCEP und BCA (siehe Abschnitt 3.1.1), in einigen Anforderungen mündete, die es an den CuAAC-Reaktionscocktail stellte. Diese waren die aufmerksame Regulation der Detergenz-Konzentration, der Reaktionstemperatur und der Ausschluss von Kalium-Ionen.

## 3.1.5 Etablierung eines Nachweissystems

Mit dem bis hierhin beschriebenen Reaktionscocktail können auch hydrophobe Proteine schonend in der CuAAC umgesetzt werden. Der letzte Grundpfeiler, der für die Detektion HPG-positiver mitochondrialer Proteinsyntheseprodukte im Western Blot noch fehlte, war der Nachweis sehr geringer Proteinmengen auf der Nitrocellulose-Membran. Nur 13 der rund 1000 Proteine des mitochondrialen Proteoms sind im mitochondrialen Genom codiert. Der Anteil an diesen 13 Proteinen, der innerhalb weniger Stunden neu synthetisiert wird und daher HPG-positiv ist, ist sehr gering gemessen an der Gesamtproteinmenge der mitochondrialen Fraktion, die in eine CuAAC eingesetzt wird. Generell wurden HPG-positive Proteine in der CuAAC mit Azid-funktionalisierter (Desthio-)Biotin-Sonde umgesetzt (CuAAC-(Desthio-)Biotinylierung). Der alleinige Nachweis mit einem Antikörper gegen Biotin wie im Falle der cytosolischen Synthese (siehe Abbildung 3.4) war hier nicht empfindlich genug. Zu diesem Zweck wurde das Neutravidin-System entwickelt. Dessen Prinzip war der Nachweis von CuAAC-Biotinylierung an Proteinen auf einer Membran mittels erstens der Dekoration mit Neutravidin (ein deglycosyliertes Avidin), zweitens einem Antikörper gegen (Neutr-)Avidin und drittens einem klassischem Sekundärantikörper. Avidin hat einen isoelektrischen Punkt von >10 (Bayer & Wilchek, 1990) und zusammen mit seiner Glycosylierung zeigte es einen hohen unspezifischen Hintergrund. So war selbst für Neutravidin ein Puffersystem mit hohem pH-Wert (9,5) nötig, um unspezifische Interaktionen effizient zu reduzieren. Mit diesem System konnte die Sensitivität im Western Blot deutlich gesteigert werden. Die hohe Sensitivität des Systems wurde



Abbildung 3.6: Empfindlichkeitssteigerung der Detektion im Western Blot durch das Neutravidin-System. Biotinyliertes Rinderserumalbumin (BSA) wurde in den angegebenen Mengen aufgetragen und nur mit dem Antikörper gegen Biotin (oben) und dem Neutravidin-System (unten) entwickelt. Alle Bandenintensitäten sind direkt vergleichbar, weil es dieselbe Membran ist, belichtet für 1 min.

gezeigt, indem biotinyliertes Rinderserumalbumin einmal direkt mit einem Antikörper gegen Biotin dekoriert wurde und einmal mit dem Neutravidin-System. Der Unterschied in der Signalstärke war so groß, dass 10 ng BSA mit dem Neutravidin-System deutlich stärker markiert wurden, als 1000 ng mit dem Antikörper allein (siehe Abbildung 3.6). Aufgrund der enormen Sensitivität ließ sich ein gewisser Hintergrund allerdings nicht

gänzlich verhindern. Dieser Hintergrund konnte gesenkt werden, indem Kupfer nach der CuAAC mit einem Chelator gebunden und so während der Fällung von den Proteinen abgetrennt wurde. Bewerkstelligt wurde dieses mit dem Chelator TPEN (siehe Abbildung 3.7), der zur Beendigung der CuAAC eingesetzt wurde. TPEN cheliert zweiwertige Metall-Ionen (Hirayama *et al.*, 1996) und sein Einsatz sorgte für eine sehr schnelle Entfärbung des Reaktionscocktails. Seine Besonderheit liegt in der Abwesenheit von Carboxylgruppen, weshalb er weniger ladungsabhängig ist als EDTA (siehe Abbildung 3.7) und Kupfer auch bei neutralem pH-Wert sehr effizient bindet (Anderegg *et al.*, 1977). Damit war TPEN sehr gut geeignet für die Beendigung einer angesäuerten TCEP-reduzierten CuAAC. Ein bemerkenswertes Detail war, dass Mannitol im CuAAC-Reaktionscocktail zu einer Verschiebung der Löslichkeit des [Kupfer x TPEN]-Komplexes in der anschließenden Fällung führte. Anhand der



Färbung der Phasen wurde der Komplex in Abwesenheit von Mannitol in der wässrigen Phase beobachtet, während er sich in dessen Anwesenheit in der organischen Phase befand, was eine noch bessere Abtrennung überschüssigen Kupfers von den

**Abbildung 3.7:** Chelatoren im Vergleich. **a**: N,N,N',N'-Tetrakis(2pyridylmethyl)ethylendiamin (TPEN). **b**: Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), das zu pH-abhängig war, um die CuAAC effizient zu beenden.

Proteinen versprach. Eine weitere sehr effektive Methode den Hintergrund zu senken, war außerdem, nicht zu viel Protein einzusetzen. In der Regel konnten im Neutravidin-System nach TPEN-Chelierung in 2-5 μg mitochondrialer Fraktion zuverlässig mitochondriale Proteinsyntheseprodukte nachgewiesen werden.

#### Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese im Western Blot 3.2

Der folgende Abschnitt zeigt den Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese ohne den Einsatz radioaktiver Isotope im Western Blot. Der Nachweis beruht auf der Beachtung all der Voraussetzungen an die CuAAC, die sich aus den physiologischen Eigenschaften der Zielproteine ergaben und die in Abschnitt 3.1 detailliert geschildert werden. Mit dieser CuAAC konnten Lysate mitochondrialer Fraktionen ohne Verlust der stark hydrophoben Membranproteine (Desthio-)-biotinyliert werden, ohne dass die Proteine stark durch das Übergangsmetall Kupfer beschädigt wurden.

#### **Der Nachweis in Rohlysaten** 3.2.1

Der einfachste Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese im Western Blot war nun, die CuAAC wie zuvor beschrieben auf Rohlysaten mitochondrialer Fraktionen durchzuführen und direkt einen Western Blot anzuschließen. Mit Rohlysaten sind chemisch unveränderte Proben gemeint, der Term



Abbildung 3.8: Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese in HeLa-Zellen. Die CuAAC-Desthiobiotinylierung wurde Neutravidin-System mittels nachgewiesen. M: Größenstandard in kDa. **1**: 3,8 μg mitochondriale Fraktion. inkubiert mit 500 μM HPG für 4 h, 50 µg/ml Cycloheximid und 62,5 µg/ml Fraktion, inkubiert nur mit 500 µM HPG für 4 h und 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid. \* markieren zahlreiche Proteine, die in Gegenwart von Thiamphenicol nicht synthetisiert wurden. \* markieren endogenes Biotin.

bezieht sich auf die Alkylierung mit Iodessigsäure, die die Proteine zwar schützen konnte, für den Nachweis von HPG-Einbau aber nicht zwingend nötig war (siehe Abschnitt 3.1.3). Experimentell wurden cytosolische und mitochondriale Proteinsynthese durch den Einsatz translationshemmender Gifte unterschieden. Cycloheximid hemmt die cytosolische Proteinsynthese reversibel und erlaubte nur den Mitochondrien, weiter ihre 13 Proteine zu synthetisieren. Thiamphenicol hingegen hemmt die mitochondriale Translation. Die Negativkontrolle war die Kombination aus beiden Giften in Gegenwart derselben HPG-Konzentration, die auch für alle anderen experimentellen Bedingungen eingesetzt wurde. Die Experimente wurden – sofern nicht anders angegeben - mit HeLa-Zellen durchgeführt. Die Abbildungen zeigen repräsentative Ergebnisse zahlreicher CuAAC-Durchläufe aus insgesamt acht separaten Zellaussaaten und ernten. Der direkte Vergleich zwischen beiden Gift-Bedingungen in Thiamphenicol. 2: 3,8 µg mitochondriale Rohlysaten offenbarte mindestens 9 Banden, die eindeutig nur in Abwesenheit von Thiamphenicol auftraten. Dieses Ergebnis sprach stark für den Nachweis mitochondrialer Syntheseprodukte, da das Auftreten der Banden empfindlich auf Thiamphenicol, nicht aber auf Cycloheximid reagierte (siehe Abbildung 3.8, rot markiert). Die Zahl und Verteilung der

detektierten Banden entsprach nicht vollständig der theoretischen Vorhersage von 13 Banden zwischen 67 kDa und 8 kDa (siehe Tabelle 3.4). Dies könnte mit abnormalem Laufverhalten einzelner

Proteine (Chomyn, 1996) zu erklären sein. Auch die eigenen Antikörperkorrelationen (siehe Abschnitt 3.2.3) zeigten, dass einige der mitochondrialen Zielproteine ein abnormales Laufverhalten im Polyacrylamid-Gel an den Tag legten. Zusätzlich zum abweichenden Laufverhalten der Proteine könnte eine inhomogene CuAAC-Desthiobiotinylierung jedes einzelnen Zielproteins das Laufverhalten beeinflussen. Aus Tabelle 3.4 wird ersichtlich, dass die Differenz zwischen dem vorhergesagten Molekulargewicht und der kompletten Desthiobiotinylierung bei vollständigem HPG-Einbau bis zu 12,6 kDa betragen kann. Es wurde erwartet, dass für jedes einzelne Protein verschieden große Produkte, verursacht durch einen variierenden Grad der CuAAC-Desthiobiotinylierung, detektiert würden. Die recht breiten Banden, als die sich die nachgewiesenen mitochondrialen Proteinsyntheseprodukte präsentierten, sprachen für eine derartige Variation in der CuAAC und erschwerten zusätzlich die Beurteilung, wie viele Produkte tatsächlich sichtbar waren. Da das Neutravidin-Detektionssystem sehr empfindlich war, trat im Nachweis auf Rohlysaten ein deutlicher Hintergrund auf (siehe Abbildung 3.8). Der differentielle Einsatz der Synthese-Inhibitoren zeigte zwar klare Signale mitochondrialer Proteinsynthese, verdeutlichte aber auch, dass mit einer weiteren Aufreinigung der Syntheseprodukte die Qualität des Nachweises noch steigerungsfähig war.

**Tabelle 3.4:** Zusammenfassung der 13 menschlichen mitochondrial codierten Proteine. Neben dem theoretischen isoelektrischen Punkt  $(\mathbf{pl}_T)$  werden das vorhergesagte Molekulargewicht  $(\mathbf{MW}_V)$ , das theoretische, maximale Molekulargewicht  $(\mathbf{MW}_T_{max})$  und die Differenz zwischen beiden angegeben. Das  $\mathbf{MW}_{T_max}$  bezieht sich auf einen vollständigen Austausch aller Methioninreste gegen HPG und anschließender vollständiger Desthiobiotinylierung aller HPG-Reste in der CuAAC.

Gen- Name	Protein-Name	Atmungsketten- komplex	pl⊤	MW <sub>v</sub> [kDa]	MW <sub>T_max</sub> [kDa]	Differenz [kDa]
MT-ND1	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 1 (ND1)		6,11	35,6	41,9	6,3
MT-ND2	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 2 (ND2)		9,84	38,9	48,8	9,9
MT-ND3	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 3 (ND3)	-	4,33	13,1	16,3	3,2
MT-ND4	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 4 (ND4)	Komplex I	9,4	51,5	62,1	10,6
MT-ND4L	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 4L (ND4L)		5,73	10,7	14,6	3,9
MT-ND5	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 5 (ND5) NADH-Dehydrogenase-Untereinheit 6 (ND6)		9,14	67	77,2	10,2
MT-ND6			4,18	18,6	22,5	3,9
MT-CYB	Cytochrom b	Komplex III	7,83	42,7	48,3	5,6
MT-CO1	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 1 (Cox1)		6,19	57	69,6	12,6
MT-CO2	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 2 (Cox2)	Komplex IV	4,67	25,5	29,5	4
MT-CO3	Cytochrom-c-Oxidase Untereinheit 3 (Cox3)		6,76	29,9	34,2	4,3
MT-ATP6	ATP-Synthase-Untereinheit a (ATP6)	Komploy	10,09	24,8	29,5	4,7
MT-ATP8	ATP-Synthase Protein 8 (ATP8)	KOMPlex v	9,92	7,9	10,3	2,4

#### Aufreinigung mitochondrialer Proteinsyntheseprodukte via CuAAC-3.2.2 Modifikation

Der Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese in Rohlysaten funktionierte zuverlässig, erzeugte aber auch einen hohen Hintergrund, der nur durch Erweiterung des experimentellen Designs verringert



Abbildung 3.9: Charakterisierung der zwei stärksten, unspezifischen Banden (\*). 3,9 µg Hela-Mito-Fraktion in jeder Spur. 1: Rohlysat mit CuAAC. 2: Rohlysat ohne CuAAC. 3: Rohlysat nach Vorinkubation mit Streptavidin-Agarose, mit ohne CuAAC. Streptavidin-Agarose, M: Größenstandard in kDa.

werden konnte: Die CuAAC-Modifikation, genauer die Desthiobiotinylierung, sollte verwendet werden, um die Zielproteine aufzureinigen. Zunächst wurde allerdings untersucht, ob der Hintergrund von endogenem Biotin verursacht wurde. Dafür wurden mitochondriale Rohlysate vor der CuAAC mit Streptavidin-Agarose inkubiert, um endogen biotinylierte Proteine abzutrennen. Anschließend CuAAC. 4: Rohlysat nach Vorinkubation mit wurde im Western Blot verglichen, wie sich diese vorbehandelten Lysate im Vergleich zu Rohlysaten

verhielten, für beide Bedingungen jeweils mit und ohne CuAAC. Es wurde gezeigt, dass nicht die CuAAC selbst für den erhöhten Hintergrund verantwortlich war, da sich zwischen Einsatz und Verzicht auf die CuAAC keine Unterschiede zeigten, weder in den Rohlysaten noch in den vorbehandelten Lysaten. Es konnte auch gezeigt werden, dass der Hintergrund teilweise auf endogenes Biotin zurückzuführen war (siehe Abbildung 3.9). Die zwei stärksten unspezifischen Banden bei ca. 70 kDa und >130 kDa verschwanden nach Vorbehandlung der Lysate mit Streptavidin-Agarose (blau markiert in Abbildung 3.8 und Abbildung 3.9). Es blieb nur ein deutlich schwächerer und gleichmäßigerer Hintergrund, der durch das Neutravidin-System verursacht wurde. Bei diesem Resthintergrund handelte es sich um geringfügige, unspezifische Interaktionen vermutlich mit einem Großteil der Proteine auf der Membran, die erst durch eine weitere Aufreinigung der mitochondrialen Proteinsyntheseprodukte über die CuAAC-Desthiobiotinylierung verhindert werden konnte. Um Materialverlust zu vermeiden, wurde die hier beschriebene Vorinkubation von Rohlysaten mit Streptavidin-Agarose vor der CuAAC allerdings nicht routinemäßig durchgeführt.

Die Nutzung einer CuAAC-Modifikation zur Aufreinigung von Proteinsyntheseprodukten ist für cytosolische Proteine bereits beschrieben worden (Dieterich et al., 2006). Die Etablierung einer solchen Methode für Produkte der mitochondrialen Proteinsynthese in dieser Arbeit hatte nicht nur den Vorteil, die Qualität des Nachweises im Western Blot zu erhöhen und dessen Spezifität zu unterstreichen, sondern bot auch Chancen auf weitere Untersuchungen der Proteine wie zum Beispiel die massenspektrometrische Analyse (siehe Abschnitt 3.3). Das Prinzip der Aufreinigung beruhte auf einer Inkubation der Proben mit Streptavidin-Agarose nach der CuAAC. In der CuAAC wurden die Proteine mit Azid-funktionalisiertem Desthiobiotin (siehe Abbildung 2.1) umgesetzt. Streptavidin bindet Desthiobiotin aber mit geringerer Bindungsstärke als natives Biotin. Deshalb ermöglichte der

Einsatz von Desthiobiotin eine Elution unter nicht denaturierenden Bedingungen durch Überschuss an nativem Biotin. Gleichzeitig sollte mit diesem Schritt auch endogenes Biotin abgetrennt werden, da dieses nicht so einfach von nativem Biotin verdrängt werden konnte.

Die Qualität des Nachweises konnte mit der Aufreinigung erfolgreich gesteigert werden. Der



Abbildung 3.10: Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese (\*) im Eluat aus 4,7 μg HeLa-Mitochondrien-Fraktion nach 4 h Inkubation mit 500 µM HPG. Streptavidin-Aufreinigung über Agarose und Nachweis im Western Blot mit Neutravidin-System. M: Größenstandard in kDa. 1:50 µg/ml Cycloheximid und 62,5 µg/ml Thiamphenicol. 2: Nur Cycloheximid. Geringe Mengen endogenen Biotins wurden eluiert (\*), ebenso monomeres Streptavidin (\*). Die Bande \* entspricht dem erwarteten Molekulargewicht der humanen mitochondrialen methionylt-RNA-Synthetase.

Hintergrund wurde in weiten Teilen reduziert und die Banden für mitochondriale Proteinsynthese traten deutlich zutage (siehe Abbildung 3.10). Es gab nur wenige Banden, die weiterhin auch in Gegenwart von Thiamphencol auftraten und deshalb nicht Produkte mitochondrialer Proteinsynthese sein konnten. So wurde eine Bande nachgewiesen, deren Laufhöhe zwischen 10 und 17 kDa gut zu monomerem Streptavidin passte (Waner et al., 2004). Auch geringe Mengen endogenen Biotins fanden sich in den Eluaten. Eine mögliche Erklärung ist, dass während der Elution mit massivem Überschuss an freiem Biotin auch geringe Mengen endogenbiotinylierten Proteins verdrängt und somit eluiert wurden. Interessant war eine Bande, die in Gegenwart von Thiamphenicol deutlich stärker hervortrat als in der Probe in der kein Thiamphenicol zugegen war und mitochondriale Proteinsynthese möglich war (grün markiert in Abbildung 3.10). Die humane mitochondriale methionyl-t-RNA-Synthetase hat ein Molekulargewicht von 67 kDa (Spencer et al., 2004), was sehr gut zu dieser Bande passt. Da der Einbau in naszierende Proteine in dieser Probe nicht möglich war, erscheint es plausibel, dass HPG

zwar aufgenommen und auch für die Translation aktiviert werden konnte, danach aber nur akkumulierte und nach der Aufreinigung im Komplex mit seiner methionyl-t-RNA-Synthetase nachgewiesen wurde. Im Vergleich zu Abbildung 3.8 sind nach der Aufreinigung in Abbildung 3.10 weniger mitochondriale Proteinsyntheseprodukte erkennbar. Dies könnte mit variierendem Auflösungsvermögen der Polyacryamid-Gele zu erklären sein, und auch mit schwankender Effizienz der CuAAC: Das Ausmaß der CuAAC-Desthiobiotinylierung der Proteine kann zwischen Reaktionen unterschiedlich ausfallen und der Grad der Desthiobiotinylierung hat einen Einfluss auf das Molekulargewicht der Zielproteine (siehe Tabelle 3.4). Zusammengefasst hat die Aufreinigung der mitochondrialen Proteinsyntheseprodukte über Desthiobiotin die Qualität des Nachweises deutlich verbessert und bestätigt zudem, dass die detektierten Signale vorranging von Desthiobiotin stammen.

Der Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese wurde auch auf andere Zelltypen übertragen. Dies erwies sich aber als schwierig, weil vor allem das Protokoll zur Anreicherung der Mitochondrien dafür angepasst werden musste. Konkret wurden in dieser Arbeit Zentrifugalbeschleunigungen verändert, um zum Beispiel vollständigen Materialverlust bei der Anreicherung von Mitochondrien aus primären humanen Fibroblasten (HDFa-Zellen) zu verhindern. Auch für U2OS-Zellen konnte nicht einfach das



Abbildung 3.11: Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese in anderen Zelltypen. a: U2OS-Zellen, 500 µM HPG-Inkubation für 4 h. Rohlysate, Auftragsmenge nicht bestimmt, keine Aufreinigung. **b**: HDFa, primäre Fibroblasten, 500 µM HPG-Inkubation für 4 h. Alkylierte Lysate (siehe Abschnitt 3.1.3). Mit Aufreinigung, Eluate aus 3,4 µg Protein. Für **a** und **b** gilt: 1: Cycloheximid und Thiamphenicol. 2: Nur Cycloheximid. M: HeLa-Zellen. Diese Beobachtung war aber nicht Größenstandard in kDa.

HeLa-Protokoll verwendet werden. In U2OS-Zellen gelang der Nachweis weniger, aber für mitochondriale starker Signale Proteinsynthese in Rohlysaten ohne Aufreinigung (siehe Abbildung 3.11 a). Die nachgewiesenen Proteinsyntheseprodukte Polyacrylamid-Gel nicht gut waren im aufgelöst, weshalb die Anzahl nicht leicht zu bestimmen war.

Nachweis Der war auch in primären Fibroblasten (HDFa-Zellen) erfolgreich, hier allerdings nur nach Alkylierung der Lysate und mit Aufreinigung (siehe Abbildung 3.11 b). Der Nachweis war zudem deutlich schwächer als in

überraschend, da die primären Fibroblasten deutlich langsamer wachsen als HeLa-Zellen. Insgesamt ergab das Bandenmuster im Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese eine gute Übereinstimmung mit dem Ergebnis für HeLa-Zellen (vgl. mit Abbildung 3.10). Auffällig bei den HDFa-Zellen war, dass die spezifischen Banden nicht sehr scharf ausfielen. Daher war es nicht einfach abzuschätzen, wie viele und welche Proteine genau nachgewiesen wurden. Diese Beobachtung könnte mit einer eher ineffizienten CuAAC-Desthiobiotinylierung zu erklären sein (siehe Tabelle 3.4), die für jedes einzelne Protein zu verschiedenen Produkten unterschiedlicher Größe führen könnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass der Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese auf andere Zelltypen ausgeweitet werden konnte, darunter sogar gesunde primäre Zellen.

#### 3.2.3 Korrelation der nachgewiesenen Proteine mit Antikörpern

Um die nachgewiesenen Proteine im Western Blot besser zu charakterisieren und die detektierten Banden einzelnen Proteinen des mitochondrialen Genoms zuzuordnen, sollten die entsprechenden Banden zusätzlich durch eine Dekoration mit einem Antikörper gegen die Proteine selbst korreliert werden. Dazu wurden Western Blots mitochondrialer CuAAC-desthiobiotinylierter Lysate

(unbehandelt oder alkyliert) genommen und der Länge nach mit einem Skalpell halbiert. Auf diese Weise konnten auf dieselben Banden sowohl ein Nachweis der CuAAC-Desthiobiotinylierung, als auch des eigentlichen Proteins mittels spezifischem Antikörper erbracht werden. Als limitierend erwies sich dafür jedoch die verfügbare Zahl spezifischer Antikörper (zusammengefasst in Tabelle 3.5).

**Tabelle 3.5:** Zusammenfassung der mitochondrialen Proteine, die in dieser Arbeit im Western Blot per Antikörper nachgewiesen werden sollten. Für weitere Details zu den Antikörpern siehe Abschnitt 2.1.2. **MW**<sub>v</sub>: vorhergesagtes Molekulargewicht. **MW**<sub>real</sub>: beobachtetes Molekulargewicht.

Antigen	Nachweis	MW <sub>v</sub> [kDa]	MWreal [kDa]
ND1	keine Bande	35,6	/
ND2	keine Bande	38,9	/
ND3	keine Bande	13,1	/
ND4	kein Antikörper	51,5	/
ND4L	keine Bande	10,7	/
ND5	Bande, aber keine Korrelation	67	55
ND6	keine Bande	18,6	/
Cytochrom b	keine Bande	42,7	/
Cox1	Nachweis erfolgreich	57	42
Cox2	keine Bande	25,5	/
Cox3	Nachweis erfolgreich	29,9	30
ATP6	keine Bande	24,8	/
ATP8	kein Antikörper	7,9	/

Von insgesamt elf getesteten Antikörpern gelang nur mit dreien der reproduzierbare Nachweis einzelner Banden. Dies waren Antikörper gegen die mitochondrialen Proteine ND5, Cox1 und Cox3. Zwei dieser Proteine, ND5 und Cox1, zeigten ein Laufverhalten, das vom vorhergesagten Molekulargewicht abwich (siehe Tabelle 3.5). Die Korrelation der Banden mit Signalen für CuAAC-Desthiobiotinylierung war für Cox1 und Cox3 erfolgreich. Die Korrelation von Cox1 und CuAAC-Desthiobiotinylierung (grün in Abbildung 3.12) zeigte sowohl in unbehandelten als auch in alkylierten Lysaten stets einen leichten Versatz. Dies deutet darauf hin, dass der Antikörper nur wildtypisches Protein erkannte, während sich die Laufhöhe nach der CuAAC-Desthiobiotinylierung verschob (vgl. mit Tabelle 3.4). Wildtypisches Cox1 konnte dekoriert werden, weil die mitochondrialen Fraktionen nach der CuAAC ohne Aufreinigung vollständig aufgetragen wurden (siehe auch Abbildung 3.8). Wurde der CuAAC-Desthiobiotinylierung eine Aufreinigung angeschlossen (siehe Abbildung 3.10), funktionierte keine Antikörper-Korrelation mehr. In diesem Fall gaben weder der Antikörper gegen Cox1 noch der gegen Cox3 ein Signal.



Abbildung 3.12: Korrelation der Antikörper-Signale mit der CuAAC-Desthiobiotinylierung in HeLa-Zellen für die drei angegebenen mitochondrialen Proteine. Dieselben Spuren einer Membran wurden der Länge nach durchtrennt. Der rote Rahmen umfasst immer den Nachweis von CuAAC-Desthiobiotinylierung mittels des Neutravidin-Systems aus Abschnitt 3.2. Der blaue Rahmen markiert den Nachweis des jeweils angegebenen mitochondrialen Proteins (Cox1, Cox3 und ND5). C steht für Cycloheximid, T für Thiamphenicol, U für unbehandeltes Ausgangsmaterial und A für alkyliertes Ausgangsmaterial.

Dafür verantwortlich waren vermutlich zwei Gründe. Erstens war die Konzentration des Antigens auf der Membran extrem gering – aus diesem Grund wurde das Neutravidin-System zum Nachweis von CuAAC-Desthiobiotinylierung entwickelt (siehe Abschnitt 3.1.5) und diese Signalverstärkung fehlte im klassischen Antikörper-Nachweis. Zweitens war die vorhandene geringe Menge des Antigens durch die CuAAC-Desthiobiotinylierung verändert. Somit waren noch weniger passende Epitope vorhanden die die Antikörper binden konnten.

Die Korrelation von Cox3 mit der CuAAC-Desthiobiotinylierung (gelb in Abbildung 3.12) zeigte eine leichte Veränderung des Laufverhaltens nach der Alkylierung. Ohne Alkylierung zeigte sich ein ähnliches Bild wie mit Cox1, eine Antigen-Dekoration am unteren Ende des CuAAC-Signals. Mit Alkylierung lief das Protein etwas höher, ein Hinweis auf eine Stabilisierung des Proteins durch die Alkylierung. Sollte die Alkylierung das Laufverhalten des Proteins beeinflussen, müsste dies aber unabhängig von der CuAAC-Desthiobiotinylierung gelten. Damit war der beobachtete Versatz in der Korrelation ein Hinweis auf weitere mitochondriale Proteine in dieser Laufhöhe. Kandidaten sind Cox2 und ATP6, die nach Desthiobiotinylierung ein Molekulargewicht vergleichbar mit wildtypischem Cox3 haben (siehe Tabelle 3.4).

Für ND5 zeigte die Korrelation keine deutliche Entsprechung zur CuAAC-Desthiobiotinylierung (lila in Abbildung 3.12). Dies könnte auf eine schwache Desthiobiotinylierung des Proteins hinweisen, das dann vom Hintergrund überstrahlt wurde. ND5 ist das größte der mitochondrial codierten Proteine und der prozentuale Anteil von Methionin an der Gesamtsequenz ist vergleichsweise gering (siehe Tabelle 3.2). Eine CuAAC-Desthiobiotinylierung in einem SDS-Lysat könnte deswegen auch sterisch bedingt schwierig sein. Gleichzeitig ist sein theoretischer isolelektrischer Punkt mit 9,14 sehr hoch (siehe Tabelle 3.4), was die Herausforderung an den Transfer der Bande im Western Blot erhöht. Möglich ist aber auch eine Unspezifität des Antikörpers. In guten Aufreinigungen mit sehr niedrigem Hintergrund wurde eine sehr schwache Bande detektiert (höchste, rot markierte Bande in Abbildung 3.10), deren Laufhöhe nach Tabelle 3.4 gut zu ND5 passen könnte. Der Antikörper gegen ND5 hingegen markierte eine Bande, die deutlich tiefer lief (siehe Tabelle 3.5).

Die Korrelation der nachgewiesenen mitochondrialen Proteinsyntheseprodukte mit spezifischen Antikörper-Markierungen waren für zwei Untereinheiten von Komplex IV, Cox1 und Cox3, erfolgreich. Für Cox1 wurde zudem ein abweichendes Laufverhalten im Polyacrylamid-Gel bestätigt. Andere mitochondrial translatierte Protein wurden mit diesem Vorgehen nicht zweifelsfrei nachgewiesen.

#### 3.3 Identifikation mitochondrialer Translationsprodukte im Massenspektrometer

Der differentielle Einsatz der Translationsblocker Cycloheximid und Thiamphenicol hat bereits im Western Blot sehr starke Hinweise auf den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure HPG in mitochondriale Proteine geliefert. Mithilfe einer massenspektrometrischen Analyse sollten diese Ergebnisse bestätigt werden. Um *de novo* synthetisierte Zielproteine vom endogenen Pool unterscheiden zu können und um möglichst viel Hintergrund auszuschließen, fußte die Analyse auf der Streptavidin-basierten Affinitätsaufreinigung der CuAAC-Desthiobiotinylierung, die in dieser Arbeit etabliert wurde (siehe Abschnitt 3.2.2).

## 3.3.1 Verdau und Nachweis mitochondrial codierter Proteine

Ein für den Nachweis wichtiges Kriterium ist die Wahl des Enzyms zum Verdau der Proteine. Zwei gängige Enzyme sind Trypsin und Chymotrypsin. Beide sind Serin-Proteasen, Trypsin schneidet Peptidbindungen nur an der Carboxylgruppe von Lysin- und Argininresten (Olsen et al., 2004), während Chymotrypsin diese C-terminal von hydrophoben Aminosäuren, bevorzugt hinter Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin, aber auch hinter Leucin und Methionin hydrolysiert (Appel, 1986; Giansanti et al., 2016). Chymotrypsin ist deswegen eine gute Wahl zum Verdau von Transmembranproteinen, weil es diese in kleinere Peptide spaltet, die in der massenspektrometrischen Analyse leichter eluieren. Dieser Vorteil ist gleichzeitig aber auch ein Nachteil, weil es die Proteine häufig in zu kleine Fragmente spaltet. Die Konsequenz daraus ist, dass die prozentuale Sequenzabdeckung nach einem Verdau mit Chymotrypsin geringer ausfällt als mit Trypsin. Tabelle 6.1 und Tabelle 6.2 im Anhang zeigen einen *in silico*-Verdau der 13 mitochondrialen Proteine mit beiden Enzymen. Um einem Protein mit ausreichend hoher Wahrscheinlichkeit zugeordnet werden zu können, wurde in der Prozessierung der Rohdaten in dieser Arbeit eine Peptidmindestlänge von 7 Aminosäuren vorausgesetzt.

Zur Auslotung des Verhaltens der gesuchten 13 Proteine relativ zu den anderen Proteinen in Rohlysaten wurden zunächst Testverdaus mitochondrialer Rohlysate mit Trypsin bzw. Chymotrypsin durchgeführt, jeweils in Doppelbestimmung. In mitochondrialen Lysaten aus HeLa-Zellen, mit Trypsin verdaut, wurden in insgesamt 33200 Peptiden nur 50 Peptide gemessen (1,5‰), die aus 7 von 13 mitochondrialen Proteinen stammten (blaue Balken in Abbildung 3.13). Mit Chymotrypsin deckten

66

123 Peptide 9 von 13 Proteinen ab und wurden in insgesamt 11417 Peptiden (1%) gemessen (rot in Abbildung 3.13). Zusätzlich wurden auch mitochondriale Lysate von HDFa-Zellen mit Chymotrypsin verdaut. Hier wurden in 8918 Peptiden insgesamt 62 Peptide (0,7‰) nachgewiesen, die 8 der 13 Proteine abdeckten (grün in Abbildung 3.13).

Der Nachweis der mitochondrialen Membranproteine in der Massenspektrometrie war bereits in den Rohlysaten isolierter Mitochondrien anspruchsvoll. Dies zeigen die sehr geringen Mengen nachgewiesener Proteine, obwohl gleichzeitig importierte Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe in weit größeren Mengen gemessen wurden. Dieses grundlegende Experiment dient lediglich der Veranschaulichung der Schwierigkeiten bei der Suche nach den mitochondrial codierten Untereinheiten. Die Daten geben keine Auskunft über die physiologisch relevante Stöchiometrie der dargestellten Proteine. Es wurde gezeigt, dass der Nachweis der gesuchten Proteine mit Chymotrypsin etwas besser gelingt als mit Trypsin.



**Abbildung 3.13:** Zusammenfassung des Nachweises mitochondrialer Proteine in der massenspektrometrischen Analyse. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Peptide für jedes mitochondriale Protein aus zwei separaten Messungen. Blau: Trypsin-Verdau der mitochondrialen Fraktion von HeLa-Zellen. Rot: Chymotrypsin-Verdau der mitochondrialen Fraktion von HeLa-Zellen. Grün: Chymotrypsin-Verdau der mitochondrialen Fraktion von HDFa-Zellen.

## 3.3.2 Affinitätsaufreinigung der mitochondrial codierten Proteine

Für den Nachweis des Einbaus von HPG in mitochondriale Proteine wurden HeLa-Zellen für 4 h mit 500 μM HPG inkubiert, einmal mit 50 μg/ml Cycloheximid (P1) und einmal mit 50 μg/ml Cycloheximid und 62,5 µg/ml Thiamphenicol (P2). Aus beiden Bedingungen wurden Rohlysate der mitochondrialen Fraktionen nach Abschnitt 2.4 erstellt. Anschließend folgten die in dieser Arbeit etablierte CuAAC-Affinitätsaufreinigung Desthiobiotinylierung und die über Streptavidin-Agarose (siehe Abschnitt 3.2.2). Die hier präsentierten Daten beruhen auf der Kombination der massenspektrometrischen Analysen dreier separater Durchgänge ( $D_a$ ,  $D_b$  und  $D_c$ ), die jeweils aus
CuAAC-Desthiobiotinylierung, Affinitätsaufreinigung, Verdau und massenspektrometrischer Analyse bestanden, dabei aber auf derselben Zellernte als Ausgangsmaterial beruhten. Mit den drei separaten Durchgängen wurden jeweils unterschiedliche Proteinmengen verarbeitet. Dabei wurde allerdings darauf geachtet, dass in die empfindliche CuAAC immer dieselben Proteinmengen eingesetzt wurden: In D<sub>a</sub> wurden 30 μg Protein eingesetzt, das entsprach jeweils einer CuAAC pro Bedingung (P1 und P2). In D<sub>b</sub> wurden 200 µg Protein eingesetzt und so wurden jeweils sieben CuAAC-Reaktionen pro Bedingung durchgeführt. Für die Aufreinigung wurden die sieben Proben vereint. In D<sub>c</sub> wurden 60 μg Protein eingesetzt, weshalb pro Bedingung zwei CuAAC-Reaktionen durchgeführt und für die Aufreinigung vereint wurden. Nach der Aufreinigung wurden die Eluate zur massenspektrometrischen Analyse gegeben (siehe Abschnitt 2.9). Für den Verdau wurde Chymotrypsin eingesetzt. Die Auswertung der Daten zeigte wie schon in den Testverdaus nur einige der gesuchten mitochondrial codierten Proteine. Die Gesamtzahl der Peptide, die den gesuchten Proteinen zugeordnet werden konnten, betrug 52 in P1 (Summe aus allen drei Durchläufen) und 2 in P2 (Summe aus allen drei Durchläufen, siehe Tabelle 3.6). Allerdings war die Zahl von Peptiden, die trotz der Aufreinigung in jedem einzelnen Durchgang kerncodierten Proteinen zugeordnet wurden, deutlich höher als die Zahl der nachgewiesenen mitochondrial codierten Proteine. Um die Spezifität der Aufreinigung zu untersuchen, wurde ermittelt, welche Proteine übereinstimmend in mehr als einem der drei Durchgänge gemessen worden waren. Dies geschah in zwei Stufen: In der ersten Stufe wurden zunächst für jeden einzelnen der drei Durchgänge alle gemessenen Peptide auf zwei Listen L1 (detektiert in P1: spezifisch und verunreinigt) und L2 (detektiert in P2: unspezifischer Hintergrund) aufgeteilt. Anschließend wurde für jede L1 nach Übereinstimmungen mit der dazugehörigen L2 gesucht und diese wurden als unspezifisch herausgefiltert. Diese Übereinstimmungssuche erfolgte auf drei Ebenen: a) der Peptidsequenz, b) des Gen-Namens und c) des Protein-Namens. Ein Filtern nur nach Peptidsequenzen war zu ungenau, da nicht jedes Protein, das in beiden Proben nachgewiesen wurde, auch zwangsläufig mit demselben Peptid vertreten war. Um solche Fälle dennoch zu erkennen, wurde zusätzlich parallel sowohl nach Gen-Namen als auch nach Protein-Namen gefiltert. Auf diese Weise wurde die Genauigkeit maximiert, weil der Filtermechanismus der Perseus-Software beim Abgleich von Texten nur vollständige Übereinstimmungen akzeptiert, die vorherige Prozessierung der Daten in MaxQuant bei der Annotation der gefundenen Peptide mittels der Uniprot-Datenbank aber manchmal leichte Variationen in Gen- und Protein-Namen einbaut. Das Ergebnis dieses Prozesses war eine neue gefilterte Peptidliste L1<sub>F</sub> für jeden der drei Durchgänge, in denen die Zahl an gemessenen Peptiden um 60-80% reduziert war (grafisch dargestellt in Abbildung 3.14).

Die zweite Stufe der Hintergrundreduktion bestand in dem Vergleich der L1<sub>F</sub> der einzelnen Durchgänge untereinander. Es wurden jeweils zwei L1<sub>F</sub> vereint. Anschließend wurde auf Ebene des





**Abbildung 3.14:** Dargestellt ist die ungefilterte Gesamtzahl der Peptide in P1 jedes Durchgangs (graue Balken) im direkten Vergleich mit der ersten Stufe der Hintergrundreduktion, der Entfernung aller Peptide aus P1, die aus Proteinen stammen, die auch in P2 nachgewiesen wurden ( $D_a$ = blau,  $D_b$ = rot,  $D_c$ = grün).

Protein-Namens gefiltert und nur Übereinstimmungen wurden übernommen. Da die Listen nun nur noch wenige Einträge enthielten, konnte nun leicht manuell verifiziert werden, dass der alleinige Filter nach Protein-Namen ausreichend präzise war. Der letzte Arbeitsschritt war die Zusammenfassung aller Paarkombinationen zur finalen Liste von Proteinen, die nur in P1 von mindestens zwei separaten Durchgängen detektiert worden waren. Diese Liste enthielt ausschließlich mitochondriale Proteine, genauer Cytochrom *b*, Cox1, Cox2 und Cox3 mit jeweils zahlreichen Peptiden (siehe Tabelle 3.6). Dieses Ergebnis zeigt, dass kein einziges cytosolisches Protein öfter als in einem Durchgang nur in P1 nachgewiesen wurde, während eine Subpopulation der gesuchten mitochondrialen Proteine mehrfach gefunden wurde. Nicht berücksichtigt in dieser Analyse ist die unspezifische Co-Aufreinigung von mitochondrialen Proteinen in P2. Dieser Fall trat extrem selten auf, nur in P2 von D<sub>b</sub> wurde jeweils ein Peptid von Cox1 und Cox3 detektiert. Da in D<sub>b</sub> das meiste Ausgangsmaterial eingesetzt wurde, war hier die Wahrscheinlichkeit einer unspezifischen Detektion der gesuchten Proteine am höchsten. Im Vergleich dazu wurden in allen P1 insgesamt 12 Peptide von Cox1 und 9 für Cox3 detektiert.

Bemerkenswert ist, dass alle Untereinheiten der Komplexe III und IV reproduzierbar nachgewiesen wurden, von den Komplexen I und V aber keine. Die einzige Ausnahme für Komplex I ist ND4, welches in Durchgang 2 (D<sub>b</sub>, siehe Tabelle 3.6) mit insgesamt drei Peptiden in P1 nachgewiesen wurde, nicht aber in den Durchgängen D<sub>a</sub> und D<sub>c</sub>. Dieses Ergebnis passt zu den Western Blots; Cox1 und Cox3 wurden erfolgreich mit Antikörpern korreliert (siehe Abbildung 3.12) und Cytochrom *b* hat ein vorhergesagtes Molekulargewicht von 42,7 kDa, was ebenfalls gut mit einer Bande im Western Blot übereinstimmt (siehe Abbildung 3.8). Dieses Experiment demonstriert die Spezifität des

Aufreinigungsprotokolls. Das hier präsentierte Nachweismuster der mitochondrialen Proteine ist kein Spiegel der physiologischen Stöchiometrie der Untereinheiten zueinander.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass die Affinitätsaufreinigung mitochondrial translatierter Proteine über die CuAAC-Desthiobiotinylierung auch in der massenspektrometrischen Analyse erfolgreich war und die Anreicherung zumindest aller Untereinheiten von Komplex III und IV ermöglichte. Auf den direkten Nachweis der nicht-kanonischen Aminosäure HPG in den Zielproteinen wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

**Tabelle 3.6:** Die Tabelle fasst alle Peptide aus mitochondrialen Proteinen zusammen, die in den drei Durchgängen  $D_a$ ,  $D_b$  und  $D_c$  gemessen wurden. Die Proteine Cytochrom *b*, Cox1, Cox2 und Cox3 sind die einzigen Proteine, die in mehr als einem Durchgang in P1 gemessen wurden. ND4 hingegen ist das einzige mitochondriale Protein, das nur einmal (in  $D_b$ ) nachgewiesen wurde und wurde der Tabelle aus diesem Grund manuell hinzugefügt.

Protein	Peptidsequenz	Anzahl Aminosäuren	Nachweise in P1	Nachweise in P2	Durchgang																																																																		
	GATVITNLL	9	2	0	D <sub>a</sub> , D <sub>c</sub>																																																																		
Protein Cytochrom b Cox1 Cox2 Cox3	GITSHSDKITF	11	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
	LATMATAF	8	3	0	D <sub>a</sub> , D <sub>b</sub>																																																																		
	LHETGSNNPL	10	2	0	D <sub>a</sub> , D <sub>c</sub>																																																																		
Cytochrom b	MSPMRKINPL	10	6	0	D <sub>a</sub> , D <sub>b</sub> , D <sub>c</sub>																																																																		
Cytochromb	SDKITFHPY	9	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
GITSHSDKITF11LATMATAF8LHETGSNNPL10MSPMRKINPL10MSPMRKINPL10SDKITFHPY9SHSDKITF8SPDLLGDPDNY11SSIAHITRDVNY12SVDSPTL7SVDSPTL7GCMGMVWAMMSIGF14GCPPPYHTF9MIGAPDMAFPRMNNMSF17MIGAPDMAFPRMNNMSF17TDRNLNTTF9TVGMDVDTRAY11TVYPPLAGNY10AVPTLGLKTDAIPGRL16GLKTDAIPGRL9MGHAADVGL9	1	0	D <sub>b</sub>																																																																				
	11	1	0	Da																																																																			
	SSIAHITRDVNY	12	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
	SVDSPTL	7	2	0	D <sub>b</sub>																																																																		
Cox1	EEPVYMKS	8	1	0	Dc																																																																		
	GCMGMVWAMMSIGF	14	3	1	D <sub>b</sub>																																																																		
	GCPPPYHTF	9	1	0	D <sub>c</sub>																																																																		
	MIGAPDMAFPRMNNMSF	17	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
	NILSSVGSF	9	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
	STNHKDIGTLY	11	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
	TDRNLNTTF	9	1	0	Dc																																																																		
	TVGMDVDTRAY	11	2	0	D <sub>b</sub>																																																																		
	TVYPPLAGNY	10	2         1         3         2         6         1 <tr td=""> <!--</td--><td>0</td><td>D<sub>b</sub></td></tr> <tr><td></td><td>AVPTLGLKTDAIPGRL</td><td>16</td><td>1</td><td>0</td><td>D<sub>c</sub></td></tr> <tr><td></td><td>GLKTDAIPGRL</td><td>11</td><td>P1         2         1         3         2         6         1      <tr td="">     &lt;</tr></td><td>0</td><td>D<sub>c</sub></td></tr> <tr><td>Cox2</td><td>IntermediationIntermedia</td><td>0</td><td>Da</td></tr> <tr><td></td><td>MGHAAQVGL</td><td>9</td><td>1</td><td>0</td><td>D<sub>b</sub></td></tr> <tr><td></td><td>TATRPGVY</td><td>8</td><td>11     1       9     1       11     2       10     1       16     1       11     1       9     1       8     4</td><td>0</td><td>D<sub>a</sub>, D<sub>c</sub></td></tr> <tr><td rowspan="3">Cox3</td><td>MTSGLAMW</td><td>8</td><td>1</td><td>0</td><td>D<sub>b</sub></td></tr> <tr><td>QGHHTPPVQKGL</td><td>12</td><td>6</td><td>1</td><td>D<sub>b</sub></td></tr> <tr><td>RDVTRESTY</td><td>9</td><td>1</td><td>0</td><td>Da</td></tr> <tr><td></td><td>SALMMTSGL</td><td>9</td><td>1</td><td>0</td><td>D<sub>b</sub></td></tr> <tr><td rowspan="3">ND4</td><td>AAVLUULGGYGMMRL</td><td>15</td><td>1</td><td>0</td><td>Db</td></tr> <tr><td>TLTAQEL</td><td>7</td><td>1</td><td>0</td><td>Db</td></tr> <tr><td>TRENTLMSMHLSPI</td><td>14</td><td>1</td><td>0</td><td>Db</td></tr>	0	D <sub>b</sub>		AVPTLGLKTDAIPGRL	16	1	0	D <sub>c</sub>		GLKTDAIPGRL	11	P1         2         1         3         2         6         1 <tr td="">     &lt;</tr>	0	D <sub>c</sub>	Cox2	IntermediationIntermedia	0	Da		MGHAAQVGL	9	1	0	D <sub>b</sub>		TATRPGVY	8	11     1       9     1       11     2       10     1       16     1       11     1       9     1       8     4	0	D <sub>a</sub> , D <sub>c</sub>	Cox3	MTSGLAMW	8	1	0	D <sub>b</sub>	QGHHTPPVQKGL	12	6	1	D <sub>b</sub>	RDVTRESTY	9	1	0	Da		SALMMTSGL	9	1	0	D <sub>b</sub>	ND4	AAVLUULGGYGMMRL	15	1	0	Db	TLTAQEL	7	1	0	Db	TRENTLMSMHLSPI	14	1	0	Db
0	D <sub>b</sub>																																																																						
	AVPTLGLKTDAIPGRL	16	1	0	D <sub>c</sub>																																																																		
	GLKTDAIPGRL	11	P1         2         1         3         2         6         1 <tr td="">     &lt;</tr>	0	D <sub>c</sub>																																																																		
Cox2	IntermediationIntermedia	0	Da																																																																				
	MGHAAQVGL	9	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
	TATRPGVY	8	11     1       9     1       11     2       10     1       16     1       11     1       9     1       8     4	0	D <sub>a</sub> , D <sub>c</sub>																																																																		
Cox3	MTSGLAMW	8	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
	QGHHTPPVQKGL	12	6	1	D <sub>b</sub>																																																																		
	RDVTRESTY	9	1	0	Da																																																																		
	SALMMTSGL	9	1	0	D <sub>b</sub>																																																																		
ND4	AAVLUULGGYGMMRL	15	1	0	Db																																																																		
	TLTAQEL	7	1	0	Db																																																																		
	TRENTLMSMHLSPI	14	1	0	Db																																																																		

#### 3.3.3 Nachweis von HPG-Einbau und -Modifikation

Der Beweis für den Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure HPG in mitochondriale Proteinsyntheseprodukte wäre der direkte massenspektrometrische Nachweis von HPG anstelle von Methionin in der Primärstruktur der Zielproteine. Dieser wurde für insgesamt 18 Peptide aus allen Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe III und IV erbracht und wird nachfolgend vorgestellt. Der Einbau von HPG in ein Protein führt zu zwei möglichen Modifikationen, die anstelle von Methionin in einem Peptid gemessen werden können: Nur die Aminosäure HPG oder HPG+Desthiobiotin nach erfolgreicher CuAAC. Darüber hinaus wird die mitochondriale Translation mit formyliertem Methionin initiiert. Unklar ist, ob die Formylierung – wie in Bakterien – post-translational wieder entfernt wird. In der Literatur gibt es keine Daten zu der Frage, ob HPG *in vivo* auch formyliert wird. Aus der Möglichkeit der Formylierung von HPG und der anschließenden Option einer Desthiobiotinylierung in der CuAAC ergeben sich vier Kombinationen, die anstelle von Methionin in den Peptiden auftreten können: HPG, HPG-Desthiobiotin und N-terminal fHPG und fHPG-Desthiobiotin (illustriert in Abbildung 3.15). Nach diesen vier Modifikationen wurde in der massenspektrometrischen Analyse gesucht.



**Abbildung 3.15:** Zusammenfassung möglicher Situationen in Methionin-Positionen massenspektrometrisch gemessener Peptide. Dargestellt sind die Strukturformeln, die Summenformeln und die Differenz zu Methionin. Die Auswertung der Daten mit MaxQuant beruht auf der Eingabe der Summenformel-Differenz für jedes Atom relativ zu Methionin. **a**) internes HPG. **b**) N-terminales, formyliertes HPG. **c**) Aufgeteilt in  $c_1$  = internes HPG-Desthiobiotin und  $c_2$  = N-terminales, formyliertes HPG-Desthiobiotin.

Der Einbau von HPG in mitochondriale Proteine wurde für alle Untereinheiten der Komplexe III und IV nachgewiesen und in allen drei Durchläufen ( $D_a$ - $D_c$ ) wurden modifizierte Peptide gefunden (zusammengefasst in Tabelle 3.7). Das CuAAC-Fusionsprodukt HPG-Desthiobiotin ist die einzige Modifikation, die in allen drei Durchläufen nachgewiesen wurde. Daneben wurde unreagiertes HPG mit einer Ausnahme vor allem in Durchgang  $D_b$  gemessen. In der Prozessierung der Rohdaten wird ein Wahrscheinlichkeitswert ermittelt, der Auskunft über die Genauigkeit der Positionierung der Modifikation im Peptid gibt. Für alle Modifikationen, die mit einer Wahrscheinlichkeit von >90% einer spezifischen Position im Peptid zugewiesen wurden, wird in Tabelle 3.7 in einer eigenen Spalte die Position des modifizierten Methionins in der Primärstruktur des entsprechenden Proteins angegeben. Es wurden keine Formylierungen nachgewiesen, dafür allerdings je ein N-Terminus von Cytochrom *b* und Cox2 mit HPG, bzw. HPG-Desthiobiotin. Dieses Ergebnis zeigt, dass HPG die mitochondriale Translation initiieren kann. Der direkte Nachweis der Formylierung *in vivo* blieb allerdings aus.

Zusammengenommen wurde mit proteinbiochemischen Methoden gezeigt, dass die nicht-kanonische Aminosäure HPG in mitochondrial translatierte Proteine eingebaut wird, dort via CuAAC mit einer funktionalisierten Sonde modifiziert werden kann und dass dieses System verwendet werden kann, um mitochondriale Proteinsyntheseprodukte anzureichern. Damit präsentiert diese Arbeit eine Methode, die direkten Zugriff auf eine zeitlich definierte Subpopulation mitochondrialer Proteinsyntheseprodukte erlaubt und damit zahlreiche Folgeanalysen ermöglicht.

Tabelle 3.7: Zusammenfassung des Einbaunachweises von HPG in mitochondriale Proteine. Das CuAAC-Produkt HPG
Desthiobiotin wurde in allen drei Durchgängen in verschiedenen Peptiden nachgewiesen. Die Spalte "Wahrscheinlichkeit de
Lokalisation" zeigt die jeweilige Peptidsequenz und einen Wert von 0-1 (0-100%) für jede Modifikation, der di
Wahrscheinlichkeit der Positionierung der Modifikation an der jeweiligen Stelle angibt. Ist diese Wahrscheinlichkeit >90%
wird die Positionsentsprechung in der Primärstruktur des Proteins angegeben.

Modifikationstyp	Anzahl Drotoin		Durchgang	Wahrscheinlichkeit der	Desition im Protein	
ινιοαπκατιοπετγρ	AllZalli	Protein	Durchgang	Lokalisation	Position in Protein	
	1	Cox3	Db	M(1)TSGLAMW	27	
	1	Cytochrom b	D <sub>b</sub>	M(0,99)SPM(0,01)RKINPL	1	
	1	Cytochrom b	D <sub>b</sub>	LATM(1)ATAF	124	
	2	Cox1	D <sub>b</sub>	GCM(0,5)GM(0,5)VWAM(0,5)	/	
				M(0,5)SIGF		
HPG	2	Cov1	D,	GCM(0,5)GM(0,5)VWAM(0,5)	/	
		COXI	Db	M(0,5)SIGF		
	2 Cox1	Cox1	D,	GCM(0,5)GM(0,5)VWAM(0,5)	/	
		0.01	Db	M(0,5)SIGF		
	2 Cox1	Cov1	D <sub>b</sub>	GCM(0,5)GM(0,5)VWAM(0,5	/	
		0.01		)M(0,5)SIGF		
	1	Cytochrom b	Da	LATM(1)ATAF	124	
	1	Cox1	D <sub>c</sub>	EEPVYM(1)KS	511	
HPG-Desthiobiotin	1	Cytochrom b	Dc	M(0,062)SPM(0,938)RKINPL	4	
	1	Cox3	D <sub>b</sub>	MTSGLAM(1)W	33	
	1	Cox2	D <sub>b</sub>	M(1)GHAAQVGL	1	
	1	Cytochrom b	D <sub>b</sub>	M(0,01)SPM(0,99)RKINPL	4	
	1	Cytochrom b	Da	M(0,211)SPM(0,789)RKINPL	/	

# 3.4 Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie

Mit dem proteinbiochemischen Beweis, dass die nicht-kanonische Aminosäure HPG in mitochondrial translatierte Proteine eingebaut wird, legt diese Arbeit den Grundstein für eine Visualisierung der mitochondrialen Proteinsynthese in situ, wie es für die cytosolische Proteinsynthese bereits gut etabliert ist (Dieterich et al., 2010; Hinz et al., 2012). Um die mitochondriale Proteinsynthese in intakten fixierten Zellen aufnehmen zu können, ist der direkteste Weg die Kopplung eines Azidfunktionalisierten Farbstoffmoleküls an HPG. Auf diese Weise wurde die räumliche Verteilung der mitochondrialen Proteinsynthese nach wenigen Stunden in ganzen Zellen gemessen. Primäre Fibroblasten (HDFa-Zellen) wurden für 2,5 h mit Cycloheximid und 500 µM HPG inkubiert und nach einem kurzen Puls mit Methionin fixiert. In der CuAAC wurde anschließend ein Azid-funktionalisiertes Derivat der Farbstoff-Eigenentwicklung KK114 (siehe Abbildung 2.1) an die HPG-positiven Proteine gekoppelt. Es wurden konfokale Aufnahmen der Zellen angefertigt. Die Färbung zeigt eine deutliche Markierung des mitochondrialen Netzwerks die nicht homogen ausfällt und damit auf lokale Unterschiede in der Verteilung der mitochondrialen Proteinsynthese in einzelnen Zellen hindeutet (siehe Abbildung 3.16 a). Wurden die Zellen zusätzlich mit Thiamphenicol inkubiert, verschwand die Markierung des mitochondrialen Netzwerks und zeigt damit, dass dessen Markierung vom Einbau der Aminosäure stammt und nicht durch eine bloße Anreicherung verursacht wurde (siehe Abbildung 3.16 b).



**Abbildung 3.16: a**) Räumliche Verteilung der mitochondrialen Proteinsynthese in einer exemplarischen HDFa-Zelle nach 2,5 h mit 500  $\mu$ M HPG in Gegenwart von 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid. **b**) Identische Bedingungen wie **a**), mit zusätzlichen 62,5  $\mu$ g/ml Thiamphenicol. Beide Abbildungen sind Aufsummierungen (*add up*) aus den Rohdaten konfokaler z-Stapel, es wurden keine Bildbearbeitungen durchgeführt. Der Balken repräsentiert 5  $\mu$ m.

Die CuAAC-Fluoreszenzmarkierung bringt das Reportermolekül und das Zielprotein in große räumliche Nähe zueinander, hat aber den Nachteil einer relativ dunklen Färbung, weil jedes HPG mit nur einem Farbstoffmolekül verknüpft wird. Im Vergleich dazu vergrößert die klassische indirekte Immunfluoreszenz die Zielstruktur zwar (Weber, Rathke, & Osborn, 1978), ist aber gleichzeitig heller, weil der Sekundärantikörper zahlreiche Farbstoffmoleküle auf sich vereint. Die Helligkeit einer

Färbung und ihr Kontrast (*signal-to-noise*) beeinflussen die Auflösung, die bei ihrer Messung mit STED-Mikroskopie erreicht werden kann. Bei der Messung der direkten CuAAC-Fluoreszenzmarkierung wurde Auflösung verloren, weil die Intensität des STED-Lasers gesenkt werden musste, um ein schnelles Bleichen der wenigen Farbstoffmoleküle zu vermeiden. Dennoch war eine Aufnahme der mitochondrialen Proteinsynthese nach 2,5 h Inkubationszeit mit 500 µM HPG möglich. Die Messungen erlaubten einen näheren Blick auf Abschnitte einzelner Mitochondrien und verstärkten den Eindruck, dass die Proteinsynthese in Mitochondrien nicht gleichmäßig verteilt ist (siehe Abbildung 3.17).



**Abbildung 3.17:** STED-Aufnahme der räumlichen Verteilung der mitochondrialen Proteinsynthese in einer HDFa-Zelle nach 2,5 h mit 500 µM HPG in Gegenwart von 50 µg/ml Cycloheximid. Vier exemplarische Bereiche sind vergrößert und zeigen deutlich die inhomogene Verteilung des Fluoreszenzsignals entlang der Mitochondrien. Die Aufnahme bildet eine einzelne konfokale Ebene ab. Es wurden keine Bildbearbeitungen durchgeführt. Der Balken repräsentiert 3 µm im Übersichtsbild (Mitte) und 1 µm in den Ausschnitten.

Die geringe Helligkeit eines HPG-Farbstoff-Fusionsproduktes verhinderte die simultane hochauflösende Messung einer Antikörper-Zweitfärbung, weil letztere deutlich heller war. Es wurde keine Farbstoffkombination gefunden, die eine hochauflösende Mehrkanal-Messung ermöglichte. Dabei war es stets der Azid-gekoppelte Farbstoff, der entweder selbst nicht zufriedenstellend funktionierte (Alexa594-Azid), oder eine derart hohe Anregungslaserintensität brauchte (KK114-Azid), dass der Zweitfarbstoff trotz anderen Absorptionsspektrums zu stark mit angeregt wurde und damit die Kanaltrennung beeinträchtigte. Selbst ein *Long Stokes shift dye*, Atto490LS, konnte nicht vom schwachen KK114-Azid-Signal getrennt werden. Ein unkonventioneller Lösungsansatz die Helligkeit der CuAAC-Färbung zu erhöhen, war, zunächst ein Azid-Derivat von AlexaFluor488 mit HPG umzusetzen, dann aber einen Primärantikörper gegen Alexa488-Azid einzusetzen und diesen mit

einem klassischen Sekundärantikörper zu dekorieren. Dieser Ansatz steigerte die Helligkeit der CuAAC-Färbung beträchtlich (siehe Abbildung 3.18).



**Abbildung 3.18:** Die Anwendung der CuAAC-Immunfluoreszenz-Kombination ermöglichte eine deutlich hellere Färbung der mitochondrialen Proteinsynthese nach 2,5 h mit 500  $\mu$ M HPG (HDFa-Zellen).**a**) Inkubation in Gegenwart von 50  $\mu$ g/ml Cycloheximid. **b**) wie **a**), mit 62,5  $\mu$ g/ml Thiamphenicol zusätzlich.

Die Messung der CuAAC-Antikörper-Kombinationsfärbung mit STED bestätigte den Helligkeitsgewinn. Das Vorgehen verursachte allerdings einen sehr hohen Hintergrund außerhalb des mitochondrialen Netzwerks. Kontrollen ergaben, dass der Antikörper selbst eine gute Spezifität zeigte. Daraus wurde gefolgert, dass die Sonde Alexa488-Azid in den Zellen hängen blieb. Unklar war allerdings, zu welchen Teilen der Hintergrund auf unspezifische Rückstände der CuAAC zurückzuführen war und wieviel davon extramitochondriales HPG nachwies, zum Beispiel auf bereits beladenen tRNAs. Um experimentell sinnvoll eingesetzt werden zu können, bedarf dieses Protokoll noch weiterer Optimierung. Sein Potential zeigt es aber in Abbildung 3.19 **d-f**: Abgebildet sind mitochondriale Abschnitte nach einer HPG-Inkubationszeit von nur 15 min. Je kürzer der HPG-Puls gesetzt werden kann, desto besser können die Translation und die Inserierung der mitochondrialen Proteine ihrem natürlichen Ort in der Ultrastruktur der inneren mitochondrialen Membran zugeordnet werden.

Mit konfokaler und hochauflösender STED-Mikroskopie wurde gezeigt, dass die nicht-kanonische Aminosäure HPG geeignet ist, die mitochondriale Proteinsynthese *in situ* zu visualisieren. Die technische Einschränkung dabei war die Beschaffenheit der Azid-funktionalisierten Sonde, die entweder zu dunkel war, oder einen hohen zellulären Hintergrund verursachte. Nichtsdestotrotz ist die CuAAC-Fluoreszenzmarkierung ein wertvolles Werkzeug zur Analyse der mitochondrialen Proteinsynthese.



**Abbildung 3.19:** STED-Aufnahmen der CuAAC-Immunfluoreszenz-Kombination in HDFa-Zellen in Gegenwart von 50 mg/ml Cycloheximid. **a-c**) 500  $\mu$ M HPG für 2,5h. Deutliche Markierung des mitochondrialen Netzwerks in vielen Zellen, aber auch hoher Hintergrund. **d-f**) ebenfalls 500  $\mu$ M HPG, aber nur für 15 min. Nach so kurzer Zeit ist kein vollständiges Netzwerk gefärbt, es fallen nur vereinzelte Mitochondrien auf. Auch nach 15 min ist der Hintergrund bereits hoch; das Protokoll benötigt noch weitere Optimierung. Die Aufnahme bildet eine einzelne konfokale Ebene ab. Es wurden keine Bildbearbeitungen durchgeführt Der Balken repräsentiert überall 1  $\mu$ m.

In dieser Arbeit wurde die mitochondriale Proteinsynthese erstmalig mit einer Methode nachgewiesen, die eine Funktionalisierung der Zielproteine erlaubt und zudem auf den Einsatz radioaktiver Isotope verzichtet. Die metabolische Markierung mitochondrial codierter Proteine mit der nicht-kanonischen Aminosäure Homopropargylglycin (HPG) wurde eingesetzt, um auf Basis der kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition (CuAAC) zahlreiche mitochondriale Syntheseprodukte aufzureinigen und im Western Blot nachzuweisen, wobei Cox1 und Cox3 durch zusätzliche Korrelation mit Antikörpern bestätigt werden konnten. Darüber hinaus wurde der Einbau von HPG in alle mitochondrial codierten Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe III und IV massenspektrometrisch bestätigt. Zusätzlich wurde mit konfokaler und STED-Mikroskopie die mitochondriale Proteinsynthese bereits nach 15 min HPG-Inkubation *in situ* aufgenommen.

# 4.1 Der Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese im Western Blot

## 4.1.1 Die Steigerung der Nachweisempfindlichkeit

Der Nachweis der mitochondrialen Proteinsynthese im Western Blot wurde auf zwei Ebenen durchgeführt. Die erste war der differentielle Einsatz der Translationsinhibitoren Cycloheximid oder Emetin und Thiamphenicol mit dem Ziel, die CuAAC-Modifikation und damit die neusynthetisierte



Abbildung 4.1: Illustration der geringen Signalstärke mitochondrialer Proteinsynthese im Vergleich zur cytosolischen. Aufgetragen wurden gleiche Mengen mitochondrialer Fraktionen, die mit 500 µM HPG-inkubiert und mit Thiamphenicol/Emetin (1) und nur Emetin (2) behandelt wurden bzw. unbehandelt waren (3). Beide Abbildungen zeigen die selbe Membran. Links: 10 s Belichtungszeit. Rechts: Spur 3 wurde mit einem Skalpell abgetrennt. 5 min Belichtungszeit mit deutlich stärker angepasstem Kontrast als links, erkennbar an der Intensität der unspezifischen Banden (\*). Einige mitochondriale Proteine wurden nachgewiesen (\*). Die Membran wurde mit dem Neutravidin-System entwickelt.

Subpopulation nachzuweisen. Die zweite Ebene war die Korrelation der spezifischen Banden aus der ersten Ebene mit einer klassischen Antikörper-Dekoration, die die gesamte Menge des jeweiligen Proteins nachwies und nicht zwischen endogenem Pool und der HPGpositiven Subpopulation unterscheiden konnte. Jede dieser Ebenen brachte eigene Herausforderungen mit sich. So erforderte der Nachweis der neu synthetisierten Subpopulation eine Steigerung der Empfindlichkeit des Protokolls, während die Korrelation vor allem durch die geringe Anzahl funktionierender Antikörper limitiert wurde.

Die klassische indirekte Antikörperdekoration gegen eine CuAAC-Sonde (Alexa488 oder Biotin) reichte nur für den Nachweis der cytosolischen Proteinsynthese (siehe Abbildung 3.1). Auch Dieterich *et al.* (2006) sehen in ihrer Studie, die CuAAC und Massenspektrometrie mit dem Fokus auf cytosolische Proteinsynthese verknüpft, mit der

klassischen indirekten Antikörpermarkierung gegen die CuAAC-Sonde keine Signale für mitochondriale Proteinsynthese. Die nötige Sensitivität für den Nachweis wurde in dieser Arbeit erst mit der Entwicklung des Neutravidin-Systems erreicht (siehe Abschnitt 3.1.5 und Abbildung 4.1). Obwohl Neutravidin ein Derivat des sehr basischen Avidins ist (pl>10) und nur in einem Puffersystem ab pH 9,5 wenig Hintergrund verursachte, wurde es Streptavidin mit pl <7 (Bayer & Wilchek, 1990) vorgezogen, um Konflikte mit der Aufreinigung (siehe Abschnitt 3.3.2) zu vermeiden. Streptavidin ist aufgrund seiner Stabilität gegenüber hohen SDS-Konzentrationen bei Raumtemperatur (Waner *et al.*, 2004) sehr gut für die Aufreinigung geeignet. Da sich eine leichte Verunreinigung der Eluate mit monomerem Streptavidin aber nicht vollständig verhindern ließ, senkte der Einsatz von Neutravidin in der Entwicklung der Nitrocellulose-Membranen den Hintergrund deutlich, weil der Antikörper gegen Avidin nur eine geringe Kreuzreaktion mit Streptavidin zeigte (siehe Abbildung 3.10). Wurde Steptavidin allerdings in beiden Protokollen eingesetzt, überstrahlte der Hintergrund das spezifische Signal.

# 4.1.2 Der Nachweis durch nicht-kanonische und radioaktive Aminosäuren im Vergleich

Die Kombination der CuAAC und der anschließenden Aufreinigung mit dem Neutravidin-System zur Entwicklung der Nitrocellulose-Membranen ermöglichte eine Visualisierung elektrophoretisch aufgetrennter mitochondrialer Translationsprodukte, wie sie bislang nur mit Autoradiogrammen möglich gewesen ist. In dieser Arbeit wurden im Western Blot je nach Experiment bis zu 10, nicht aber die vollständige Zahl von 13 Banden beobachtet, die empfindlich auf den mitochondrialen Translationsinhibitor Thiamphenicol reagierten (siehe Abbildung 3.8). Die nachgewiesenen Banden befanden sich vor allem im Molekulargewichtsrahmen zwischen 45 und 20 kDa. Damit passten sie gut zu dem Autoradiogramm einer älteren Studie (a in Abbildung 4.2). Auch eine weitere Studie zeigt, dass sich die deutlichsten mitochondrialen Syntheseprodukte in HeLa-Zellen in diesem Molekulargewichtsrahmen bewegen (Costantino & Attardi, 1977). Die drei mitochondrialen Proteine Cox1, ND4 und ND5 (siehe Tabelle 3.4) haben vorhergesagte Molekulargewichte, die größer sind als die in dieser Arbeit beobachteten Banden. Gegen zwei dieser Proteine (Cox1 und ND5) wurden Antikörper gefunden, die nur eine Bande markierten. Interessanterweise passte die Laufhöhe der dekorierten Banden für beide Proteine nicht zur Vorhersage, sondern war niedriger (siehe Tabelle 3.5). Während ND5 mit 55 kDa selbst abweichend noch höher lief als die deutlichen CuAAC-Markierungen und deswegen auch die Korrelation mit der Antikörperbande keine eindeutige Zuordnung erlaubte (siehe Abschnitt 3.2.3 und Abbildung 3.12), fiel das Cox1-Signal mit ca. 42 kDa genau in den Bereich der CuAAC-Markierungen, wie mit der erfolgreichen Korrelation der Antikörper-Dekoration bestätigt wurde (siehe Abbildung 3.12). Zudem wurde Cox1 in dieser Arbeit auch in der

massenspektrometrischen Analyse gemessen (siehe Tabelle 3.7). Für das abweichende Laufverhalten mitochondrialer Proteine im Polyacrylamid-Gel lassen sich auch in der Literatur Belege finden. So ist zum Beispiel im Rind für zahlreiche Untereinheiten von Komplex I, der NADH-Dehydrogenase, ein abweichendes Laufverhalten beschrieben worden, unter anderem wurde ND4 bei 39 kDa statt 52 kDa und ND5 bei 50 kDa statt 68 kDa beobachtet (Walker, 1992). Auch über Cytochrom b und ATP6 ist berichtet worden, dass sie niedriger laufen als erwartet (Fearnley & Walker, 1986). Zu dieser Studie passt auch das Ergebnis einer neueren Veröffentlichung (siehe Abbildung 4.4). Für Cox1 der Hefe zeigt eine andere Studie ein abweichendes Laufverhalten, das mit dieser Arbeit vergleichbar ist (Mick et al., 2010) und auch für das humane Cox2 ist ein pufferabhängiges Laufverhalten berichtet worden (Chomyn, 1996). Für die Proteine Cox1 und Cox2 ist eine mögliche Erklärung, dass beide Kupferatome binden (Horn & Barrientos, 2008), die, im Zuge der TPEN-Chelierung zur Beendigung der CuAAC (siehe Abschnitt 3.1.5), aus den Proteinen extrahiert worden sein könnten. Es ist beispielsweise auch für Calcium-bindende Proteine bereits gezeigt worden, dass sich ihr Laufverhalten im Polyacrylamid-Gel in Abhängigkeit der Präsenz von Calcium oder eines Chelators verändert (Garrigos et al., 1991). Darüber hinaus wurde für Cox1 gezeigt, dass es in seinem aktiven Zentrum eine intramolekulare kovalente Verknüpfung zwischen einem Histidin und einem Tyrosin ausbildet (Buse et al., 1999). Auch diese Veränderung der Primärstruktur könnte das Laufverhalten des Proteins im Polyacrylamid-Gel beeinflussen. Anhand von Cox1 ist in dieser Arbeit gezeigt worden, dass mitochondriale Proteine im Polyacrylamid-Gel ein abweichendes Laufverhalten haben können. Es ist daher möglich, dass mehrere mitochondriale Proteine so nah beieinander liefen, dass sie nicht als einzelne Banden aufgelöst werden konnten. Durch die Korrelation mit Antikörper-Markierungen wurden in dieser Arbeit nur Cox1 und Cox3 im Western Blot nachgewiesen, die restlichen metabolisch markierten Banden konnten mangels spezifischer Antikörper nicht eindeutig zugeordnet werden.

Neuere Studien geben häufig keinen Größenstandard zu ihren Autoradiogrammen an (**b-e** in Abbildung 4.2, Ausnahme: Abbildung 4.4) Dennoch lassen sich diese zum Vergleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit heranziehen. Die geringe Signalintensität im niedermolekularen Bereich (ATP8, ND3, ND6 und ND4L) beispielsweise in Abbildung 4.2 **e** zeigt, dass der Nachweis dieser Proteine eine extrem hohe Sensitivität benötigt. Vergleicht man zudem die Abbildung 4.2 zugrunde liegenden <sup>35</sup>S-Methionin-Inkubationszeiten (max. 90 min, siehe Tabelle 4.1) mit den 5 h HPG, mit denen die Zellen in Abbildung 4.2 **f** inkubiert wurden, zeigt sich, dass der <sup>35</sup>S-Methionin-Nachweis sensitiver ist als der CuAAC-Nachweis. Chomyn (1996) hat sich näher mit dem Einbau von <sup>35</sup>S-Methionin in mitochondriale Translationsprodukte beschäftigt und gezeigt, dass die Markierung der mitochondrialen Proteinsynthese durch Inkorporation von <sup>35</sup>S-Methionin nur in den ersten 30 min für alle Proteine linear ist und danach nur noch ein asymmetrischer Einbau zu beobachten ist. Eine

verlängerte Inkubationszeit mit dem Methionin-Substitut vereinfacht folglich nicht zwangsläufig die Detektion aller mitochondrialen Proteine. Eine plausible Erklärung für die Schwierigkeiten des Nachweises niedermolekularer mitochondrialer Translationsprodukte ist das Auflösungsvermögen des Polyacrylamid-Gels: Abbildung 4.2 e liegt ein 15-20% exponentielles Gradienten-Polyacrylamid-Gel mit einer Trenngelhöhe von 18 cm zugrunde, während das eigene Experiment auf einem linearen 12,5% Polyacrylamid-Gel mit einer Trenngelhöhe von maximal 6 cm beruhte (Abbildung 4.2 f). Eine weitere Herausforderung für den Western Blot sind die Elution und der Transfer aller Proteine aus dem Polyacrylamid-Gel auf die Nitrocellulose-Membran. Da 5 der 13 mitochondrialen Proteine zumindest theoretisch einen isoelektrischen Punkt > pH 9 haben (siehe Tabelle 3.4), wurde ein basischer Transferpuffer nach Szewczyk und Kozloff (1985) gewählt, um den Transfer aller Proteine zu unterstützen. Nichtsdestotrotz bedeutet auch der Transfer ein weiteres Risiko für Materialverlust. Obgleich erfolgreich, so ist der Nachweis der mitochondrialen Proteinsynthese im Western Blot im Vergleich zum Autoradiogramm eines Polyacrylamid-Gels mit einigen methodischen Schwierigkeiten behaftet. Seinen Vorteil gegenüber <sup>35</sup>S-Methionin hat der Einsatz nicht-kanonischer Aminosäuren allerdings in der Diversität der möglichen Folgeanalysen.

Zusammengefasst wurden bis zu 10 separate Banden beobachtet, die eine metabolische Markierung mitochondrialer Proteinsyntheseprodukte repräsentierten. Von diesen wurden Cox1 und Cox3 mittels Antikörper-Korrelation bestätigt. Der Vergleich mit Autoradiogrammen legt nahe, dass vor allem der Nachweis niedermolekularer mitochondrialer Proteinsyntheseprodukte eine besondere Herausforderung darstellt, weil sie im Verhältnis zu den größeren Proteinen seltener nachsynthetisiert werden.



**Abbildung 4.2:** Vergleich einiger Autoradiogramme mitochondrialer Proteinsynthese (**a**-**e**) aus verschiedenen Zelltypen mit dem CuAAC-Nachweis im Western Blot ohne radioaktive Isotope in dieser Arbeit (**f**). Dem eigenen Nachweis liegen Aufreinigungen von alkylierten mitochondrialen Fraktionen nach 5 h mit 500  $\mu$ M HPG zugrunde. 1: Emetin 172  $\mu$ g/ml. 2: Emetin 172  $\mu$ g/ml und Thiamphenicol 62,5  $\mu$ g/ml. Die Quellen der Autoradiogramme sind **a**) Jeffreys und Craig (1976). **b**) Sanchez *et al.* (2011). **c**) Wydro *et al.* (2010). **d**) Antonicka *et al.* (2017). **e**) Chomyn (1996). Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht der Experimentalbedingungen der Autoradiogramme.

_			-	-	
Studie	Zelltyp	Isotop	Dauer [min]	Syntheseinhibitoren	
A (Jeffreys & Craig, 1976)	HeLa B	<sup>35</sup> S-Methionin	90	Emetin 50 µg/ml	
<b>B</b> (Sanchez <i>et al.,</i> 2011)	HeLa	<sup>35</sup> S-Methionin	60	Emetin 100 μg/ml	
<b>C</b> (Wydro <i>et al.</i> , 2010)	HEK293T	<sup>35</sup> S-Methionin	30	Emetin 100 μg/ml	
<b>D</b> (Antonicka <i>et al.</i> , 2017)	143B	<sup>35</sup> S-Methionin	60	Emetin 100 μg/ml	
E (Chomyn 1996)	143B	35S-Methionin	143 B 1 h	Emetin 100 ug/ml	
<b>E</b> (Chomyn, 1990)	HeLa	J-IMELIIIUIIIII	HeLa 2 h	Linetin 100 µg/mi	

 Tabelle 4.1: Zusammenfassung der experimentalen Bedingungen der Autoradiogramme in Abbildung 4.2.

# 4.2 Der massenspektrometrische Nachweis des mitochondrial codierten Proteoms

Der massenspektrometrische Nachweis der Gesamtheit der mitochondrial translatierten Proteine ist schon anspruchsvoll, ohne dass der Fokus auf die frisch synthetisierte Subpopulation gelegt wird: In den Lysaten unbehandelter mitochondrialer Fraktionen verschiedener Zelltypen wurden die Proteine ATP6, Cytochrom b, Cox1, Cox2, Cox3, ND1, ND2, ND4 und ND5 nachgewiesen (siehe Abbildung 3.13). Interessanterweise sind die fehlenden Proteine genau die vier niedermolekularen Spezies (ATP8, ND3, ND4L und ND6), auf die auch im Western Blot kein Hinweis gefunden wurde. Für mitochondrial codierte Proteine gilt, dass sie mit einem Chymotrypsin-Verdau besser nachweisbar sind als mit Trypsin. Dies wurde in dieser Arbeit beobachtet (siehe Abbildung 3.13) und findet auch Belege in zahlreichen anderen Studien (Liko et al., 2016; Marx et al., 1998; Sun, Kinter, & Anderson, 2003). Ein Blick in Tabelle 6.1 zeigt zumindest für ND3, ND4L und ND6, dass ein vollständiger Verdau mit Trypsin nur sehr wenig Peptide erzeugt, die mit mindestens 14 Aminosäuren für hydrophobe Peptide außerdem noch verhältnismäßig lang sind und damit eher im oberen Größenbereich dessen mitspielen, was überhaupt an spezifischen Peptiden gemessen wurde (siehe Tabelle 3.6). Allerdings erzeugt der Chymotrypsin-Verdau aller vier Proteine mindestens drei Peptide pro Protein, die mit 7 bis 10 Aminosäuren sehr kurz ausfallen (siehe Tabelle 6.2). Dies macht eine geringe Häufigkeit dieser Proteine zur wahrscheinlicheren Ursache für den misslungenen Nachweis. Unterstützt wird diese Theorie auch von Autoradiogrammen, die zeigen, dass diese vier Proteine zu den weniger abundanten mitochondrialen Spezies gehören (siehe Abbildung 4.2). In den unbehandelten mitochondrialen Fraktionen wurden zwar mehr mitochondriale Proteine nachgewiesen als in der Aufreinigung nach der CuAAC, der Vergleich zwischen beiden Experimenten zeigt aber, dass die Proteine, die in unbehandelten mitochondrialen Fraktionen am häufigsten nachgewiesen wurden, auch in der CuAAC-Aufreinigung gemessen wurden (siehe Abbildung 4.3). Denkbar ist natürlich, dass die Komposition des CuAAC-Reaktionsgemisches mit NaCl, Glycerol, tert-Butanol, H<sub>2</sub>O und Natriumdodecylsulfat einen negativen Einfluss selektiv auf die in der Aufreinigung fehlenden mitochondrialen Proteine hat. Da sich allerdings die Nachweismuster mit und ohne Kontakt der Proben zum CuAAC-Reaktionsgemisch so sehr ähneln, wird davon ausgegangen, dass die biochemischen Eigenschaften der Zielproteine zwar für die Schwierigkeiten verantwortlich sind, diese den Nachweis aber unabhängig von der CuAAC-

Behandlung komplizieren und die absolute Konzentration jedes der Proteine den größten limitierenden Faktor darstellt. Der Nachweis in unbehandelten mitochondrialen Fraktionen wird zwar von mehr cytosolischen Proteinen verunreinigt als die Aufreinigung, dafür allerdings ist die Konzentration der mitochondrialen Proteine auch deutlich höher als in der Aufreinigung, die zudem selbst noch mit vielen Proteinen verunreinigt sind (siehe Abschnitt 3.3.2).



**Abbildung 4.3:** Vergleich der nachgewiesenen Peptidzahlen der mitochondrialen Proteine nach einem Verdau mit Chymotrypsin. Die blauen Balken repräsentieren den Mittelwert aus zwei Durchgängen mit unbehandelten mitochondrialen Fraktionen, die roten Balken repräsentieren den Mittelwert aus den drei Durchgängen D<sub>a</sub> bis D<sub>c</sub> aus dem Nachweis nach der CuAAC-Aufreinigung (siehe Tabelle 3.6). Der schraffierte Balken bei ND4 bedeutet, dass dieses Protein als einziges nur in einem der drei Durchgänge nachgewiesen wurde. Alle anderen Proteine wurden in mindestens zwei separaten Durchgängen nachgewiesen.

Die meisten Probleme traten im Zusammenhang mit dem Nachweis von Untereinheiten der Komplexe I und V auf. Die Untereinheiten von Komplex I waren in der massenspektrometrischen Analyse dieser Arbeit unterrepräsentiert, obwohl sie mehr als die Hälfte der mitochondrial codierten Proteine ausmachen. Die Komposition von Komplex I, insbesondere aus Rinderherzen, ist bereits sehr gut charakterisiert worden (Carroll *et al.*, 2003). Komplex I gehört mit seinen insgesamt 45 Untereinheiten zu den größten bekannten Enzymen überhaupt (Zhu, Vinothkumar, & Hirst, 2016). Sieben davon sind im mitochondrialen Genom codiert und es sind genau diese sieben Proteine, deren massenspektrometrischer Nachweis aufgrund ihrer hohen Hydrophobizität auch anderen Gruppen große Probleme bereitet (Fearnley & Walker, 1986). In dieser Arbeit gelang selbst bei der Analyse vollständiger mitochondrialer Fraktionen nur ein verhältnismäßig schwacher Nachweis von ND1, ND2, ND4 und ND5, während ND3, ND4L und ND6 gänzlich fehlten. Nach der Aufreinigung gelang nur noch ein schwacher Nachweis von ND4 und dieser auch nur in einem von drei Durchgängen.

Legt man den Fokus auf den Nachweis von Komplex V (ATP6 und ATP8), könnte eine Behandlung der Zellen mit Thiamphenicol für bis zu 24 h vor dem Start der Inkubation mit nicht-kanonischen Aminosäuren hilfreich sein, weil diese Vorbehandlung die Mengen von ATP6/8 relativ zu den übrigen Proteinen erhöhen soll (Chomyn, 1996). In dieser Arbeit wurde nur ATP6 nachgewiesen, und das auch noch sehr schwach und nur in mitochondrialen Fraktionen, nicht in der Aufreinigung. Der früheste massenspektrometrische Nachweis von ATP6 und ATP8 (alter Name: A6L) erfolgte nach einer Extraktion dieser Proteine (und weniger anderer bis ca 35 kDa) aus einer mitochondrialen Fraktion mit einem 2:1 Chloroform-Methanol-Gemisch (Fearnley & Walker, 1986). Damit galten beide Proteine als "Proteolipide", einem alten Begriff für (Lipo-)Proteine, die in organischen Lösungsmitteln, nicht aber in wässrigen Salzlösungen löslich sind (Folch & Lees, 1951). Eine weitere Studie (Boyot et al., 1988) hat für ATP8 und andere hydrophobe Proteine <10 kDa gezeigt, dass sie sogar in Chloroform-Methanol-Wasser-Mischverhältnissen löslich sind, die der normalen Fällung nach Wessel und Flügge (1984) entsprechen. In dieser Arbeit wurden Proteine routinemäßig nach Wessel und Flügge gefällt (siehe Abschnitt 2.5.2), weil diese Fällung pH-neutral ist und der CuAAC-Ligand Bicinchoninsäure nur im neutralen bis basischen löslich ist (siehe Abschnitt 3.1.1), im Zuge einer Fällung aber von den Proteinen abgetrennt werden sollte. Da zu Anreicherungszwecken selbst die Testverdaus für die massenspektrometrische Analyse (siehe Abschnitt 3.3.1) gefällt wurden, muss von einem Verlust zumindest von ATP8 ausgegangen werden und möglicherweise sind auch andere mitochondriale Proteine vollständig oder partiell während der Fällung verloren gegangen. Gerade die hydrophoben Komplex I-Untereinheiten sind hier gute Kandidaten, weil auch für ND2 und ND4 bereits eine Isolierung mit Chloroform-Methanol-Gemischen berichtet worden ist (Fearnley & Walker, 1987). Dieser Bericht bezieht sich allerdings auf eine höhere Chloroform-Konzentration und der Nachweis von ND2 und ND4 in unbehandelten mitochondrialen Fraktionen zeigt, dass die Proteine nicht vollständig verloren gehen. Dennoch könnte eine Anpassung des Vorgehens in Hinsicht auf die Proteinfällung die Ausbeute des Proteinnachweises steigern.

Die massenspektrometrische Analyse der Proben in dieser Arbeit erfolgte durch eine Elektrosprayionisation der Peptide nach einer *reverse phase* Chromatografie über eine C18-Säule mit einer Elution in einem 5-35% Acetonitril-Gradienten (siehe Abschnitt 2.9). Das vollständige Protein ATP8 (68 Aminosäuren, 7,9 kDa) eluiert aber erst bei etwa 65% Acetonitril (Fearnley & Walker, 1986). Eine Möglichkeit, noch hydrophobere Peptide zu eluieren und damit die Nachweisausbeute zu steigern, könnte folglich sein, den Gradienten auszuweiten. Darüber hinaus gibt es auch den Vorschlag Chloroform-Methanol-Gemische, unter anderem auch das Wessel&Flügge-Verhältnis von 4:4:1, zur Elution hydrophober Peptide zu verwenden (Schaller, Pellascio, & Schlunegger, 1997; Schindler, Vandorsselaer, & Falick, 1993). Um in Zukunft auch mit dem massenspektrometrischen Nachweis für

Untereinheiten der Komplexe I und Verfolgreich zu sein, erscheint es folglich vielversprechend, in der Verarbeitung der Proben auf jeden Einsatz der Chloroform-Methanol-Mischung zu verzichten und den Einsatz eines solchen höchstens für die Elution der chymotryptischen Peptide in Erwägung zu ziehen. Um in einer massenspektrometrischen Analyse gemessen werden zu können, muss die zu analysierende Probe ionisiert und in die Gasphase eingebracht werden. Im Falle hydrophober Proben ist die Ionisierung besonders problematisch (Sokolova et al., 2010). Die Ionisierungstechnik LILBID (Laser Induced Liquid Bead Ion Desorption), die auf einen enzymatischen Verdau der Proteine verzichtet und gleichzeitig in Gegenwart von Detergenzien durchgeführt werden kann, vereinfacht den Nachweis hydrophober Membranproteine. Diese Methode ermöglicht die Analyse ganzer Proteinkomplexe, indem Tropfen einer wässrigen Lösung, die die Probe enthalten, in ein Vakuum gebracht und dort durch Bestrahlung mit einem Infrarotlaser, dessen Wellenlänge dem Absorptionsmaximum von Wasser entspricht, zur Explosion gebracht werden. Nicht-kovalente Bindungen werden dadurch in Abhängigkeit der Laserintensität aufgebrochen und die Untereinheiten können massenspektrometrisch analysiert werden. Die Laserintensität kann dabei fein genug justiert werden, dass Subkomplexe intakt bleiben. Mit dieser Methode sind bereits alle mitochondrial codierten Untereinheiten gemessen worden, jeweils direkt aus dem Kontext ihres Enzymkomplexes heraus. (Hoffmann et al., 2010; Morgner et al., 2007; Sokolova et al., 2010). LILBID ist eine interessante Alternative für den massenspektrometrischen Nachweis hydrophober Proteine.

# 4.3 Ausweitung des Nachweises auf die HPG-positive Subpopulation der mitochondrial codierten Proteine

Der Nachweis von HPG-Einbau in mitochondrial codierte Proteine ist in dieser Arbeit für alle Untereinheiten der Atmungskettenkomplexe III und IV gelungen. Cytochrom *b*, die einzige mitochondrial codierte Untereinheit von Komplex III, wurde reproduzierbar als Teil der HPG-positiven Subpopulation nachgewiesen (siehe Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7). Cytochrom *b* ist Ausgangspunkt für die Assemblierung von Komplex III (Gruschke *et al.*, 2012; Ott *et al.*, 2016). Nach seiner Translation und Insertion in die innere mitochondriale Membran durchläuft Cytochrom *b* einen Reifungsprozess, durch den es über weitere Proteine als Hilfsfaktoren sequentiell mit zwei Häm *b*-Gruppen versehen wird (Hildenbeutel *et al.*, 2014). Ein solcher Hilfsfaktor wurde durch einen mutationsbedingten Gendefekt in den Zellen eines Spenders beschrieben (Tucker *et al.*, 2013). Eine Besonderheit dieser Studie an menschlichen Zellen ist, dass Cytochrom *b* in den mutierten Zellen bedingt durch den defekten Hilfsfaktor erheblich destabilisiert wird und deshalb nur in Kontrollzellen nachgewiesen wird. Auf diese Weise können die Autoren Cytochrom *b* in einem Autoradiogramm zweifellos identifizieren. Sie geben zudem einen Größenstandard an und bestätigen damit, dass die mitochondrial codierten



Abbildung 4.4: Abbildung angepasst nach Tucker et al. (2013). Gezeigt wird der Vergleich der mitochondrialen Proteinsynthese gesunder Fibroblasten (a) mit denen eines Spenders, in denen die Stabilität von Cytochrom b durch die Mutation eines seiner Prozessierungsfaktoren schwer beeinträchtig ist (b). Der angegebene Größenstandard belegt das abweichende Laufverhalten der mitochondrialen Proteine, was auch in dieser Arbeit beobachtet wurde. 35**S-**Autoradiogramm nach zweistündiger Methionin in Gegenwart von Cycloheximid.

Proteine in einem Polyacrylamid-Gel vollkommen abweichend von ihrem vorhergesagten Molekulargewicht laufen können (siehe Abbildung 4.4).

Obwohl Cytochrom *b* auch mit einem Chloroform-Methanol-Gemisch isoliert werden kann (Fearnley & Walker, 1987), wurde es mit dem Mischverhältnis der Wessel und Flügge-Fällung in dieser Arbeit verlässlich präzipitiert und ging nicht verloren. Mit der Detektion mehrerer Peptide mit entsprechenden Modifikationen wurde zudem auch der Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure HPG in Cytochrom *b* bestätigt (siehe Tabelle 3.7) und gezeigt, dass Cytochrom *b* über die CuAAC-Desthiobiotinylierung erfolgreich angereichert wurde.

Neben Komplex III wurden auch alle mitochondrial codierten Untereinheiten von Komplex IV, Cox1, Cox2 und Cox3 nachgewiesen. Komplex IV ist das letzte Enzym der Atmungskette. Cox1 ist seine katalytische Untereinheit

und der Ausgangpunkt für dessen Assemblierung (Fornuskova *et al.*, 2010). Es enthält zwei Häm *a*-Gruppen (*a* und *a*<sub>3</sub>), eine davon (*a*<sub>3</sub>) in unmittelbarer räumlicher Nähe zu einem einatomigen Kupfer-Zentrum (B), mit dem zusammen sie das *a*<sub>3</sub>-B bimetallische aktive Zentrum des Enzyms bildet, an dem molekularer Sauerstoff zu Wasser reduziert wird. Auch Cox2 enthält ein zweiatomiges Kupferzentrum, das Zentrum A (Bourens & Barrientos, 2017; Tsukihara *et al.*, 1996). Die Assemblierung von Komplex IV ist ein noch nicht vollständig verstandenes sequentielles Zusammenspiel vieler Hilfsfaktoren, die zusammen mit den mitochondrial codierten und cytosolischen Cox-Untereinheiten prämature Komplexe formen (Dennerlein & Rehling, 2015; Mick *et al.*, 2012). Cox1-3 wurden in dieser Arbeit in der massenspektrometrischen Analyse in mehreren individuellen Durchgängen nachgewiesen. Zudem wurde für alle drei Proteine der Einbau von HPG bewiesen, indem entsprechend modifizierte Peptide gemessen wurden (siehe Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7). Mit dem Nachweis des Einbaus von HPG in mitochondrial codierte Proteine bestätigt diese Arbeit, dass die nicht-kanonische Aminosäure HPG ein Substrat für die mitochondriale methionyl-tRNA-Synthetase ist und diese die Beladung HPG-tRNA<sup>Met</sup> der mitochondrialen tRNA<sup>Met</sup> katalysiert (siehe Abschnitt 1.2.3.5).

Eine weitere Frage die in der massenspektrometrischen Analyse verfolgt wurde, ist, ob HPG auch als Translationsinitiator genutzt wird. Die mitochondriale Translation wird, genau wie die bakterielle, durch formyliertes Methionin initiiert. Für eine Reihe mitochondrial codierter Proteine ist bereits eine

N-terminale Formylierung gezeigt worden, darunter ND2, ND4, Cytochrom *b*, ATP6 und ATP8 (Fearnley & Walker, 1986, 1987). Deswegen wurde bei der Auswertung der massenspektrometrischen Daten auch nach formyliertem HPG gesucht (siehe Abbildung 3.15). Dieses wurde aber nicht nachgewiesen. Das Interessante ist, dass sowohl von Cytochrom *b* als auch von Cox2 je ein N-Terminus gemessen wurden, die mit annähernd hundertprozentiger Wahrscheinlichkeit eine HPG-Substitution in Position 1 trugen (siehe Tabelle 3.7). Dieser Befund zeigt, dass HPG auch N-terminal eingebaut wird. Es gibt Daten die zeigen, dass die mitochondriale Translation auch ohne Formylierung der Initiator-Aminosäure beginnen kann, obwohl eine Störung der Formylierung schwerwiegende mitochondriale Defekte nach sich zieht (Hinttala *et al.*, 2015). Es gibt allerdings auch eine post-translationale Entfernung der Formyl-Gruppe in Mitochondrien, die von einer Deformylase katalysiert wird und deren Inhibierung ihrerseits das Zellwachstum unterbindet (M. D. Lee *et al.*, 2004). Da in dieser Arbeit keine Formylierung von HPG gemessen wurde, kann nicht beurteilt werden, ob HPG-tRNA<sup>Met</sup> ein Substrat für die methionyl-tRNA-Formyltransferase und die Deformylase ist. Die hier präsentierten Daten zeigen aber, dass Zellen HPG sowohl zur Elongation, als auch zur Initiation der mitochondrialen Translation nutzen können.

Diese Ergebnisse ermöglichen neue Vorgehensweisen in der Untersuchung der mitochondrialen Proteinsynthese. Für einen biochemischen Ansatz wäre zum Beispiel die Suche nach sehr frühen Interaktionspartnern während oder nach der Translation denkbar: Pulse von HPG könnten dafür verwendet werden, die Interaktionspartner naszierender Proteine in definierten Zeiträumen zu ermitteln und somit Zugriff auf noch unbekannte Assemblierungs- oder Reifungsfaktoren gewähren, etwa durch milde chemische Kreuzvernetzung und anschließende Aufreinigung der Produkte über eine CuAAC-Modifikation.

Der massenspektrometrische Nachweis der mitochondrialen Proteinsynthese ist bislang nicht sehr effizient. Mehr Ausgangsmaterial einzusetzen ist natürlich möglich, aber nur bis zu einem gewissen Punkt ökonomisch sinnvoll. So groß die Vorteile und Weiterverarbeitungsmöglichkeiten der CuAAC auch sind, so birgt diese Reaktion selbst aber auch Gefahren für die Zielproteine. Diese Gefahren können durch Verständnis des Reaktionsprozesses und seiner Risiken für Biomoleküle noch weiter minimiert werden, als es in den Ergebnissen dieser Arbeit bereits getan wurde. Um dies zu erreichen, muss sich noch einmal mit den Details der CuAAC beschäftigt werden.

# 4.4 Die kupferkatalysierte 1,3-dipolare Cycloaddition in biologischen Proben

#### 4.4.1 Erzeugung des Katalysators und Schutz der Proteine vor freien Radikalen

Der erste Schritt für den CuAAC-Nachweis mitochondrialer Proteine war die Etablierung eines Reaktionscocktails, der die Umsetzung einer sehr kleinen Population hydrophober Membranproteine in einem wässrigen Milieu erlaubte, ohne die Proteine dabei zu stark oxidativ zu schädigen. Um dies

zu erreichen, musste der Fokus auf Kupfer als Katalysator der CuAAC gerichtet werden (Rostovtsev et al., 2002; Tornoe et al., 2002). In biologischen Systemen ist Kupfer wegen der Leichtigkeit, mit der es oxidiert bzw. reduziert wird, essentieller Bestandteil in vielen Prozessen. Es ist als Elektronenüberträger beispielsweise in der Atmungskette, aber auch als strukturbestimmender Co-Faktor von Proteinen bedeutsam (Festa & Thiele, 2011). Freies Kupfer allerdings ist nicht nur für Lebewesen toxisch (Cao et al., 2012), sondern richtet auch in vitro an Biomolekülen viel Schaden an, weil die Oxidation reduzierter Metall-Ionen wie Cu<sup>+</sup> an molekularem Sauerstoff Hyperoxid-Radikale  $(\cdot O_2)$  erzeugt, die ihrerseits zu Wasserstoffperoxid weiterreagieren. Dieses wiederum reagiert ebenfalls mit reduzierten Metall-Ionen in einer Fenton-Reaktion (Kim, Rhee, & Stadtman, 1985), was zu der Entstehung des hochreaktiven Hydroxyl-Radikals (·OH) führt (Festa & Thiele, 2011; Hein & Fokin, 2010; Oster & Oster, 1974). OH verursacht starke Schäden an den Proteinen, die von der chemischen Veränderung von Seitenketten (insbesondere Tryptophan), über Spaltung der Peptidbindung bis hin zu kovalenten Verknüpfungen zwischen Proteinen reichen (Davies, 1987). Zudem kann auch reduziertes Kupfer Peptidspaltungen verursachen (Allen & Campbell, 1996; M. A. Smith et al., 1996). Aus der Empfindlichkeit der Protein-Lysate gegenüber diesen Prozessen (siehe Abbildung 3.1) ist die Notwendigkeit entstanden, für die in situ Reduktion von CuSO<sub>4</sub> mildere Bedingungen als das klassische Pärchen CuSO<sub>4</sub>/Ascorbinsäure (Rostovtsev *et al.*, 2002) zu verwenden. Mit Tris-(carboxyethyl)-phosphin (TCEP, siehe Abbildung 3.2 a) wurde eine Alternative gewählt, die bereits in anderen Studien Erwähnung gefunden hat (Speers et al., 2003; Speers & Cravatt, 2004), aber noch einiges an eigener Etablierungsarbeit erforderte, da es hohe Anforderungen an einen CuAAC-Reaktionscocktail stellt. Das in dieser Arbeit gefundene optimale Verhältnis von TCEP zu CuSO4 von 1:2 für eine effiziente Reduktion des Metalls (siehe Abschnitt 3.1.1) wird mit der Elektronentransfer-Bilanz der Reduktion von Disulfidbrücken durch TCEP erklärt: Im Zuge dieser Reaktion werden unter Verbrauch von Wasser zwei Schwefelatome mit je einem Elektron reduziert, die beide vom zentralen Phosphin von TCEP stammen (siehe Abbildung 4.5 a). Analog dazu wird davon ausgegangen, dass die Kupfer-katalysierte Oxidation von TCEP als Vorbereitung für die CuAAC dann optimal läuft, wenn zwei Kupfer-Atome mit jeweils einem Elektron reduziert werden (siehe Abbildung 4.5 b).



**Abbildung 4.5:** a) Schematische Darstellung der Reduktion einer Disulfidbrücke durch TCEP nach Alzahrani und Welham (2014). Der Prozess verbraucht ein Molekül Wasser. b) Illustration der vorgeschlagenen Oxidation von TCEP an zwei Cu<sup>2+</sup>-Ionen. Die Geschwindigkeit des Farbumschlags in Anwesenheit des Cu<sup>+</sup>-Liganden BCA und die damit einhergehende hohe Effizienz der CuAAC haben zu der Etablierung des TCEP:Cu-Verhältnisses von 1:2 in dieser Arbeit geführt. Die Kupferkatalysierte Oxidation von TCEP säuert das CuAAC-Reaktionsgemisch stark an.

Im Vergleich zur Ascorbinsäure reduziert TCEP Kupfer deutlich langsamer und nur die optimale 1:2 Stöchiometrie erlaubte in einem rein wässrigen System überhaupt eine effiziente Reduktion, andere Mischverhältnisse funktionierten nicht. Trotz dieses optimalen Verhältnisses konnte ein rein wässriges CuAAC-Reaktionsgemisch aber nicht bestehen und ist aufgrund der starken Ansäuerung unter Bildung eines Präzipitats zusammengebrochen. Diese Ansäuerung wird auf zwei Protonenquellen zurückgeführt: Erstens konsumiert die Reaktion im Zuge der Oxidation von TCEP ein Molekül Wasser, dessen Protonen in der Metall-katalysierten Variante keinen Akzeptor wie die Schwefelatome in der Disulfidbrücken-Variante finden (siehe Abbildung 4.5). Zweitens wird im Rahmen dieser Arbeit vermutet, dass das Phosphin von TCEP in Lösung auch vor seiner Oxidation stets mit einem Proton assoziiert ist, weil beobachtet wurde, dass sich in Stammlösungen von 100 mM TCEP in Gegenwart von 600 mM der Base eines einprotonigen Puffers ein pH-Wert sehr nahe am pK<sub>s</sub>-Wert des jeweiligen Puffers einstellte (gilt für Tris und MOPS, siehe Tabelle 4.2). Diese Beobachtung bedeutet, dass beim Lösen von 100 mM TCEP 300 mM Protonen frei werden, die dann ihrerseits von der Hälfte der Puffermoleküle gebunden werden; das Ergebnis ist ein (nahezu) idealer Puffer (pH=pK<sub>s</sub>). Kommerziell ist TCEP, welches selbst bereits eine dreiprotonige Säure ist, nur assoziiert mit einem weiteren Molekül HCl verfügbar (siehe Abbildung 3.2 a). Demnach müsste das Lösen von 100 mM TCEP 400 mM Protonen freisetzen. In TCEP selbst hat nur das Phosphin-Zentrum einen pKs-Wert im neutralen Bereich, die drei Carboxylgruppen haben niedrigere Werte (Krezel et al., 2003). Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein weiteres Proton mit TCEP assoziiert bleibt, bis dieses durch die Kupferkatalysierte Oxidation von TCEP frei wird. So würden für die Oxidation jedes TCEP-Moleküls drei

Protonen frei werden (siehe Abbildung 4.5 **b**), die für die im Reaktionscocktail gemessene Ansäuerung verantwortlich sind.

**Tabelle 4.2:** Darstellung von pH-Werten, die im Zuge der Erstellung einiger TCEP-Stammlösungen gemessen wurden. Bei600 mM beider Puffer nähert sich der gemessene pH-Wert dem pKS-Wert an.

Puffer [mM]	TCEP [mM]	pKs bei 25°C	Gemessener pH-Wert		
Tris 400		8,06	7,53		
Tris 600	- 100		8,11		
MOPS 400		7 0	6,72		
MOPS 600		7,18			

Der Hydroxyl-Radikalfänger tert-Butanol war die Komponente, die das CuAAC-Reaktionsgemisch mit TCEP als Reduktionsmittel erst nutzbar machte, indem er – zusammen mit geeigneten Puffern – die pH-abhängige Präzipitation des Kupfer-Liganden-Komplexes (siehe Abbildung 3.2 b) verhinderte. Tert-Butanol neutralisiert ·OH, indem es unter Abspaltung eines Protons selbst das weitaus weniger reaktive tert-butyl-Radikal bildet (von Piechowski *et al.*, 1992). Anschließend wird das tert-butyl-Radikal selbst neutralisiert, indem es ein freies Cu<sup>2+</sup> reduziert (Walling, 1975). Die Beschleunigung der Reduktion von Cu<sup>2+</sup> durch TCEP in Gegenwart von tert-Butanol ist damit vermutlich eine konkurrierende Reduktionsreaktion. Damit erfüllt tert-Butanol eine doppelte Aufgabe, indem es einerseits die Proben vor ·OH schützt und andererseits auch noch einen Mechanismus mitbringt, im Laufe der Reaktionszeit der Disproportionierung von Cu<sup>+</sup> (Hein & Fokin, 2010) durch stetige Regeneration entgegen zu wirken. Da TCEP im Zuge seiner Oxidation verbraucht wird, bestand die Möglichkeit einer Regeneration von Cu<sup>+</sup> sonst nur an den Seitenketten einiger Aminosäuren (P. K. Smith *et al.*, 1985). Dass tert-Butanol als Nebeneffekt den pH-abhängigen Zusammenbruch des Reaktionsgemisches verhinderte, wird als Resultat daraus gesehen, dass es nicht nur die Proteine, sondern auch alle anderen Moleküle wie die Puffer selbst vor ·OH schützte.

Auch die Wahl des Puffers für die CuAAC war von großer Bedeutung, da viele, insbesondere solche mit primären Aminen, Kupfer-Ionen chelieren (Mash *et al.*, 2003). Tris beispielsweise ist nicht nur ein guter Chelator für Cu<sup>2+</sup> (Colombo *et al.*, 1987), sondern generiert in der Anwesenheit des unvermeidlichen ·OH auch Formaldehyd (Shiraishi *et al.*, 1993) und war deswegen für die CuAAC ungeeignet. Der Puffer MOPS interagiert nicht mit Kupfer (Mash *et al.*, 2003), aber auch er störte in hoher Konzentration die CuAAC. Generell mussten Puffer so gering wie möglich konzentriert sein. Mit seinem pK<sub>s</sub> im neutralen Bereich war MOPS niedrig konzentriert nicht in der Lage, der Ansäuerung im Zuge der Reduktion standzuhalten, weshalb noch etwas Base des Puffers CAPSO zugesetzt wurde, für den es bezüglich seiner Interaktion mit Kupfer zwar keine Daten gibt, der aber ein Puffer für den basischen Bereich ist, der ohne ein primäres Amin auskommt.

#### 4.4.2 Seitenreaktionen des Alkins

Die CuAAC ist eine sehr effiziente Reaktion mit breitem Anwendungsspektrum in der biologischen Forschung (Best, 2009), solange ihre beiden funktionalen Gruppen, Azid und Alkin, in hohen und am besten ausgeglichenen Konzentrationen vorliegen. In dieser Arbeit konnte nur die Konzentration der Azid-funktionalisierten Sonde kontrolliert werden und es gab keine Möglichkeit, den Alkin-Einbau (=HPG-Einbau) in Proteine zu quantifizieren. Aus der hohen Sensitivität, die der Nachweis der HPGpositiven Population im Western Blot erforderte, kann abgeleitet werden, dass in jeder Probe letztlich nur eine geringe Anzahl an Alkinen nachgewiesen wurde. Allerdings konnte auch daraus kein Rückschluss auf die HPG-Konzentration gezogen werden, da die Alkine in einem Gemisch komplexer biologischer Moleküle zu unspezifischen Seitenreaktionen tendieren.

Die radikalische Hydrothiolierung eines terminalen Alkins (Thiol-yne-reaction) stellt das größte Risiko für eine Nebenreaktion in biologischen Proben dar, weil sie so schnell und sicher abläuft, dass sie sogar als Schwesterreaktion der CuAAC bezeichnet wird (Lowe, 2014). Dieser Reaktion liegt eine Thiyl-Radikalbildung zugrunde, die sowohl durch Metall-Ionen als auch spontan durch UV-Strahlung induziert werden kann. Die Natur des Metalls beeinflusst die Regio- und Stereoselektivität dieser Reaktion, eine Eigenschaft, die in der synthetischen organischen Chemie geschätzt wird (Dondoni & Marra, 2014). Darüber hinaus hat nicht nur das Metall selbst einen Einfluss auf diese Reaktion, sondern auch das Salz, als welches es im Reaktionsgemisch vorhanden ist. So soll CuSO4 die radikalische Hydrothiolierung verstärken, während sie in Gegenwart von CuBr nicht abläuft (Trostyanskaya & Beletskaya, 2012). Allerdings gibt es noch andere unspezifische Nebenreaktionen und es wurde auch für die CuAAC mit CuBr bereits empfohlen, die Alkine auf einer festen Phase zu fixieren (Tornoe et al., 2002). Eine weitere ist die Alkin-Alkin-Homokopplung (Bock et al., 2006). Bei Verwendung von HPG birgt diese Reaktion die Gefahr von Protein-Aggregationen. Auch eine generelle Reaktivität des aktivierten Alkins (Cu-Acetylid) gegenüber 1,3-Dipolen, nicht nur dem Azid, ist bereits vorgeschlagen worden (Worrell et al., 2013). Außerdem kann ein Alkin im Zuge der Addition eines Hydroxyl-Radikals ein Vinyl-Radikal hervorbringen, das an Cu<sup>2+</sup> zu Acetaldehyd oxidiert wird (Walling, 1975). In diesem Fall wäre eine Reaktion mit primären Aminen eine mögliche Konsequenz. Ein Zufallsfund bei dem Versuch, die Kristallstruktur eines Eisenschwefel-Cluster-Proteins zu messen, hat zu der Entdeckung geführt, dass terminale Alkine an oxidierten [Fe<sub>4</sub>S<sub>4</sub>]-Clustern zu Aldehyden umgesetzt werden können (Span et al., 2012). Daraus leitet sich ab, dass möglicherweise auch noch oxidierte acht-atomige Eisenschwefel-Cluster einen Reaktionspartner für Alkine darstellen könnten. Eine Schutzmaßnahme gegen reaktive Carbonyle könnte der Zusatz einer geringen Menge Aminoguanidin sein (Hong et al., 2009), sofern es kompatibel mit Natriumdodecylsulfat (SDS) ist, da zumindest Guanidin und SDS feste Komplexe miteinander bilden und daher nicht miteinander

kombiniert werden können (Pepinsky, 1991). SDS wird benötigt, um die hydrophoben mitochondrialen Proteine in Lösung zu halten.



Abbildung 4.6: a) Illustration der unspezifischen Seitenreaktion von Alkinen. 1) Unbehandeltes Rohlysat einer mitochondrialen Fraktion wurde mit Alkinfunktionalisierter Biotin-Sonde in der CuAAC umgesetzt. 2) Wie 1), nur dass das Proteinlysat zuvor mit Iodessigsäure alkyliert wurde. Die Alkylierung verhindert die Alkin-Seitenreaktion nicht. Nachweis mit dem Neutravidin-System, Belichtungszeit 1 min. **b**) Einfluss der Azid-Konzentration auf die Effizienz der CuAAC. Aliquots von HeLa-Gesamtzellextrakt (50  $\mu$ M HPG für 28 h) wurden mit 500 µM Biotin-Azid (1) und 2 mM Biotin-Azid (2) in Gegenwart von 3 mM CuSO<sub>4</sub> umgesetzt. Detektion mit Antikörper direkt gegen Biotin, Belichtungszeit 10 min.

Den Beweis, dass Alkine unerwünschten Seitenreaktionen unterlagen, lieferte in dieser Arbeit die CuAAC mit unbehandelten Proteinlysaten und Alkin-funktionalisierten Sonden. Die Erwartung an eine solche Reaktion ist, dass die Sonde nicht bindet. Tatsächlich aber reagierte die Sonde mit einem Großteil der Proteine (siehe Abbildung 4.6 a). Trotz vieler Versuche in dieser Arbeit wurde keine Lösung für dieses Problem gefunden, auch die Alkylierung der Proteine mit Iodessigsäure reichte nicht aus, um die unspezifische Reaktion zu verhindern. Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit nicht mit der Kombination Azidohomoalanin (AHA, siehe Abbildung 1.5) und Alkin-Sonde gearbeitet, sondern ausschließlich mit dem inversen Ansatz HPG und Azid-Sonde. Die beste Möglichkeit, die Ausbeute der CuAAC zu erhöhen, war in dieser Arbeit der Einsatz eines massiven Überschusses von Kupfer und Azid-Sonde, um möglichst wenige unspezifische Seitenreaktionen von HPG zuzulassen (siehe Abbildung 4.6 b). Der Anteil an terminalen Alkinen die dennoch unspezifisch reagierten fiel durch den Einsatz von HPG durch das Raster und interferierte nicht mit der Auswertung eines Experiments, wie fehlgebundene Alkin-Sonden dies taten. Die Konsequenz aus diesem Problem war allerdings, dass die ohnehin geringe Menge an HPG in Zielproteinen dadurch in der CuAAC noch

weiter schrumpfte. Literaturrecherchen zeigen zudem, dass durchaus auch auf die Kombination AHA/Alkin-Sonde gesetzt wird, beispielsweise die Arbeit von Dieterich *et al.* (2006), die diesen Ansatz für den massenspektrometrischen Nachweis cytosolischer Proteinsynthese nutzt. Das Protokoll zu dieser Arbeit ist separat veröffentlicht worden und zeigt, dass die Autoren sehr wenig Alkin-Sonde einsetzen, während sie gleichzeitig viel mehr AHA-haltiges Protein zur Verfügung haben (Dieterich *et al.*, 2007). Das Azid-Alkin-Verhältnis stimmt mit dieser Arbeit tendenziell überein. Ein Unterschied zwischen beiden Arbeiten ist die Kupferquelle, die Autoren verwenden <1 mM CuBr und verzichten auf ein Reduktionsmittel, weshalb die radikalische Hydrothiolierung unterdrückt wird (Trostyanskaya & Beletskaya, 2012). Der Hauptunterschied allerdings ist, dass die Autoren einen anderen Cu<sup>+</sup>-

Liganden verwenden. Dieser ist von großer Bedeutung für die CuAAC, obwohl er keine direkte Rolle in deren katalytischem Zyklus spielt. Vielmehr stabilisiert er Cu<sup>+</sup> und schützt es damit vor molekularem Sauerstoff, was nicht nur dessen Disproportionierung verhindert, sondern auch die Radikalbildung einschränkt (Meldal & Tornoe, 2008). Dieterich *et al.* (2007) nutzen als Liganden TBTA (siehe Abbildung 4.7 **a** und Tabelle 6.3), welches bereits vorher in Zusammenhang mit einer CuAAC auf biologischen Proben Erwähnung gefunden hat (Q. Wang *et al.*, 2003). Einen besonderen Fokus auf den Liganden zu legen, könnte den Erfolg der CuAAC in biologischen Proben deutlich erhöhen.

#### 4.4.3 Der Ligand als Optimierungsansatz

In dieser Arbeit wurde Bicinchoninsäure (BCA, siehe Abbildung 3.2 b) als Ligand verwendet (Christen et al., 2012). In einer frühen Phase wurde zudem auch mit Bathophenanthrolin (Meldal & Tornoe, 2008) experimentiert, welches aber nicht weiter verfolgt wurde, da BCA den Vorteil hatte, dass sein charakteristischer Farbumschlag nach lila (P. K. Smith et al., 1985) leicht als Beurteilungskriterium für die Effizienz der Reduktion von CuSO<sub>4</sub> durch TCEP verwendet werden konnte (siehe Abschnitt 3.1.1). BCA und Bathophenanthrolin sind beides Liganden, die im Überschuss eingesetzt die CuAAC inhibieren (siehe Abbildung 3.4), möglicherweise indem sie Cu<sup>+</sup> so sehr von seiner Umgebung abschirmen, dass es auch keine Intermediate der CuAAC mehr bilden kann (Lewis et al., 2004; Meldal & Tornoe, 2008). Dass BCA - richtig konzentriert - die CuAAC dennoch positiv beeinflusste, wird als dynamisches Gleichgewicht zwischen chelierten und freien Cu<sup>+</sup>-Ionen verstanden, wodurch deren Disproportionierung und Radikalbildung zwar eingeschränkt, aber nicht verhindert wird. Der Befund von Q. Wang et al. (2003), dass Liganden wie TBTA aus der Klasse der Tris (triazolylmethyl)amine die Cu<sup>2+</sup>-mediierte Alkin-Homokopplung inhibieren, zeigt, dass die Alkin-Seitenreaktionen wohl über die Wahl des Liganden gesteuert werden können. BCA zu ersetzen könnte deswegen den CuAAC-Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese entscheidend verbessern, weil dadurch unspezifische Seitenreaktionen verhindert und die Ausbeute der CuAAC deutlich erhöht würden. Vielversprechende Alternativen zu BCA sind zahlreiche Derivate von Liganden aus der Klasse der Tris (triazolylmethyl)amine: Neben TBTA (Q. Wang et al., 2003) sind auch THPTA (Hong et al., 2009) sowie BTTES und BTTAA (Besanceney-Webler et al., 2011) für den Einsatz mit Biomolekülen empfohlen worden. TBTA ist ein sehr hydrophobes Molekül, was seine Einsatzmöglichkeiten in wässrigen Reaktionen stark einschränkt. THPTA ist löslicher und BTTES und BTTAA erhöhen zudem die Reaktionseffizienz deutlich. Sowohl mit BTTES als auch mit BTTAA soll die CuAAC in beiden Richtungen, d.h. sowohl mit Azid- als auch mit Alkin-funktionalisierten Sonden ablaufen (Besanceney-Webler et al., 2011). Der Grund für die Eignung dieser Liganden für die CuAAC könnte in der Tatsache liegen, dass sie auch im Überschuss über Kupfer eingesetzt die CuAAC nicht inhibieren. Deren Chelierung schützt Cu<sup>+</sup> scheinbar vor molekularem Sauerstoff, schränkt aber nicht seine katalytische Aktivität in

der CuAAC ein. Eine Übersicht der Strukturformeln dieser Liganden bietet Abbildung 4.7, ihre vollständigen Namen sind in Tabelle 6.3 im Anhang aufgelistet.



Abbildung 4.7: a) Das Grundgerüst Tris (triazolylmethyl)amin mit den möglichen Modifikationsstellen angegeben als R<sub>1</sub>-R<sub>3</sub>.
b) Modifikationen von TBTA c) Modifikationen von THPTA d) Modifikationen von BTTES. e) Modifikationen von BTTAA. Die vollständigen Namen der Moleküle sind in Tabelle 6.3 im Anhang aufgelistet.

Eine weitere Klasse von Liganden könnten Tris(2-benzimidazolylmethyl)amine sein. Die Erstveröffentlichung präsentiert eine große Auswahl an Derivaten und nennt eines, genannt (BimC<sub>4</sub>A)<sub>3</sub>, als geeignetsten Kandidaten für die CuAAC (Rodionov *et al.*, 2007). Auch dieser Ligand inhibiert im Überschuss nicht die CuAAC, ist wasserlöslich und erhöht die Reaktionseffizienz deutlich.



**Abbildung 4.8:** Strukturformel des Tris (2-benzimidazolylmethyl)amin-Derivats  $(BimC_4A)_3$  nach Rodionov *et al.* (2007).

Allerdings verfügen sowohl dieser Ligand, als auch das oben genannte BTTAA, wie BCA über Carboxylgruppen (vergleiche Abbildung 3.2 **b** mit Abbildung 4.7 **e** und Abbildung 4.8), womit auch diese Liganden wie BCA potentiell pH-abhängig sein könnten.

Zusammengefasst gibt es eine Vielzahl an Liganden, angefangen mit denen der Klasse der Tris (triazolylmethyl)amine, deren Erprobung in der CuAAC äußerst vielversprechend erscheinen. In Abschnitt 4.2 wurde der negative Einfluss der Chloroform-Methanol-Fällung auf den Umgang mit mitochondrial translatierten Proteinen

diskutiert, die aufgrund des hier eingesetzten Liganden Bicinchoninsäure verwendet wurde. Ein Austausch des Liganden könnte folglich auch die Anwendung einer alternativen Fällungsmethode vereinfachen. Zusammen könnten diese beiden Optimierungsvorschläge den Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese *in vitro* erheblich verbessern. Darüber hinaus würde ein besser geeigneter Ligand auch für die Fluoreszenzfärbung in intakten Zellen weitere Möglichkeiten eröffnen:

Denkbar wären dann Experimente mit Pulsen beider nicht-kanonischer Aminosäuren HPG und AHA, oder eine Kombination aus dem Alkin-funktionalisiertem Nukleotid EdU und der Aminosäure AHA, die zwei dynamische Prozesse gleichzeitig abbilden könnten.

#### 4.5 Ausblick: Anwendung in der Fluoreszenzmikroskopie

Der Einbau der nicht-kanonischen Aminosäure HPG in mitochondrial codierte Proteine wurde nicht nur mit proteinbiochemischen Methoden, sondern auch mit bildgebenden Verfahren gezeigt. Zellen, die in Gegenwart des Translationsinhibitors Cycloheximid mit HPG inkubiert wurden, zeigten nach anschließender CuAAC mit einem Azid-funktionalisierten Fluoreszenzfarbstoff eine klare Färbung des mitochondrialen Netzwerkes. Hochauflösende Aufnahmen ganzer Zellen zeigten, dass das Fluoreszenzsignal entlang der Mitochondrien nicht homogen verteilt ist. Es lassen sich entlang tubulärer Mitochondrien Abschnitte ausmachen, die intensiver gefärbt sind als ihre Umgebung. Dieser Eindruck wird auch von Maximalprojektionen konfokaler z-Stapel bestätigt, womit gezeigt wird, dass es sich bei diesen Foki nicht um bloße Verschiebungen der Mitochondrien entlang der optischen Achse handelt.

Die Proteinsynthese-Färbung gewährt eine Momentaufnahme des dynamischen Prozesses der Translation. Für zukünftige Arbeiten ist es daher interessant, die Markierung der mitochondrialen Proteinsynthese für eine Korrelation mit der Färbung anderer dynamischer Prozesse zu nutzen. Die Replikation der DNA, auch der mitochondrialen, kann mit den Nukleotiden Bromodesoxyuridin (BrdU), oder 5-ethynyl-2'-Deoxyuridin (EdU) untersucht werden (Calkins & Reddy, 2011; Salic & Mitchison, 2008). Die Transkription hingegen kann mit 5-Bromouridin (BrU) oder 5-ethynyluridine (EU) markiert werden (Jao & Salic, 2008; Petruk et al., 2016). BrdU und BrU werden jeweils mit Antikörpern dekoriert und nachgewiesen, EdU und EU per CuAAC mit Azid-funktionalisierter Sonde. Zusammen mit alternativen Liganden für die CuAAC (siehe Abschnitt 4.4.3) könnten beispielsweise die Translation über die nicht-kanonische Aminosäure AHA (siehe Abbildung 1.5) und die Transkription über das künstliche Nukleotid EU markiert und simultan aufgenommen werden. Alternativ könnte unter differentiellem Einsatz der reversiblen Translationsinhibitoren in Kombination mit HPG und AHA eine cytosolisch synthetisierte Proteinpopulation gegen eine mitochondriale betrachtet werden. Der simultane Einsatz von AHA und HPG in der Fluoreszenzmikroskopie ist bereits berichtet worden, die Autoren berichten aber selbst von den Problemen, die auch in dieser Arbeit bezüglich der Reaktivität der Alkine beobachtet wurde (Beatty & Tirrell, 2008). Die Autoren bemerken, dass die unspezifische Reaktivität des Alkins auch von der übrigen Beschaffenheit der Sonde abzuhängen scheint, da sie mit einer von drei getesteten Alkin-Sonden dieselben Probleme hatten wie alle Alkin-Sonden, die in dieser Arbeit getestet wurden. Dies steht im Kontrast zu einem anderen Bericht, nach dem die molekulare Struktur einer Sonde keinen Einfluss auf die Reaktivität von Azid und Alkin hat (Hein & Fokin, 2010).

94

Dass Beatty und Tirrell (2008) überhaupt eine erfolgreiche CuAAC mit einer Alkin-Sonde zustande brachten, kann vermutlich mit dem Einsatz des CuAAC-Liganden TBTA aus der Klasse der Tris (triazolylmethyl)amine (siehe Abbildung 4.7 b) erklärt werden: Obwohl dieser zehnfach geringer konzentriert eingesetzt wurde als Kupfersulfat, kann von einer sehr geringen Konzentration von Cu<sup>+</sup> in der CuAAC ausgegangen werden, weil die Autoren als Reduktionsmittel TCEP im ungünstigen Verhältnis von 1:1 zu Kupfersulfat nutzen. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Reduktion von Kupfersulfat durch TCEP nur im Verhältnis 2 Cu: 1 TCEP effizient stattfindet. Dass Liganden aus der Klasse der Tris (triazolylmethyl)amine die CuAAC in biologischen Proben durch Abschirmung von Cu<sup>+</sup> spezifischer machen, spiegelt sich auch in dem Bericht wieder, dass das Derivat THPTA (siehe Abbildung 4.7 c) im Überschuss über Kupfer eingesetzt sogar die CuAAC-Markierung auf der Zelloberfläche lebender Zellen ermöglicht (Hong et al., 2010). Um allerdings mehrere Kanäle, von denen einer auf der CuAAC basiert, parallel hochauflösend messen zu können, muss die Helligkeit beider Kanäle angeglichen werden. Die direkte CuAAC-Markierung koppelt jedes HPG mit nur einem Farbstoffmolekül, was die Färbung deutlich dunkler macht als eine indirekte Immunfluoreszenz, in der jeder Sekundärantikörper zahlreiche Farbstoffmoleküle trägt. Da die Spektren der STED-Farbstoffe nahe beieinanderliegen (siehe Tabelle 2.4) kommt es unvermeidlich zu einer Kreuzanregung (crosstalk) beider Farbstoffe, wodurch beide Kanäle im Falle einer großen Helligkeitsdifferenz nicht mehr voneinander getrennt werden können. Die Helligkeit der CuAAC-Färbung zu steigern und einer Antikörperfärbung anzugleichen ist deswegen Voraussetzung für hochauflösende Mehrkanalfärbungen. Zusätzlich hat die Helligkeit auch einen Einfluss auf die physiologische Aussage, die mit der Färbung getroffen werden kann: Je heller die Färbung, desto kürzer kann der Inkubationszeitraum mit einer nicht-kanonischen Aminosäure ausfallen und desto präziser kann der Ort der Insertion der mitochondrial translatierten Proteine in die innere mitochondriale Membran bestimmt werden. In zukünftigen Arbeiten könnte die Entwicklung Azid-funktionalisierter Sonden die mehr als ein Fluorophor tragen, eine gute Möglichkeit darstellen, die Helligkeit der CuAAC-Färbung zu steigern. In dieser Arbeit jedoch wurde das Problem umgangen, indem zunächst die CuAAC mit einer Alexa488-azid-Sonde durchgeführt wurde und diese anschließend mit klassischer indirekter Immunfluoreszenz detektiert wurde. Mit diesem Protokoll war es möglich, mit HPG-Pulsen von nur 15 min Länge das mitochondriale Netzwerk anzufärben (siehe Abbildung 3.19). Allerdings zeigte die Methode einigen Hintergrund im Cytosol, der nicht durch eine Anpassung von Salzgehalt, pH-Wert oder Detergenzien verhindert werden konnte. In Kontrollexperimenten wurde zudem gezeigt, dass der Antikörper gegen Alexa488 allein keinen derartigen Hintergrund verursachte, sondern dieser von cytosolischen Rückständen der Azid-Sonde stammte. Es ist daher denkbar, dass dieser Hintergrund cytosolische HPG-Rückstände zeigt und dass der CuAAC-Nachweis letztlich verlässlich funktioniert. In

dieser Arbeit wurde die Inhibierung der cyctosolischen Proteinsynthese im Normalfall mit 50 µg/ml Cycloheximid durchgeführt. Verglichen mit anderen Studien ist dies eher wenig. Naheliegende Verbesserungsvorschläge sind daher der Einsatz anderer Syntheseinhibitoren wie Emetin und Anisomycin (Beatty & Tirrell, 2008; Dieterich et al., 2006), generell mehr Inhibitor einzusetzen (siehe Tabelle 4.1), oder auch mehrere Gifte zu kombinieren (Roberti et al., 2006). Das alles kann aber nichts gegen das Risiko ausrichten, dass cytosolisches HPG möglicherweise nicht in Proteinen, sondern im Komplex mit der cytosolischen methionyl-tRNA-Synthetase nachgewiesen wird, da die Syntheseinhibitoren zwar die Ribosomen hemmen, nicht aber die Beladung der t-RNA-Synthethase. Eine mögliche Lösung ist das Färbeprotokoll um eine Absättigung cytosolischer HPG-Reste zu erweitern. Dies könnte experimentell umgesetzt werden, indem Zellen nach der Fixierung mit Formaldehyd zunächst nur mit dem milden Detergenz Saponin inkubiert werden, das selektiv Cholesterol aus Membranen extrahiert und Mitochondrien aufgrund ihres geringen Cholesterol-Gehalts nicht permeabilisiert (Ofengand & Bakin, 1997). Der selektiven Permeabilisierung der Cytoplasmamembran könnte eine CuAAC mit einer Azid-funktionalisierten, nicht-fluoreszenten Sonde, zum Beispiel AHA, folgen. Nach gründlichem Waschen könnten anschließend die Mitochondrien durch Extraktion mit stärkeren Detergenzien wie Triton X100 zugänglich gemacht werden und die CuAAC mit der Azid-Fluoreszenzsonde könnte durchgeführt werden. Soll dieser Ansatz nicht nur mit gesunden primären Zellen, sondern auch auf einer Krebszelllinie eingesetzt werden, muss allerdings bedacht werden, dass einige Krankheitsbilder, darunter auch Krebs, mit einer Akkumulation von Cholesterol in der inneren mitochondrialen Membran assoziiert werden, was die differentielle Permeabilisierung erschweren könnte (Ribas, Garcia-Ruiz, & Fernandez-Checa, 2016). Eine weitere Alternative könnte sein, neben den cytosolischen Ribosomen auch die methionyl-tRNA-Synthetase zu inhibieren. Zu derartigen Inhibitoren gibt es viele Forschungsberichte, da tRNA-

Synthetasen einen strategischen Ansatz gegen parasitäre Mikroorganismen darstellen (Hurdle, O'Neill, & Chopra, 2005).

Sowohl mit konfokaler als auch mit hochauflösender STED-Mikroskopie wurde gezeigt, dass sich die mitochondriale Translation durch Einsatz nicht-kanonischer Aminosäuren *in situ* studieren lässt. Weitere Optimierungen werden es zudem erlauben, diese Untersuchungen auf Doppelfärbungen mit Zweitstrukturen auszuweiten, sei dies ein spezifisches Protein oder ein anderer dynamischer Prozess. Diese Arbeit legt die Grundlage für eine Analyse der räumlichen Verteilung der mitochondrialen Translation in der inneren mitochondrialen Membran.

96

# 5 Literatur

- Agard, N. J., Baskin, J. M., Prescher, J. A., Lo, A., & Bertozzi, C. R. (2006). A comparative study of bioorthogonal reactions with azides. *Acs Chemical Biology*, 1(10), 644-648.
- Allen, G., & Campbell, R. O. (1996). Specific cleavage of histidine-containing peptides by copper(II). International Journal of Peptide and Protein Research, 48(3), 265-273.
- Alzahrani, E., & Welham, K. (2014). Fabrication of a TCEP-immobilised monolithic silica microchip for reduction of disulphide bonds in proteins. *Analytical Methods, 6*(2), 558-568.
- Amunts, A., Brown, A., Toots, J., Scheres, S. H. W., & Ramakrishnan, V. (2015). The structure of the human mitochondrial ribosome. *Science*, *348*(6230), 95-98.
- Anderegg, G., Hubmann, E., Podder, N. G., & Wenk, F. (1977). Pyridine-Derivatives as Complexing Agents .11. Thermodynamics of Metal-Complex Formation with Bis[(2-Pyridyl)Methyl]-Amine, Tris[(2-Pyridyl)Methyl]-Amine and Tetrakis[(2-Pyridyl)Methyl]-Amine. *Helvetica Chimica Acta*, 60(1), 123-140.
- Andersen, G. R., Thirup, S., Spremulli, L. L., & Nyborg, J. (2000). High resolution crystal structure of bovine mitochondrial EF-Tu in complex with GDP. *J Mol Biol, 297*(2), 421-436.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., Debruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature*, 290(5806), 457-465.
- Antonicka, H., Choquet, K., Lin, Z. Y., Gingras, A. C., Kleinman, C. L., & Shoubridge, E. A. (2017). A pseudouridine synthase module is essential for mitochondrial protein synthesis and cell viability. *EMBO Rep, 18*(1), 28-38.
- Antonicka, H., Sasarman, F., Nishimura, T., Paupe, V., & Shoubridge, E. A. (2013). The Mitochondrial RNA-Binding Protein GRSF1 Localizes to RNA Granules and Is Required for Posttranscriptional Mitochondrial Gene Expression. *Cell Metabolism*, *17*(3), 386-398.
- Antonicka, H., & Shoubridge, E. A. (2015). Mitochondrial RNA Granules Are Centers for Posttranscriptional RNA Processing and Ribosome Biogenesis. *Cell Reports*, *10*(6), 920-932.
- Appel, W. (1986). Chymotrypsin: molecular and catalytic properties. *Clin Biochem, 19*(6), 317-322.
- Askonas, B. A., Campbell, P. N., Godin, C., & Work, T. S. (1955). Biosynthesis of proteins. 3. Precursors in the synthesis of casein and beta-lactoglobulin. *Biochemical Journal*, *61*(1), 105-115.
- Atamna, H. (2004). Heme, iron, and the mitochondrial decay of ageing. *Ageing Research Reviews, 3*(3), 303-318.
- Baer, R. J., & Dubin, D. T. (1981). Methylated Regions of Hamster Mitochondrial Ribosomal-Rna -Structural and Functional Correlates. *Nucleic Acids Research*, 9(2), 323-337.
- Barrell, B. G., Bankier, A. T., & Drouin, J. (1979). A different genetic code in human mitochondria. *Nature, 282*(5735), 189-194.
- Bayer, E. A., Demeester, F., Kulik, T., & Wilchek, M. (1995). Preparation of Deglycosylated Egg-White Avidin. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 53(1), 1-9.
- Bayer, E. A., & Wilchek, M. (1990). Application of Avidin Biotin Technology to Affinity-Based Separations. *Journal of Chromatography*, *510*, 3-11.
- Beatty, K. E., & Tirrell, D. A. (2008). Two-color labeling of temporally defined protein populations in mammalian cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 18*(22), 5995-5999.
- Beelman, C. A., & Parker, R. (1995). Degradation of mRNA in eukaryotes. Cell, 81(2), 179-183.
- Beringer, M., & Rodnina, M. V. (2007). The ribosomal peptidyl transferase. *Molecular Cell, 26*(3), 311-321.
- Besanceney-Webler, C., Jiang, H., Zheng, T. Q., Feng, L., del Amo, D. S., Wang, W., Klivansky, L. M., Marlow, F. L., Liu, Y., & Wu, P. (2011). Increasing the Efficacy of Bioorthogonal Click Reactions for Bioconjugation: A Comparative Study. *Angewandte Chemie-International Edition*, 50(35), 8051-8056.
- Best, M. D. (2009). Click Chemistry and Bioorthogonal Reactions: Unprecedented Selectivity in the Labeling of Biological Molecules. *Biochemistry*, *48*(28), 6571-6584.

- Betat, H., Mede, T., Tretbar, S., Steiner, L., Stadler, P. F., Morl, M., & Prohaska, S. J. (2015). The ancestor of modern Holozoa acquired the CCA-adding enzyme from Alphaproteobacteria by horizontal gene transfer. *Nucleic Acids Research*, *43*(14), 6739-6746.
- Bhargava, K., Templeton, P., & Spremulli, L. L. (2004). Expression and characterization of isoform 1 of human mitochondrial elongation factor G. *Protein Expression and Purification*, *37*(2), 368-376.
- Bilbille, Y., Gustilo, E. M., Harris, K. A., Jones, C. N., Lusic, H., Kaiser, R. J., Delano, M. O., Spremulli, L. L., Deiters, A., & Agris, P. F. (2011). The Human Mitochondrial tRNA(Met): Structure/Function Relationship of a Unique Modification in the Decoding of Unconventional Codons. *Journal of Molecular Biology*, 406(2), 257-274.
- Bock, V. D., Hiemstra, H., & van Maarseveen, J. H. (2006). Cu-I-catalyzed alkyne-azide "click" cycloadditions from a mechanistic and synthetic perspective. *European Journal of Organic Chemistry*(1), 51-68.
- Bogenhagen, D. F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, 1819(9-10), 914-920.
- Bonawitz, N. D., Clayton, D. A., & Shadel, G. S. (2006). Initiation and beyond: multiple functions of the human mitochondrial transcription machinery. *Mol Cell, 24*(6), 813-825.
- Borst, P. (1972). Mitochondrial Nucleic-Acids. Annual Review of Biochemistry, 41, 333-&.
- Bourens, M., & Barrientos, A. (2017). A CMC1-knockout reveals translation-independent control of human mitochondrial complex IV biogenesis. *EMBO Rep, 18*(3), 477-494.
- Bourgeron, T., Chretien, D., Rotig, A., Munnich, A., & Rustin, P. (1992). Isolation and characterization of mitochondria from human B lymphoblastoid cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, *186*(1), 16-23.
- Boyot, P., Trifilieff, E., Vandorsselaer, A., & Luu, B. (1988). Purification and Characterization of Low-Molecular-Weight Beef-Heart Proteolipids - Use of Fast Atom Bombardment Mass-Spectrometry for Identification. *Analytical Biochemistry*, 173(1), 75-85.
- Brown, A., Amunts, A., Bai, X. C., Sugimoto, Y., Edwards, P. C., Murshudov, G., Scheres, S. H. W., & Ramakrishnan, V. (2014). Structure of the large ribosomal subunit from human mitochondria. *Science*, *346*(6210), 718-722.
- Brown, R. E., Jarvis, K. L., & Hyland, K. J. (1989). Protein Measurement Using Bicinchoninic Acid -Elimination of Interfering Substances. *Analytical Biochemistry*, *180*(1), 136-139.
- Brule, H., Holmes, W. M., Keith, G., Giege, R., & Florentz, C. (1998). Effect of a mutation in the anticodon of human mitochondrial tRNA(Pro) on its post-transcriptional modification pattern. *Nucleic Acids Research*, 26(2), 537-543.
- Brzezniak, L. K., Bijata, M., Szczesny, R. J., & Stepien, P. P. (2011). Involvement of human ELAC2 gene product in 3 ' end processing of mitochondrial tRNAs. *Rna Biology*, *8*(4), 616-626.
- Burns, J. A., Butler, J. C., Moran, J., & Whitesides, G. M. (1991). Selective Reduction of Disulfides by Tris(2-Carboxyethyl)Phosphine. *Journal of Organic Chemistry*, *56*(8), 2648-2650.
- Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E., & Bluggel, M. (1999). Evidence for a coppercoordinated histidine-tyrosine cross-link in the active site of cytochrome oxidase. *Protein Science*, 8(5), 985-990.
- Cai, J. Y., Yang, J., & Jones, D. P. (1998). Mitochondrial control of apoptosis: the role of cytochrome c. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1366(1-2), 139-149.
- Calkins, M. J., & Reddy, P. H. (2011). Assessment of newly synthesized mitochondrial DNA using BrdU labeling in primary neurons from Alzheimer's disease mice: Implications for impaired mitochondrial biogenesis and synaptic damage. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Basis of Disease, 1812*(9), 1182-1189.
- Camara, Y., Asin-Cayuela, J., Park, C. B., Metodiev, M. B., Shi, Y. H., Ruzzenente, B., Kukat, C., Habermann, B., Wibom, R., Hultenby, K., Franz, T., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Hallberg, B. M., Gustafsson, C. M., & Larsson, N. G. (2011). MTERF4 Regulates Translation by Targeting the Methyltransferase NSUN4 to the Mammalian Mitochondrial Ribosome. *Cell Metabolism*, 13(5), 527-539.

- Campbell, C. T., Kolesar, J. E., & Kaufman, B. A. (2012). Mitochondrial transcription factor A regulates mitochondrial transcription initiation, DNA packaging, and genome copy number. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms*, *1819*(9-10), 921-929.
- Cao, B. M., Zheng, Y. D., Xi, T. F., Zhang, C. C., Song, W. H., Burugapalli, K., Yang, H., & Ma, Y. X. (2012). Concentration-dependent cytotoxicity of copper ions on mouse fibroblasts in vitro: effects of copper ion release from TCu380A vs TCu220C intra-uterine devices. *Biomedical Microdevices*, 14(4), 709-720.
- Carroll, J., Fearnley, I. M., Shannon, R. J., Hirst, J., & Walker, J. E. (2003). Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria. *Mol Cell Proteomics*, 2(2), 117-126.
- Cederbaum, A. I., Qureshi, A., & Cohen, G. (1983). Production of Formaldehyde and Acetone by Hydroxyl-Radical Generating Systems during the Metabolism of Tertiary Butyl Alcohol. *Biochemical Pharmacology*, 32(23), 3517-3524.
- Chen, H. W., Rainey, R. N., Balatoni, C. E., Dawson, D. W., Troke, J. J., Wasiak, S., Hong, J. S., McBride, H. M., Koehler, C. M., Teitell, M. A., & French, S. W. (2006). Mammalian polynucleotide phosphorylase is an intermembrane space RNase that maintains mitochondrial homeostasis. *Molecular and Cellular Biology*, 26(22), 8475-8487.
- Chomyn, A. (1996). In vivo labeling and analysis of human mitochondrial translation products. *Methods Enzymol, 264,* 197-211.
- Christen, E. H., Gubeli, R. J., Kaufmann, B., Merkel, L., Schoenmakers, R., Budisa, N., Fussenegger, M., Weber, W., & Wiltschi, B. (2012). Evaluation of bicinchoninic acid as a ligand for copper(I)catalyzed azide-alkyne bioconjugations. *Organic & Biomolecular Chemistry*, 10(33), 6629-6632.
- Christian, B. E., & Spremulli, L. L. (2010). Preferential Selection of the 5 '-Terminal Start Codon on Leaderless mRNAs by Mammalian Mitochondrial Ribosomes. *Journal of Biological Chemistry*, 285(36), 28379-28386.
- Christian, B. E., & Spremulli, L. L. (2012). Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Gene Regulatory Mechanisms, 1819*(9-10), 1035-1054.
- Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., Pajak, A., & Lightowlers, R. N. (2011). Termination of Protein Synthesis in Mammalian Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry, 286*(40), 34479-34485.
- Cole, R. D., Stein, W. H., & Moore, S. (1958). On the cysteine content of human hemoglobin. *Journal* of Biological Chemistry, 233(6), 1359-1363.
- Colombo, M. F., Austrilino, L., Nascimento, O. R., Castellano, E. E., & Tabak, M. (1987). On the Interaction of Copper with Tris(Hydroxymethyl)Aminomethane. *Canadian Journal of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, 65(4), 821-826.
- Costantino, P., & Attardi, G. (1977). Metabolic properties of the products of mitochondrial protein synthesis in HeLa cells. *Journal of Biological Chemistry*, *252*(5), 1702-1711.
- Cox, J., & Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nature Biotechnology*, 26(12), 1367-1372.
- Crestfield, A. M., Moore, S., & Stein, W. H. (1963). Alkylation and Identification of Histidine Residues at Active Site of Ribonuclease. *Journal of Biological Chemistry*, 238(7), 2413-&.
- Daga, A., Micol, V., Hess, D., Aebersold, R., & Attardi, G. (1993). Molecular Characterization of the Transcription Termination Factor from Human Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8123-8130.
- Dalluge, J. J., Hashizume, T., Sopchik, A. E., McCloskey, J. A., & Davis, D. R. (1996). Conformational flexibility in RNA: The role of dihydrouridine. *Nucleic Acids Research*, *24*(6), 1073-1079.
- Davies, K. J. A. (1987). Protein Damage and Degradation by Oxygen Radicals .1. General-Aspects. *Journal of Biological Chemistry*, 262(20), 9895-9901.

- Davis, B. J. (1964). Disc Electrophoresis. Ii. Method and Application to Human Serum Proteins. *Ann N Y Acad Sci, 121*, 404-427.
- de la Sierra-Gallay, I. L., Pellegrini, O., & Condon, C. (2005). Structural basis for substrate binding, cleavage and allostery in the tRNA maturase RNase Z. *Nature*, *433*(7026), 657-661.
- Decatur, W. A., & Fournier, M. J. (2002). rRNA modifications and ribosome function. *Trends in Biochemical Sciences*, 27(7), 344-351.
- Dennerlein, S., & Rehling, P. (2015). Human mitochondrial COX1 assembly into cytochrome c oxidase at a glance. *Journal of Cell Science*, 128(5), 833-837.
- Diamandis, E. P., & Christopoulos, T. K. (1991). The Biotin (Strept)Avidin System Principles and Applications in Biotechnology. *Clinical Chemistry*, *37*(5), 625-636.
- Dieterich, D. C., Hodas, J. J. L., Gouzer, G., Shadrin, I. Y., Ngo, J. T., Triller, A., Tirrell, D. A., & Schuman,
   E. M. (2010). In situ visualization and dynamics of newly synthesized proteins in rat hippocampal neurons. *Nature Neuroscience*, *13*(7), 897-U149.
- Dieterich, D. C., Lee, J. J., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A., & Schuman, E. M. (2007). Labeling, detection and identification of newly synthesized proteomes with bioorthogonal non-canonical amino-acid tagging. *Nature Protocols*, *2*(3), 532-540.
- Dieterich, D. C., Link, A. J., Graumann, J., Tirrell, D. A., & Schuman, E. M. (2006). Selective identification of newly synthesized proteins in mammalian cells using bioorthogonal noncanonical amino acid tagging (BONCAT). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(25), 9482-9487.
- Dinman, J. D. (2005). 5S rRNA: Structure and Function from Head to Toe. Int J Biomed Sci, 1(1), 2-7.
- Dondoni, A., & Marra, A. (2014). Metal-Catalyzed and Metal-Free Alkyne Hydrothiolation: Synthetic Aspects and Application Trends. *European Journal of Organic Chemistry*(19), 3955-3969.
- Drexler, H. G., & Uphoff, C. C. (2002). Mycoplasma contamination of cell cultures: Incidence, sources, effects, detection, elimination, prevention. *Cytotechnology*, *39*(2), 75-90.
- Dubin, D. T., & Taylor, R. H. (1978). Modification of mitochondrial ribosomal RNA from hamster cells: the presence of GmG and late-methylated UmGmU in the large subunit (17S) RNA. *J Mol Biol*, 121(4), 523-540.
- Dyballa, N., & Metzger, S. (2009). Fast and sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteins in polyacrylamide gels. *J Vis Exp*(30).
- Falkenberg, M., Gaspari, M., Rantanen, A., Trifunovic, A., Larsson, N. G., & Gustafsson, C. M. (2002). Mitochondrial transcription factors B1 and B2 activate transcription of human mtDNA. *Nature Genetics*, 31(3), 289-294.
- Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (1986). Two overlapping genes in bovine mitochondrial DNA encode membrane components of ATP synthase. *Embo Journal*, *5*(8), 2003-2008.
- Fearnley, I. M., & Walker, J. E. (1987). Initiation codons in mammalian mitochondria: differences in genetic code in the organelle. *Biochemistry*, *26*(25), 8247-8251.
- FernandezSilva, P., MartinezAzorin, F., Micol, V., & Attardi, G. (1997). The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *Embo Journal*, 16(5), 1066-1079.
- Ferrari, V. (1984). Salient features of thiamphenicol: review of clinical pharmacokinetics and toxicity. *Sex Transm Dis,* 11(4 Suppl), 336-339.
- Festa, R. A., & Thiele, D. J. (2011). Copper: An essential metal in biology. *Current Biology, 21*(21), R877-R883.
- Finn, F. M., Titus, G., & Hofmann, K. (1984). Ligands for Insulin-Receptor Isolation. *Biochemistry*, 23(12), 2554-2558.
- Folch, J., & Lees, M. (1951). Proteolipides, a New Type of Tissue Lipoproteins Their Isolation from Brain. *Journal of Biological Chemistry*, 191(2), 807-817.

- Fornuskova, D., Stiburek, L., Wenchich, L., Vinsova, K., Hansikova, H., & Zeman, J. (2010). Novel insights into the assembly and function of human nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits 4, 5a, 6a, 7a and 7b. *Biochemical Journal, 428*, 363-374.
- Frey, T. G., & Mannella, C. A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(7), 319-324.
- Friedman, D. B., Hoving, S., & Westermeier, R. (2009). Isoelectric Focusing and Two-Dimensional Gel Electrophoresis. *Guide to Protein Purification, Second Edition, 463*, 515-540.
- Gagliardi, D., & Leaver, C. J. (1999). Polyadenylation accelerates the degradation of the mitochondrial mRNA associated with cytoplasmic male sterility in sunflower. *Embo Journal, 18*(13), 3757-3766.
- Gagliardi, D., Stepien, P. P., Temperley, R. J., Lightowlers, R. N., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A. (2004). Messenger RNA stability in mitochondria: different means to an end. *Trends in Genetics*, *20*(6), 260-267.
- Garrigos, M., Deschamps, S., Viel, A., Lund, S., Champeil, P., Moller, J. V., & Lemaire, M. (1991). Detection of Ca2+-Binding Proteins by Electrophoretic Migration in the Presence of Ca2+ Combined with Ca-45(2+) Overlay of Protein Blots. *Analytical Biochemistry*, 194(1), 82-88.
- Gaur, R., Grasso, D., Datta, P. P., Krishna, P. D. V., Das, G., Spencer, A., Agrawal, R. K., Spremulli, L., & Varshney, U. (2008). A single mammalian mitochondrial translation initiation factor functionally replaces two bacterial factors. *Molecular Cell*, 29(2), 180-190.
- Ge, J. H., & Yu, Y. T. (2013). RNA pseudouridylation: new insights into an old modification. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(4), 210-218.
- Gelfand, R., & Attardi, G. (1981). Synthesis and Turnover of Mitochondrial Ribonucleic-Acid in Hela-Cells - the Mature Ribosomal and Messenger Ribonucleic-Acid Species Are Metabolically Unstable. *Molecular and Cellular Biology*, 1(6), 497-511.
- Giansanti, P., Tsiatsiani, L., Low, T. Y., & Heck, A. J. R. (2016). Six alternative proteases for mass spectrometry-based proteomics beyond trypsin. *Nature Protocols*, *11*(5), 993-1006.
- Goldstein, S., & Czapski, G. (1984). Mannitol as an Oh Scavenger in Aqueous-Solutions and in Biological-Systems. *International Journal of Radiation Biology*, *46*(6), 725-729.
- Good, N. E., & Izawa, S. (1972). Hydrogen ion buffers. *Methods Enzymol, 24*, 53-68.
- Greber, B. J., Boehringer, D., Leibundgut, M., Bieri, P., Leitner, A., Schmitz, N., Aebersold, R., & Ban, N.
   (2014). The complete structure of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*, *515*(7526), 283-U326.
- Greber, B. J., Boehringer, D., Leitner, A., Bieri, P., Voigts-Hoffmann, F., Erzberger, J. P., Leibundgut, M., Aebersold, R., & Ban, N. (2014). Architecture of the large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. *Nature*, *505*(7484), 515-+.
- Grollman, A. P. (1968). Inhibitors of Protein Biosynthesis .V. Effects of Emetine on Protein and Nucleic Acid Biosynthesis in Hela Cells. *Journal of Biological Chemistry*, 243(15), 4089-&.
- Gruschke, S., Rompler, K., Hildenbeutel, M., Kehrein, K., Kuhl, I., Bonnefoy, N., & Ott, M. (2012). The Cbp3-Cbp6 complex coordinates cytochrome b synthesis with bc(1) complex assembly in yeast mitochondria. *Journal of Cell Biology*, *199*(1), 137-150.
- Guerrier-Takada, C., Gardiner, K., Marsh, T., Pace, N., & Altman, S. (1983). The Rna Moiety of Ribonuclease-P Is the Catalytic Subunit of the Enzyme. *Cell*, *35*(3), 849-857.
- Gundlach, H. G., Stein, W. H., & Moore, S. (1959). Nature of the Amino Acid Residues Involved in the Inactivation of Ribonuclease by Iodoacetate. *Journal of Biological Chemistry*, 234(7), 1754-1760.
- Gurd, F. R. N. (1967). [62] Carboxymethylation. Methods Enzymol, 11, 532-541.
- Gustafsson, C. M., Falkenberg, M., & Larsson, N. G. (2016). Maintenance and Expression of Mammalian Mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry, Vol 85, 85*, 133-160.
- Haque, M. E., Elmore, K. B., Tripathy, A., Koc, H., Koc, E. C., & Spremulli, L. L. (2010). Properties of the C-terminal Tail of Human Mitochondrial Inner Membrane Protein Oxa1L and Its Interactions

with Mammalian Mitochondrial Ribosomes. *Journal of Biological Chemistry, 285*(36), 28353-28362.

- Hayashi, J. I., Ohta, S., Kikuchi, A., Takemitsu, M., Goto, Y., & Nonaka, I. (1991). Introduction of Disease-Related Mitochondrial-DNA Deletions into Hela-Cells Lacking Mitochondrial-DNA Results in Mitochondrial Dysfunction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 88*(23), 10614-10618.
- Hein, J. E., & Fokin, V. V. (2010). Copper-catalyzed azide-alkyne cycloaddition (CuAAC) and beyond: new reactivity of copper(I) acetylides. *Chemical Society Reviews*, *39*(4), 1302-1315.
- Heinemann, I. U., Nakamura, A., O'Donoghue, P., Eiler, D., & Soll, D. (2012). tRNA(His)guanylyltransferase establishes tRNA(His) identity. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 333-344.
- Helm, M., Brule, H., Degoul, F., Cepanec, C., Leroux, J. P., Giege, R., & Florentz, C. (1998). The presence of modified nucleotides is required for cloverleaf folding of a human mitochondrial tRNA. *Nucleic Acids Research*, *26*(7), 1636-1643.
- Helm, M., Giege, R., & Florentz, C. (1999). A Watson-Crick base-pair-disrupting methyl group (m(1)A9) is sufficient for cloverleaf folding of human mitochondrial tRNA(Lys). *Biochemistry*, 38(40), 13338-13346.
- Hildenbeutel, M., Hegg, E. L., Stephan, K., Gruschke, S., Meunier, B., & Ott, M. (2014). Assembly factors monitor sequential hemylation of cytochrome b to regulate mitochondrial translation. *Journal of Cell Biology*, 205(4), 511-524.
- Himeno, H., Hasegawa, T., Ueda, T., Watanabe, K., Miura, K., & Shimizu, M. (1989). Role of the Extra G-C Pair at the End of the Acceptor Stem of Transfer RNA His in Aminoacylation. *Nucleic Acids Research*, 17(19), 7855-7863.
- Himo, F., Lovell, T., Hilgraf, R., Rostovtsev, V. V., Noodleman, L., Sharpless, K. B., & Fokin, V. V. (2005). Copper(I)-catalyzed synthesis of azoles. DFT study predicts unprecedented reactivity and intermediates. *Journal of the American Chemical Society*, 127(1), 210-216.
- Hinttala, R., Sasarman, F., Nishimura, T., Antonicka, H., Brunel-Guitton, C., Schwartzentruber, J., Fahiminiya, S., Majewski, J., Faubert, D., Ostergaard, E., Smeitink, J. A., & Shoubridge, E. A. (2015). An N-terminal formyl methionine on COX 1 is required for the assembly of cytochrome c oxidase. *Human Molecular Genetics*, 24(14), 4103-4113.
- Hinz, F. I., Dieterich, D. C., Tirrell, D. A., & Schuman, E. M. (2012). Noncanonical Amino Acid Labeling in Vivo to Visualize and Affinity Purify Newly Synthesized Proteins in Larval Zebrafish. Acs Chemical Neuroscience, 3(1), 40-49.
- Hirayama, N., limuro, S., Kubono, K., Kokusen, H., & Honjo, T. (1996). Formation of dinuclear copper(II) complex with N,N,N',N'-tetrakis(2-pyridylmethyl)-1,2-ethanediamine in aqueous solution. *Talanta*, *43*(4), 621-626.
- Hirsch, J. D., Eslamizar, L., Filanoski, B. J., Malekzadeh, N., Haugland, R. P., Beechem, J. M., & Haugland, R. P. (2002). Easily reversible desthiobiotin binding to streptavidin, avidin, and other biotin-binding proteins: uses for protein labeling, detection, and isolation. *Analytical Biochemistry*, 308(2), 343-357.
- Hoffmann, J., Sokolova, L., Preiss, L., Hicks, D. B., Krulwich, T. A., Morgner, N., Wittig, I., Schagger, H., Meier, T., & Brutschy, B. (2010). ATP synthases: cellular nanomotors characterized by LILBID mass spectrometry. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(41), 13375-13382.
- Holzmann, J., Frank, P., Loffler, E., Bennett, K. L., Gerner, C., & Rossmanith, W. (2008). RNase P without RNA: Identification and Functional Reconstitution of the Human Mitochondrial tRNA Processing Enzyme. *Cell*, *135*(3), 462-474.
- Hong, V., Presolski, S. I., Ma, C., & Finn, M. G. (2009). Analysis and Optimization of Copper-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloaddition for Bioconjugation. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48(52), 9879-9883.
- Hong, V., Steinmetz, N. F., Manchester, M., & Finn, M. G. (2010). Labeling Live Cells by Copper-Catalyzed Alkyne-Azide Click Chemistry. *Bioconjugate Chemistry*, *21*(10), 1912-1916.

- Horn, D., & Barrientos, A. (2008). Mitochondrial copper metabolism and delivery to cytochrome c oxidase. *Iubmb Life*, 60(7), 421-429.
- Huisgen, R., Szeimies, G., & Mobius, L. (1967). 1.3-Dipolare Cycloadditionen .32. Kinetik Der Additionen Organischer Azide an Cc-Mehrfachbindungen. *Chemische Berichte-Recueil*, 100(8), 2494-&.
- Hurdle, J. G., O'Neill, A. J., & Chopra, I. (2005). Prospects for aminoacyl-tRNA synthetase inhibitors as new antimicrobial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(12), 4821-4833.
- Ibba, M., & Soll, D. (2000). Aminoacyl-tRNA synthesis. Annual Review of Biochemistry, 69, 617-650.
- Iborra, F. J., Kimura, H., & Cook, P. R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *Bmc Biology*, *2*.
- Jao, C. Y., & Salic, A. (2008). Exploring RNA transcription and turnover in vivo by using click chemistry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(41), 15779-15784.
- Jeffreys, A. J., & Craig, I. W. (1976). Analysis of Proteins Synthesized in Mitochondria of Cultured Mammalian-Cells - Assessment of Current Approaches and Problems in Interpretation. *European Journal of Biochemistry, 68*(1), 301-311.
- Jimenez, A., Carrasco, L., & Vazquez, D. (1977). Enzymic and Nonenzymic Translocation by Yeast Polysomes - Site of Action of a Number of Inhibitors. *Biochemistry*, *16*(21), 4727-4730.
- Johansson, M. J. O., Esberg, A., Huang, B., Bjork, G. R., & Bystrom, A. S. (2008). Eukaryotic wobble uridine modifications promote a functionally redundant decoding system. *Molecular and Cellular Biology, 28*(10), 3301-3312.
- Jourdain, A. A., Boehm, E., Maundrell, K., & Martinou, J. C. (2016). Mitochondrial RNA granules: Compartmentalizing mitochondrial gene expression. *Journal of Cell Biology*, *212*(6), 611-614.
- Jourdain, A. A., Koppen, M., Wydro, M., Rodley, C. D., Lightowlers, R. N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., & Martinou, J. C. (2013). GRSF1 Regulates RNA Processing in Mitochondrial RNA Granules. *Cell Metabolism*, 17(3), 399-410.
- Joyce, G. F. (2002). The antiquity of RNA-based evolution. *Nature*, 418(6894), 214-221.
- Kang, D. H., Gho, Y. S., Suh, M. K., & Kang, C. H. (2002). Highly sensitive and fast protein detection with coomassie brilliant blue in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Bulletin* of the Korean Chemical Society, 23(11), 1511-1512.
- Keller, E. B. (1951). Turnover of Proteins of Cell Fractions of Adult Rat Liver Invivo. *Federation Proceedings*, *10*(1), 206-206.
- Kiick, K. L., Saxon, E., Tirrell, D. A., & Bertozzi, C. R. (2002). Incorporation of azides into recombinant proteins for chemoselective modification by the Staudinger ligation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(1), 19-24.
- Kiick, K. L., & Tirrell, D. A. (2000). Protein engineering by in vivo incorporation of non-natural amino acids: Control of incorporation of methionine analogues by methionyl-tRNA synthetase. *Tetrahedron*, 56(48), 9487-9493.
- Kiick, K. L., Weberskirch, R., & Tirrell, D. A. (2001). Identification of an expanded set of translationally active methionine analogues in Escherichia coli. *Febs Letters*, *502*(1-2), 25-30.
- Kikovska, E., Svard, S. G., & Kirsebom, L. A. (2007). Eukaryotic RNase P RNA mediates cleavage in the absence of protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(7), 2062-2067.
- Kim, K., Rhee, S. G., & Stadtman, E. R. (1985). Nonenzymatic Cleavage of Proteins by Reactive Oxygen Species Generated by Dithiothreitol and Iron. *Journal of Biological Chemistry*, 260(29), 5394-5397.
- Kliszczak, A. E., Rainey, M. D., Harhen, B., Boisvert, F. M., & Santocanale, C. (2011). DNA mediated chromatin pull-down for the study of chromatin replication. *Scientific Reports*, 1.
- Koc, E. C., & Spremulli, L. L. (2002). Identification of mammalian mitochondrial translational initiation factor 3 and examination of its role in initiation complex formation with natural mRNAs. *Journal of Biological Chemistry*, 277(38), 35541-35549.
- Kolmakov, K., Wurm, C. A., Hennig, R., Rapp, E., Jakobs, S., Belov, V. N., & Hell, S. W. (2012). Red-Emitting Rhodamines with Hydroxylated, Sulfonated, and Phosphorylated Dye Residues and Their Use in Fluorescence Nanoscopy. *Chemistry-a European Journal, 18*(41), 12986-12998.
- Konovalova, S., & Tyynismaa, H. (2013). Mitochondrial aminoacyl-tRNA synthetases in human disease. *Molecular Genetics and Metabolism, 108*(4), 206-211.
- Krezel, A., Latajka, R., Bujacz, G. D., & Bal, W. (2003). Coordination properties of tris(2carboxyethyl)phosphine, a newly introduced thiol reductant, and its oxide. *Inorganic Chemistry*, 42(6), 1994-2003.
- Kruse, B., Narasimhan, N., & Attardi, G. (1989). Termination of Transcription in Human Mitochondria
   Identification and Purification of a DNA-Binding Protein Factor That Promotes Termination.
   *Cell, 58*(2), 391-397.
- Kühlbrandt, W. (2015). Structure and function of mitochondrial membrane protein complexes. *Bmc Biology*, 13.
- Kukat, C., Wurm, C. A., Spahr, H., Falkenberg, M., Larsson, N. G., & Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* of the United States of America, 108(33), 13534-13539.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during Assembly of Head of Bacteriophage-T4. *Nature, 227*(5259), 680-&.
- Larsson, N. G., Wang, J. M., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G. S., & Clayton, D. A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nature Genetics*, 18(3), 231-236.
- Lee, K. W., & Bogenhagen, D. F. (2014). Assignment of 2 '-O-Methyltransferases to Modification Sites on the Mammalian Mitochondrial Large Subunit 16 S Ribosomal RNA (rRNA). *Journal of Biological Chemistry, 289*(36), 24936-24942.
- Lee, M. D., She, Y. H., Soskis, M. J., Borella, C. P., Gardner, J. R., Hayes, P. A., Dy, B. M., Heaney, M. L., Philips, M. R., Bornmann, W. G., Sirotnak, F. M., & Scheinberg, D. A. (2004). Human mitochondrial peptide deformylase, a new anticancer target of actinonin-based antibiotics. *Journal of Clinical Investigation*, 114(8), 1107-1116.
- Lewis, W. G., Magallon, F. G., Fokin, V. V., & Finn, M. G. (2004). Discovery and characterization of catalysts for azide-alkyne cycloaddition by fluorescence quenching. *Journal of the American Chemical Society*, 126(30), 9152-9153.
- Li, F. Z., Liu, X. F., Zhou, W. H., Yang, X., & Shen, Y. Q. (2015). Auto-inhibitory Mechanism of the Human Mitochondrial RNase P Protein Complex. *Scientific Reports*, *5*.
- Liang, L. Y., & Astruc, D. (2011). The copper(I)-catalyzed alkyne-azide cycloaddition (CuAAC) "click" reaction and its applications. An overview. *Coordination Chemistry Reviews*, *255*(23-24), 2933-2945.
- Liao, H. X., & Spremulli, L. L. (1990). Identification and initial characterization of translational initiation factor 2 from bovine mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, *265*(23), 13618-13622.
- Liko, I., Degiacomi, M. T., Mohammed, S., Yoshikawa, S., Schmidt, C., & Robinson, C. V. (2016). Dimer interface of bovine cytochrome c oxidase is influenced by local posttranslational modifications and lipid binding. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(29), 8230-8235.
- Lill, R., & Mühlenhoff, U. (2006). Iron-sulfur protein biogenesis in eukaryotes: Components and mechanisms. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 22, 457-486.
- Lin, S., & Cronan, J. E. (2011). Closing in on complete pathways of biotin biosynthesis. *Molecular Biosystems, 7*(6), 1811-1821.
- Linder, T., Park, C. B., Asin-Cayuela, J., Pellegrini, M., Larsson, N. G., Falkenberg, M., Samuelsson, T., & Gustafsson, C. M. (2005). A family of putative transcription termination factors shared amongst metazoans and plants. *Current Genetics*, 48(4), 265-269.

- Ling, J. Q., Reynolds, N., & Ibba, M. (2009). Aminoacyl-tRNA Synthesis and Translational Quality Control. Annual Review of Microbiology, 63, 61-78.
- Litonin, D., Sologub, M., Shi, Y. H., Savkina, M., Anikin, M., Falkenberg, M., Gustafsson, C. M., & Temiakov, D. (2010). Human Mitochondrial Transcription Revisited ONLY TFAM AND TFB2M ARE REQUIRED FOR TRANSCRIPTION OF THE MITOCHONDRIAL GENES IN VITRO. *Journal of Biological Chemistry*, *285*(24), 18129-18133.
- Liu, J. C. H., Liu, M. S., & Horowitz, J. (1998). Recognition of the universally conserved 3 '-CCA end of tRNA by elongation factor EF-Tu. *Rna-a Publication of the Rna Society, 4*(6), 639-646.
- Liu, M. Q., & Spremulli, L. (2000). Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane. *Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29400-29406.
- Lodeiro, M. F., Uchida, A., Bestwick, M., Moustafa, I. M., Arnold, J. J., Shadel, G. S., & Cameron, C. E. (2012). Transcription from the second heavy-strand promoter of human mtDNA is repressed by transcription factor A in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), 6513-6518.
- Lowe, A. B. (2014). Thiol-yne 'click'/coupling chemistry and recent applications in polymer and materials synthesis and modification. *Polymer*, *55*(22), 5517-5549.
- Mager, J. (1960). Chloramphenicol and Chlortetracycline Inhibition of Amino Acid Incorporation into Proteins in a Cell-Free System from Tetrahymena-Pyriformis. *Biochimica Et Biophysica Acta,* 38(1), 150-152.
- Mahler, H. R. (1973). Biogenetic autonomy of mitochondria. CRC Crit Rev Biochem, 1(3), 381-460.
- Mann, M., Hendrickson, R. C., & Pandey, A. (2001). Analysis of proteins and proteomes by mass spectrometry. *Annual Review of Biochemistry*, *70*, 437-473.
- Martin, M., Cho, J. Y., Cesare, A. J., Griffith, J. D., & Attardi, G. (2005). Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell*, *123*(7), 1227-1240.
- Martin, W. F., Garg, S., & Zimorski, V. (2015). Endosymbiotic theories for eukaryote origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences*, 370(1678).
- Marx, M. K., Mayer-Posner, F., Soulimane, T., & Buse, G. (1998). Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry analysis and thiol-group determination of isoforms of bovine cytochrome c oxidase, a hydrophobic multisubunit membrane protein. *Analytical Biochemistry*, 256(2), 192-199.
- Mash, H. E., Chin, Y. P., Sigg, L., Hari, R., & Xue, H. B. (2003). Complexation of copper by zwitterionic aminosulfonic (good) buffers. *Analytical Chemistry*, *75*(3), 671-677.
- Masters, J. R. (2002). HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly. *Nat Rev Cancer, 2*(4), 315-319.
- Mazer, N. A., Benedek, G. B., & Carey, M. C. (1976). Investigation of Micellar Phase of Sodium Dodecyl-Sulfate in Aqueous Sodium-Chloride Solutions Using Quasi-Elastic Light-Scattering Spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry*, *80*(10), 1075-1085.
- McGregor, D. P., Forster, S., Steven, J., Adair, J., Leary, S. E., Leslie, D. L., Harris, W. J., & Titball, R. W. (1996). Simultaneous detection of microorganisms in soil suspension based on PCR amplification of bacterial 16S rRNA fragments. *Biotechniques*, *21*(3), 463-466, 468, 470-461.
- Mclean, J. R., Cohn, G. L., Brandt, I. K., & Simpson, M. V. (1958). Incorporation of Labeled Amino Acids into the Protein of Muscle and Liver Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 233(3), 657-663.
- Meisinger, C., Sickmann, A., & Pfanner, N. (2008). The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell*, 134(1), 22-24.
- Meldal, M., & Tornoe, C. W. (2001). Peptidotriazoles: Copper(I)-Catalyzed 1,3-Dipolar Cycloadditions on Solid-Phase. In R. A. Houghten & M. Leb (Eds.), *Peptides: The Wave of the Future* (Vol. 7, pp. 263-264). San Diego, California, U.S.A.: Springer Netherlands.
- Meldal, M., & Tornoe, C. W. (2008). Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Chem Rev, 108*(8), 2952-3015.

- Metodiev, M. D., Lesko, N., Park, C. B., Camara, Y., Shi, Y. H., Wibom, R., Hultenby, K., Gustafsson, C.
   M., & Larsson, N. G. (2009). Methylation of 12S rRNA Is Necessary for In Vivo Stability of the Small Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome. *Cell Metabolism*, 9(4), 386-397.
- Metodiev, M. D., Spahr, H., Polosa, P. L., Meharg, C., Becker, C., Altmueller, J., Habermann, B., Larsson, N. G., & Ruzzenente, B. (2014). NSUN4 Is a Dual Function Mitochondrial Protein Required for Both Methylation of 12S rRNA and Coordination of Mitoribosomal Assembly. *Plos Genetics*, 10(2).
- Mick, D. U., Dennerlein, S., Wiese, H., Reinhold, R., Pacheu-Grau, D., Lorenzi, I., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Shoubridge, E. A., Warscheid, B., & Rehling, P. (2012). MITRAC Links Mitochondrial Protein Translocation to Respiratory-Chain Assembly and Translational Regulation. *Cell*, 151(7), 1528-1541.
- Mick, D. U., Vukotic, M., Piechura, H., Meyer, H. E., Warscheid, B., Deckers, M., & Rehling, P. (2010). Coa3 and Cox14 are essential for negative feedback regulation of COX1 translation in mitochondria. *Journal of Cell Biology*, 191(1), 141-154.
- Minczuk, M., He, J. Y., Duch, A. M., Ettema, T. J., Chlebowski, A., Dzionek, K., Nijtmans, L. G. J., Huynen,
   M. A., & Holt, I. J. (2011). TEFM (c17orf42) is necessary for transcription of human mtDNA.
   *Nucleic Acids Research*, 39(10), 4284-4299.
- Moazed, D., & Noller, H. F. (1991). Sites of interaction of the CCA end of peptidyl-tRNA with 23S rRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A, 88*(9), 3725-3728.
- Mohanty, B. K., & Kushner, S. R. (2000). Polynucleotide phosphorylase functions both as a 3 '-> 5 ' exonuclease and a poly(A) polymerase in Escherichia coli. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *97*(22), 11966-11971.
- Montier, L. L. C., Deng, J. J., & Bai, Y. D. (2009). Number matters: control of mammalian mitochondrial DNA copy number. *Journal of Genetics and Genomics*, *36*(3), 125-131.
- Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., & Attardi, G. (1982). Identification of Initiation Sites for Heavy-Strand and Light-Strand Transcription in Human Mitochondrial-DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America-Biological Sciences, 79(23), 7195-7199.
- Montoya, J., Gaines, G. L., & Attardi, G. (1983). The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell*, *34*(1), 151-159.
- Morgner, N., Kleinschroth, T., Barth, H. D., Ludwig, B., & Brutschy, B. (2007). A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry: From protein subunits to the integral complex. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, *18*(8), 1429-1438.
- Mykhalichko, B. M., Temkin, O. N., & Mys'kiv, M. G. (2000). Polynuclear complexes of copper(I) halides: Coordination chemistry and catalytic transformations of alkynes. *Uspekhi Khimii,* 69(11), 1042-1070.
- Nagaike, T., Suzuki, T., Katoh, T., & Ueda, T. (2005). Human mitochondrial mRNAs are stabilized with polyadenylation regulated by mitochondria-specific poly(A) polymerase and polynucleotide phosphorylase. *Journal of Biological Chemistry, 280*(20), 19721-19727.
- Nagaike, T., Suzuki, T., Tomari, Y., Takemoto-Hori, C., Negayama, F., Watanabe, K., & Ueda, T. (2001). Identification and characterization of mammalian mitochondrial tRNA nucleotidyltransferases. *Journal of Biological Chemistry*, *276*(43), 40041-40049.
- Nagao, A., Suzuki, T., Katoh, T., Sakaguchi, Y., & Suzuki, T. (2009). Biogenesis of glutaminyl-mt tRNA(Gln) in human mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16209-16214.
- Nameki, N., Asahara, H., Shimizu, M., Okada, N., & Himeno, H. (1995). Identity Elements of Saccharomyces-Cerevisiae tRNA(His). *Nucleic Acids Research*, *23*(3), 389-394.
- Neupert, W., & Herrmann, J. M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annual Review of Biochemistry*, *76*, 723-749.
- Nissen, P., Hansen, J., Ban, N., Moore, P. B., & Steitz, T. A. (2000). The structural basis of ribosome activity in peptide bond synthesis. *Science*, *289*(5481), 920-930.

- Nissen, P., Kjeldgaard, M., Thirup, S., Clark, B. F. C., & Nyborg, J. (1996). The ternary complex of aminoacylated tRNA and EF-Tu-GTP. Recognition of a bond and a fold. *Biochimie*, 78(11-12), 921-933.
- O'Brien, T. W. (1971). The general occurrence of 55 S ribosomes in mammalian liver mitochondria. *Journal of Biological Chemistry, 246*(10), 3409-3417.
- O'Hara, E. B., Chekanova, J. A., Ingle, C. A., Kushner, Z. R., Peters, E., & Kushner, S. R. (1995). Polyadenylylation helps regulate mRNA decay in Escherichia coli. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(6), 1807-1811.
- Ofengand, J., & Bakin, A. (1997). Mapping to nucleotide resolution of pseudouridine residues in large subunit ribosomal RNAs from representative eukaryotes, prokaryotes, archaebacteria, mitochondria and chloroplasts. *Journal of Molecular Biology*, *266*(2), 246-268.
- Ojala, D., Montoya, J., & Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature*, *290*(5806), 470-474.
- Olsen, J. V., Ong, S. E., & Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics*, *3*(6), 608-614.
- Ornstein, L. (1964). Disc Electrophoresis. I. Background and Theory. Ann N Y Acad Sci, 121, 321-349.
- Oster, G., & Oster, G. K. (1974). Free-Radical Production by Metallic Copper. *Contraception, 10*(3), 273-280.
- Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry, Vol 85, 85, 77-101.*
- Ott, M., & Herrmann, J. M. (2010). Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 1803(6), 767-775.
- Park, C. B., Asin-Cayuela, J., Camara, Y., Shi, Y. H., Pellegrini, M., Gaspari, M., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Falkenberg, M., Gustafsson, C. M., & Larsson, N. G. (2007). MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription. *Cell*, 130(2), 273-285.
- Pellegrini, M., Asin-Cayuela, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Larsson, N. G., & Gustafsson, C. M. (2009). MTERF2 is a nucleoid component in mammalian mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1787(5), 294-302.
- Pepinsky, R. B. (1991). Selective precipitation of proteins from guanidine hydrochloride-containing solutions with ethanol. *Analytical Biochemistry*, 195(1), 177-181.
- Petruk, S., Fenstermaker, T. K., Black, K. L., Brock, H. W., & Mazo, A. (2016). Detection of RNA-DNA association by a proximity ligation-based method. *Scientific Reports, 6*.
- Phizicky, E. M., & Hopper, A. K. (2010). tRNA biology charges to the front. *Genes & Development, 24*(17), 1832-1860.
- Polacheck, I., & Cabib, E. (1981). A simple procedure for protein determination by the Lowry method in dilute solutions and in the presence of interfering substances. *Analytical Biochemistry*, *117*(2), 311-314.
- Ponten, J., & Saksela, E. (1967). Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int J Cancer*, 2(5), 434-447.
- Posse, V., Shahzad, S., Falkenberg, M., Hallberg, B. M., & Gustafsson, C. M. (2015). TEFM is a potent stimulator of mitochondrial transcription elongation in vitro. *Nucleic Acids Research*, 43(5), 2615-2624.
- Powell, C. A., Nicholls, T. J., & Minczuk, M. (2015). Nuclear-encoded factors involved in posttranscriptional processing and modification of mitochondrial tRNAs in human disease. *Frontiers in Genetics*, 6.
- Reinhard, L., Sridhara, S., & Hallberg, B. M. (2015). Structure of the nuclease subunit of human mitochondrial RNase P. *Nucleic Acids Research*, *43*(11), 5664-5672.
- Reynolds, J. A., & Tanford, C. (1970). Binding of Dodecyl Sulfate to Proteins at High Binding Ratios -Possible Implications for State of Proteins in Biological Membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 66*(3), 1002-&.

- Ribas, V., Garcia-Ruiz, C., & Fernandez-Checa, J. C. (2016). Mitochondria, cholesterol and cancer cell metabolism. *Clinical and Translational Medicine*, *5*.
- Ringel, R., Sologub, M., Morozov, Y. I., Litonin, D., Cramer, P., & Temiakov, D. (2011). Structure of human mitochondrial RNA polymerase. *Nature*, *478*(7368), 269-273.
- Roberti, M., Bruni, F., Polosa, P. L., Manzari, C., Gadaleta, M. N., & Cantatore, P. (2006). MTERF3, the most conserved member of the mTERF-family, is a modular factor involved in mitochondrial protein synthesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, *1757*(9-10), 1199-1206.
- Rodionov, V. O., Presolski, S. I., Gardinier, S., Lim, Y. H., & Finn, M. G. (2007). Benzimidazole and related ligands for Cu-catalyzed azide-alkyne cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, *129*(42), 12696-12704.
- Roodyn, D. B., Reis, P. J., & Work, T. S. (1961). Protein Synthesis in Plant Mitochondria. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 53(2), 445-&.
- Roodyn, D. B., Suttie, J. W., & Work, T. S. (1962). Protein synthesis in mitochondria. 2. Rate of incorporation in vitro of radioactive amino acids into soluble proteins in the mitochondrial fraction, including catalase, malic dehydrogenase and cytochrome c. *Biochemical Journal*, 83, 29-40.
- Rorbach, J., Boesch, P., Gammage, P. A., Nicholls, T. J. J., Pearce, S. F., Patel, D., Hauser, A., Perocchi,
   F., & Minczuk, M. (2014). MRM2 and MRM3 are involved in biogenesis of the large subunit of the mitochondrial ribosome. *Molecular Biology of the Cell*, 25(17), 2542-2555.
- Rorbach, J., & Minczuk, M. (2012). The post-transcriptional life of mammalian mitochondrial RNA. *Biochemical Journal, 444*, 357-373.
- Rorbach, J., Nicholls, T. J. J., & Minczuk, M. (2011). PDE12 removes mitochondrial RNA poly(A) tails and controls translation in human mitochondria. *Nucleic Acids Research*, *39*(17), 7750-7763.
- Rossmanith, W. (2011). Localization of Human RNase Z Isoforms: Dual Nuclear/Mitochondrial Targeting of the ELAC2 Gene Product by Alternative Translation Initiation. *Plos One, 6*(4).
- Rossmanith, W., Tullo, A., Potuschak, T., Karwan, R., & Sbisa, E. (1995). Human mitochondrial tRNA processing. *Journal of Biological Chemistry*, 270(21), 12885-12891.
- Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V., & Sharpless, K. B. (2002). A stepwise huisgen cycloaddition process: copper(I)-catalyzed regioselective "ligation" of azides and terminal alkynes. *Angew Chem Int Ed Engl*, *41*(14), 2596-2599.
- Roy, R. N., Moore, C. P., Bliss, M. D., Patel, S., Benton, B., Carlsten, J. A., Good, W. S., Roy, L. N., & Kuhler, K. M. (1997). Second dissociation constants of 3-(cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid (CAPS) and 3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propanesulfonic acid (CAPSO) from the temperatures 278.15 K to 328.15 K. *Journal of Chemical Thermodynamics, 29*(7), 749-756.
- Salic, A., & Mitchison, T. J. (2008). A chemical method for fast and sensitive detection of DNA synthesis in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(7), 2415-2420.
- Saller, M. J., Wu, Z. C., de Keyzer, J., & Driessen, A. J. M. (2012). The YidC/Oxa1/Alb3 protein family: common principles and distinct features. *Biological Chemistry*, *393*(11), 1279-1290.
- Samaha, R. R., Green, R., & Noller, H. F. (1995). A Base-Pair between Transfer-Rna and 23s Ribosomal-Rna in the Peptidyl Transferase Center of the Ribosome. *Nature*, *377*(6547), 309-314.
- Sanchez, M. I. G. L., Mercer, T. R., Davies, S. M. K., Shearwood, A. M. J., Nygard, K. K. A., Richman, T. R., Mattick, J. S., Rackham, O., & Filipovska, A. (2011). RNA processing in human mitochondria. *Cell Cycle*, 10(17), 2904-2916.
- Sandell, S., Low, H., & Vonderde.A. (1967). A Critical Study of Amino Acid Incorporation into Protein by Isolated Liver Mitochondria from Adult Rats. *Biochemical Journal*, *104*(2), 575-&.
- Schägger, H., & von Jagow, G. (1987). Tricine Sodium Dodecyl-Sulfate Polyacrylamide-Gel Electrophoresis for the Separation of Proteins in the Range from 1-Kda to 100-Kda. *Analytical Biochemistry*, *166*(2), 368-379.

- Schaller, J., Pellascio, B. C., & Schlunegger, U. P. (1997). Analysis of hydrophobic proteins and peptides by electrospray ionization mass spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 11(4), 418-426.
- Schindler, P. A., Vandorsselaer, A., & Falick, A. M. (1993). Analysis of Hydrophobic Proteins and Peptides by Electrospray-Ionization Mass-Spectrometry. *Analytical Biochemistry*, 213(2), 256-263.
- Schwartzbach, C. J., & Spremulli, L. L. (1989). Bovine Mitochondrial Protein-Synthesis Elongation-Factors - Identification and Initial Characterization of an Elongation-Factor Tu-Elongation Factor Ts Complex. *Journal of Biological Chemistry*, *264*(32), 19125-19131.
- Schwinghammer, K., Cheung, A. C. M., Morozov, Y. I., Agaronyan, K., Temiakov, D., & Cramer, P. (2013). Structure of human mitochondrial RNA polymerase elongation complex. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(11), 1298-U1225.
- Seidel-Rogol, B. L., McCulloch, V., & Shadel, G. S. (2003). Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop. *Nature Genetics*, *33*(1), 23-24.
- Sharma, M. R., Koc, E. C., Datta, P. P., Booth, T. M., Spremulli, L. L., & Agrawal, R. K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell*, *115*(1), 97-108.
- Shevchenko, A., Tomas, H., Havlis, J., Olsen, J. V., & Mann, M. (2006). In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocols*, 1(6), 2856-2860.
- Shiraishi, H., Kataoka, M., Morita, Y., & Umemoto, J. (1993). Interactions of Hydroxyl Radicals with Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane and Good Buffers Containing Hydroxymethyl or Hydroxyethyl Residues Produce Formaldehyde. *Free Radical Research Communications*, 19(5), 315-321.
- Shutt, T. E., Lodeiro, M. F., Cotney, J., Cameron, C. E., & Shadel, G. S. (2010). Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(27), 12133-12138.
- Sinha, A., Kohrer, C., Weber, M. H. W., Masuda, I., Mootha, V. K., Hou, Y. M., & RajBhandary, U. L. (2014). Biochemical Characterization of Pathogenic Mutations in Human Mitochondrial Methionyl-tRNA Formyltransferase. *Journal of Biological Chemistry*, 289(47).
- Slomovic, S., Laufer, D., Geiger, D., & Schuster, G. (2005). Polyadenylation and degradation of human mitochondrial RNA: the prokaryotic past leaves its mark. *Molecular and Cellular Biology*, 25(15), 6427-6435.
- Smirnoff, N., & Cumbes, Q. J. (1989). Hydroxyl Radical Scavenging Activity of Compatible Solutes. *Phytochemistry*, 28(4), 1057-1060.
- Smith, M. A., Easton, M., Everett, P., Lewis, G., Payne, M., RiverosMoreno, V., & Allen, G. (1996). Specific cleavage of immunoglobulin G by copper ions. *International Journal of Peptide and Protein Research*, 48(1), 48-55.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of Protein Using Bicinchoninic Acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85.
- Sokolova, L., Wittig, I., Barth, H. D., Schagger, H., Brutschy, B., & Brandt, U. (2010). Laser-induced liquid bead ion desorption-MS of protein complexes from blue-native gels, a sensitive top-down proteomic approach. *Proteomics*, *10*(7), 1401-1407.
- Soleimanpour-Lichaei, H. R., Khul, I., Gaisne, M., Passos, J. F., Wydro, M., Rorbach, J., Temperley, R., Bonnefoy, N., Tate, W., Lightowlers, R., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. (2007). mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination Codons UAA and UAG. *Molecular Cell*, 27(5), 745-757.
- Span, I., Wang, K., Wang, W. X., Zhang, Y. H., Bacher, A., Eisenreich, W., Li, K., Schulz, C., Oldfield, E., & Groll, M. (2012). Discovery of acetylene hydratase activity of the iron-sulphur protein IspH. *Nature Communications*, 3.

- Speers, A. E., Adam, G. C., & Cravatt, B. F. (2003). Activity-based protein profiling in vivo using a copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125(16), 4686-4687.
- Speers, A. E., & Cravatt, B. F. (2004). Profiling enzyme activities in vivo using click chemistry methods. *Chemistry & Biology*, 11(4), 535-546.
- Spencer, A. C., Heck, A., Takeuchi, N., Watanabe, K., & Spremulli, L. L. (2004). Characterization of the human mitochondrial methionyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, *43*(30), 9743-9754.
- Spencer, A. C., & Spremulli, L. L. (2004). Interaction of mitochondrial initiation factor 2 with mitochondrial fMet-tRNA. *Nucleic Acids Research*, *32*(18), 5464-5470.
- Stiburek, L., Fornuskova, D., Wenchich, L., Pejznochova, M., Hansikova, H., & Zeman, J. (2007). Knockdown of human Oxa1l impairs the biogenesis of F1Fo-ATP synthase and NADH : Ubiquinone oxidoreductase. *Journal of Molecular Biology*, *374*(2), 506-516.
- Stoll, V. S., & Blanchard, J. S. (1990). Buffers Principles and Practice. *Methods in Enzymology, 182*, 24-38.
- Sun, G., Kinter, M. T., & Anderson, V. E. (2003). Mass spectrometric characterization of mitochondrial electron transport complexes: subunits of the rat heart ubiquinol-cytochrome c reductase. *Journal of Mass Spectrometry*, 38(5), 531-539.
- Suzuki, H., & Terada, T. (1988). Removal of Dodecyl-Sulfate from Protein Solution. *Analytical Biochemistry*, *172*(1), 259-263.
- Suzuki, T., & Suzuki, T. (2014). A complete landscape of post-transcriptional modifications in mammalian mitochondrial tRNAs. *Nucleic Acids Research*, *42*(11), 7346-7357.
- Szewczyk, B., & Kozloff, L. M. (1985). A Method for the Efficient Blotting of Strongly Basic-Proteins from Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose. *Analytical Biochemistry*, *150*(2), 403-407.
- Taanman, J. W. (1999). The mitochondrial genome: structure, transcription, translation and replication. *Biochim Biophys Acta*, 1410(2), 103-123.
- Takaku, H., Minagawa, A., Takagi, M., & Nashimoto, M. (2003). A candidate prostate cancer susceptibility gene encodes tRNA 3 ' processing endoribonuclease. *Nucleic Acids Research*, 31(9), 2272-2278.
- Tamura, K. (1994). The role of the CCA sequence of tRNA in the peptidyl transfer reaction. *Febs Letters,* 353(2), 173-176.
- Tamura, K., Nameki, N., Hasegawa, T., Shimizu, M., & Himeno, H. (1994). Role of the CCA terminal sequence of tRNA(Val) in aminoacylation with valyl-tRNA synthetase. *Journal of Biological Chemistry*, *269*(35), 22173-22177.
- Temperley, R., Richter, R., Dennerlein, S., Lightowlers, R. N., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). Hungry Codons Promote Frameshifting in Human Mitochondrial Ribosomes. *Science*, 327(5963), 301-301.
- Temperley, R. J., Wydro, M., Lightowlers, R. N., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). Human mitochondrial mRNAs-like members of all families, similar but different. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1797(6-7), 1081-1085.
- Terzioglu, M., Ruzzenente, B., Harmel, J., Mourier, A., Jemt, E., Lopez, M. D., Kukat, C., Stewart, J. B., Wibom, R., Meharg, C., Habermann, B., Falkenberg, M., Gustafsson, C. M., Park, C. B., & Larsson, N. G. (2013). MTERF1 Binds mtDNA to Prevent Transcriptional Interference at the Light-Strand Promoter but Is Dispensable for rRNA Gene Transcription Regulation. *Cell Metabolism*, 17(4), 618-626.
- Tiranti, V., Savoia, A., Forti, F., D'Apolito, M. F., Centra, M., Rocchi, M., & Zeviani, M. (1997). Identification of the gene encoding the human mitochondrial RNA polymerase (h-mtRPOL) by cyberscreening of the Expressed Sequence Tags database. *Hum Mol Genet*, *6*(4), 615-625.
- Tomecki, R., Dmochowska, A., Gewartowski, K., Dziembowski, A., & Stepien, P. P. (2004). Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase. *Nucleic Acids Research*, *32*(20), 6001-6014.

- Tornoe, C. W., Christensen, C., & Meldal, M. (2002). Peptidotriazoles on solid phase: [1,2,3]-triazoles by regiospecific copper(i)-catalyzed 1,3-dipolar cycloadditions of terminal alkynes to azides. J Org Chem, 67(9), 3057-3064.
- Torres, A. G., Batlle, E., & de Pouplana, L. R. (2014). Role of tRNA modifications in human diseases. *Trends in Molecular Medicine, 20*(6), 306-314.
- Towbin, H., Staehelin, T., & Gordon, J. (1979). Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nitrocellulose Sheets Procedure and Some Applications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *76*(9), 4350-4354.
- Trask, D. K., Didonato, J. A., & Muller, M. T. (1984). Rapid Detection and Isolation of Covalent DNA Protein Complexes - Application to Topoisomerase-I and Topoisomerase-Ii. *Embo Journal*, 3(3), 671-676.
- Trostyanskaya, I. G., & Beletskaya, I. P. (2012). Regio- and Stereoselective Copper-Catalyzed Addition of Aromatic and Aliphatic Thiols to Terminal and Internal Nonactivated Alkynes. *Synlett*(4), 535-540.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawaltoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., & Yoshikawa, S. (1996). The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2.8 angstrom. *Science, 272*(5265), 1136-1144.
- Tucker, E. J., Wanschers, B. F. J., Szklarczyk, R., Mountford, H. S., Wijeyeratne, X. W., van den Brand, M. A. M., Leenders, A. M., Rodenburg, R. J., Reljic, B., Compton, A. G., Frazier, A. E., Bruno, D. L., Christodoulou, J., Endo, H., Ryan, M. T., Nijtmans, L. G., Huynen, M. A., & Thorburn, D. R. (2013). Mutations in the UQCC1-Interacting Protein, UQCC2, Cause Human Complex III Deficiency Associated with Perturbed Cytochrome b Protein Expression. *Plos Genetics, 9*(12).
- Tuppen, H. A. L., Blakely, E. L., Turnbull, D. M., & Taylor, R. W. (2010). Mitochondrial DNA mutations and human disease. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, *1797*(2), 113-128.
- Tyanova, S., Temu, T., Sinitcyn, P., Carlson, A., Hein, M. Y., Geiger, T., Mann, M., & Cox, J. (2016). The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nature Methods*, *13*(9), 731-740.
- Urbonavicius, J., Qian, O., Durand, J. M. B., Hagervall, T. G., & Bjork, G. R. (2001). Improvement of reading frame maintenance is a common function for several tRNA modifications. *Embo Journal*, *20*(17), 4863-4873.
- Van Haute, L., Pearce, S. F., Powell, C. A., D'Souza, A. R., Nicholls, T. J., & Minczuk, M. (2015). Mitochondrial transcript maturation and its disorders. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 38(4), 655-680.
- van Hest, J. C. M., Kiick, K. L., & Tirrell, D. A. (2000). Efficient incorporation of unsaturated methionine analogues into proteins in vivo. *Journal of the American Chemical Society*, 122(7), 1282-1288.
   Vazquez, D. (1974). Inhibitors of protein synthesis. *Febs Letters*, 40(0), suppl:S63-84.
- Vilardo, E., Nachbagauer, C., Buzet, A., Taschner, A., Holzmann, J., & Rossmanith, W. (2012). A subcomplex of human mitochondrial RNase P is a bifunctional methyltransferase-extensive moonlighting in mitochondrial tRNA biogenesis. *Nucleic Acids Research*, 40(22), 11583-11593.
- Vithayathil, P. J., & Richards, F. M. (1960). Modification of the Methionine Residue in the Peptide Component of Ribonuclease-S. *Journal of Biological Chemistry*, 235(8), 2343-2351.
- von Piechowski, M., Thelen, M. A., Hoigne, J., & Buhler, R. E. (1992). Tert-Butanol as an Oh-Scavenger in the Pulse-Radiolysis of Oxygenated Aqueous Systems. *Berichte Der Bunsen-Gesellschaft-Physical Chemistry Chemical Physics, 96*(10), 1448-1454.
- Walker, J. E. (1992). The Nadh Ubiquinone Oxidoreductase (Complex-I) of Respiratory Chains. *Quarterly Reviews of Biophysics, 25*(3), 253-324.
- Walling, C. (1975). Fentons Reagent Revisited. Accounts of Chemical Research, 8(4), 125-131.
- Waner, M. J., Navrotskaya, I., Bain, A., Oldham, E. D., & Mascotti, D. P. (2004). Thermal and sodium dodecylsulfate induced transitions of streptavidin. *Biophysical Journal*, *87*(4), 2701-2713.

- Wang, C. L., Ikhlef, D., Kahlal, S., Saillard, J. Y., & Astruc, D. (2016). Metal-catalyzed azide-alkyne "click" reactions: Mechanistic overview and recent trends. *Coordination Chemistry Reviews*, 316, 1-20.
- Wang, Q., Chan, T. R., Hilgraf, R., Fokin, V. V., Sharpless, K. B., & Finn, M. G. (2003). Bioconjugation by copper(I)-catalyzed azide-alkyne [3+2] cycloaddition. *Journal of the American Chemical Society*, 125(11), 3192-3193.
- Weber, K., Rathke, P. C., & Osborn, M. (1978). Cytoplasmic Microtubular Images in Glutaraldehyde-Fixed Tissue-Culture Cells by Electron-Microscopy and by Immunofluorescence Microscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 75(4), 1820-1824.
- Wessel, D., & Flügge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Analytical Biochemistry*, 138(1), 141-143.
- Wilson, W. C., Hornig-Do, H. T., Bruni, F., Chang, J. H., Jourdain, A. A., Martinou, J. C., Falkenberg, M., Spahr, H., Larsson, N. G., Lewis, R. J., Hewitt, L., Basle, A., Cross, H. E., Tong, L., Lebel, R. R., Crosby, A. H., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. A., & Lightowlers, R. N. (2014). A human mitochondrial poly(A) polymerase mutation reveals the complexities of post-transcriptional mitochondrial gene expression. *Human Molecular Genetics*, 23(23), 6345-6355.
- Worrell, B. T., Malik, J. A., & Fokin, V. V. (2013). Direct Evidence of a Dinuclear Copper Intermediate in Cu(I)-Catalyzed Azide-Alkyne Cycloadditions. *Science*, *340*(6131), 457-460.
- Wurm, C. A. K., K.; Göttfert, F.; Ta, H.; Bossi, M.; Schill, H.; Berning, S.; Jakobs, S.; Donnert, G.; Belov, V.N.; Hell, S.W. (2012). Novel red fluorophores with superior performance in STED microscopy. *Optical Nanoscopy*, 1.
- Wydro, M., Bobrowicz, A., Temperley, R. J., Lightowlers, R. N., & Chrzanowska-Lightowlers, Z. M. (2010). Targeting of the cytosolic poly(A) binding protein PABPC1 to mitochondria causes mitochondrial translation inhibition. *Nucleic Acids Research*, *38*(11), 3732-3742.
- Xu, F., Ackerley, C., Maj, M. C., Addis, J. B. L., Levandovskiy, V., Lee, J., MacKay, N., Cameron, J. M., & Robinson, B. H. (2008). Disruption of a mitochondrial RNA-binding protein gene results in decreased cytochrome b expression and a marked reduction in ubiquinol-cytochrome c reductase activity in mouse heart mitochondria. *Biochemical Journal, 416*, 15-26.
- Xu, Z., O'Farrell, H. C., Rife, J. P., & Culver, G. M. (2008). A conserved rRNA methyltransferase regulates ribosome biogenesis. *Nature Structural & Molecular Biology*, *15*(5), 534-536.
- Zaganelli, S., Rebelo-Guiomar, P., Maundrell, K., Rozanska, A., Pierredon, S., Powell, C. A., Jourdain, A.
   A., Hulo, N., Lightowlers, R. N., Chrzanowska-Lightowlers, Z. M., Minczuk, M., & Martinou, J.
   C. (2017). The Pseudouridine Synthase RPUSD4 is an essential component of Mitochondrial RNA Granules. *Journal of Biological Chemistry*.
- Zhu, J. P., Vinothkumar, K. R., & Hirst, J. (2016). Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 536(7616), 354-+.
- Zollo, O., Tiranti, V., & Sondheimer, N. (2012). Transcriptional requirements of the distal heavy-strand promoter of mtDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(17), 6508-6512.

**Tabelle 6.1:** Vollständige Auflistung eines *in silico*-Verdaus der 13 mitochondrialen Proteine mit Trypsin. Angegeben sind alle Peptide mit mehr als 7 Aminosäuren, da dies die Mindestlänge für eine Zuordnung in der massenspektrometrischen war. Da es sich um sehr hydrophobe Proteine handelt, ist es umso unwahrscheinlicher, dass ein Peptid eluiert und detektiert wird, je länger es ist. Zu beachten ist außerdem, dass dieser theoretische Verdau vollständig ist. In der Realität werden nicht alle Schnittstellen verdaut, weshalb die gemessenen Peptide von der Vorhersage abweichen können.

Name und	Trypsin	Anzahl	Anzahl	Soguonzobdockung [%]	
UniProt-Schlüssel	(C-term. zu K/R)	Aminosäuren	Methionin-Reste	Sequenzabdeckung [%]	
	NFLPLTLALLMWYVSMP	27	2		
	ITISSIPPQT	27	2		
	MPMANLLLLIVPILIAMA	25	4		
NADH-Dehydrogenase-	FLMLTER				
Untereinheit 1 (ND1)	GPNVVGPYGLLQPFADA	19	1	31,8	
P03886					
	ILLLISLFLWIR	12	0		
	YDQLMHLLWK	10	1		
	ILGYMQLR	8	1		
	MNPLAQPVIYSTIFAGTLI				
	TALSSHWFFTWVGLEM	46	3		
	NMLAFIPVLTK				
		41	2		
		33	2		
NADH-Dehydrogenase-	IGMAPEHEWVPEVTOG				
Untereinheit 2 (ND2)	TPLTSGLLLLTWQK	30	1	67,1	
P03891	LTWLTPLIPSTLLSLGGLP		0		
	PLTGFLPK	27			
	NNSLIIPTIMATITLLNLYF	22	1		
	YLR	YLR			
	LIYSTSITLLPMSNNVK	17	1		
	WAIIEEFTK	9	0		
	STEAAIK	7	0		
NADH-Dehydrogenase-	MNFALILMINTLLALLLMI	22	Λ		
Untereinheit 3 (ND3)	ITFWLPQLNGYMEK		4	41,7	
P03897	STPYECGFDPMSPAR	15	1		
	LYLSMLISLQISLIMTFTAT				
	ELIMFYIFFETTLIPTLAIIT	42	3		
	R				
	ENTLMFMHLSPILLLSLN	27	2		
	PDIITGFSS				
		23	3		
NADH-Dehydrogenase-					
NADH-Denydrogenase- Untereinheit 4 (ND4) <b>P03905</b>		19	1	37.7	
		16	1	- /	
	MPLYGEHEWLPK	12	1	_	
		10	0		
	HI SSEPI SR	9	0		
	WGNOPFR	7	0		
		8	2		
	LOGIOWIWIN	5	<u> </u>		

Name und	Trypsin	Anzahl	Anzahl	Sequenzabdeckung [%]
UniProt-Schlüssel	(C-term. zu K/R)	Aminosäuren	Methionin-Reste	Sequenzabueckung [70]
NADH-Dehydrogenase-	MPLIVMNIMI AFTISLI G			
Untereinheit 4L (ND4L)	MIVYR	23	4	23,5
P03901				
	YLLIFLITMLILVTANNLFQ			
	LFIGWEGVGIMSFLLISW	42	2	
	WYAR			
	LDYFSMMFIPVALFVTW			
	SIMEFSLWYMNSDPNIN	38	4	
	QFFK			
	SAQLGLHPWLPSAMEG			
	PTPVSALLHSSTMVVAGI	39	2	
	FLLIR			
	IVAFSTSSQLGLMMVTIG	36	2	
	INQPHLAFLHICTHAFFK			
	FHPLAENSPLIQTLTLCLG	37	0	
	AITTLFAAVCALTQNDIK			
	DHIIETANMSYTNAWAL	33	1	
	SITLIATSLTSAYSTR			
	LAAGSLFAGFLITNNISPA	31	0	
	SPFQTTIPLYLK			
NADH-Denydrogenase-	MTMHTTMTTLTLTSLIPP	28	3	01.2
Untereinneit 5 (ND5)	ILTTLVNPNK			81,3
P03915	TMPLTSTSLTIGSLALAG	28	2	
	MPFLTGFYSK			
		25	0	_
	IWLEK	21	1	
	SPLCTFYFSNMLGFYPSIT			
	HK			
		23	0	
		21	2	
	QDIR			
	LYFLSFFFPLILTLLLIT	18	0	
	FPTLTNINENNPTLLNPIK	19	0	
	TISQHQISTSIITSTQK	17	0	
		15	0	
	ADANTAAIQAILTINK	15	0	
	MILLTLTGQPR	11	1	
	NSYPHYVK	8	0	
	EYDGVVVVVNFNSVGS	20	4	
NADH-Dehydrogenase-	WMIYEGEGSGLIR	29	T	
Untereinheit 6 (ND6)	WLVVVTGWTLFVGVYIV	22	<u>^</u>	37,4
P03923	IEIAR	22	0	
	EDPIGAGALYDYGR	14 0		
	FFTFHFILPFIIAALATLHLL			
	FLHETGSNNPLGITSHSD	40	0	
	K			
	LGGVLALLLSILILAMIPIL			27,1
Cytochrom b	HMSK	24	2	
P00156	YLHANGASMFFICLFLHI			
	GR	20 1		
	ITFHPYYTIK	10	0	1
			~	
	DVNYGWIIR	9	0	

Name und	Trypsin	Anzahl	Anzahl	Converselations [0/]	
UniProt-Schlüssel	(C-term. zu K/R)	Aminosäuren	Methionin-Reste	Sequenzabdeckung [%]	
	YSDYPDAYTTWNILSSVG				
	SFISLTAVMLMIFMIWEA	40	3		
	FASK				
	EPFGYMGMVWAMMSI				
	GFLGFIVWAHHMFTVG	37	6		
	MDVDTR				
Cytochrom-c-Oxidase	VLMVEEPSMNLEWLYG	31	3		
Untereinheit 1 (Cox1)	CPPPYHTFEEPVYMK			38,8	
P00395	IHFTIMFIGVNLTFFPQHF	27	2		
		25	0		
		17	1		
	AYFISATMIIAIPIGVK	1/	1		
	VESWLATLHGSNMK	14	1		
	WLFSTNHK	8	0		
	SIGHQWYWTYEYTDYG				
	GLIFNSYMLPPLFLEPGDL	36	1		
	R				
	LNQTTFTATRPGVYYGQ				
	CSEICGANHSFMPIVLELI	39	1		
		33	1	82,8	
Cytochrom-c-Oxidase		20	2		
Untereinheit 2 (Cox2)					
P00403		16	1		
		10	1		
		10	1		
	VVLPIEAPIR	10	0	-	
		10	0		
	LLDVDNR	7	0		
	TDAIPGR	7	0		
Ostashusus a Osidara	HHFGFEAAAWYWHFVD	31	0		
Cytochrom-c-Oxidase	VVWLFLYVSIYWWGS			20.7	
P00414	ESTYQGHHTPPVQK	14	0	20,7	
	QLMFHFTSK	9	1		
	NALAHFLPQGTPTPLIPM	37	2		
ATP-Synthase-					
Untereinheit a (ATP6)		35	1	40,3	
P00846		10	0		
		10	0	-	
	QMMINIMINIK	9	3		
	MPQLNTTVWPTMITPM	27	3		
ATP-Synthase Protein 8		16	2		
(ATP8)		11	0	92,6	
P03928				_	
	NYNKPWEPK	9	U		

**Tabelle 6.2:** Vollständige Auflistung eines *in silico*-Verdaus der 13 mitochondrialen Proteine mit Chymotrypsin. Angegeben sind alle Peptide mit mehr als 7 Aminosäuren, da dies die Mindestlänge für eine Zuordnung in der massenspektrometrischen war. Chymotrypsin scheidet sehr häufig, was zu vielen kleinen Peptiden führt. Allerdings geht dadurch bei einem vollständigen Verdau der Proteine ein großer Anteil der Primärstruktur verloren, weil die Peptide zu klein werden. Zu beachten ist, dass dieser theoretische Verdau vollständig ist. In der Realität werden nicht alle Schnittstellen verdaut, weshalb die gemessenen Peptide von der Vorhersage abweichen können.

Name und UniProt-Schlüssel	Chymotrypsin (C-term. zu F/Y/W/M/L)	Anzahl Aminosäuren	Anzahl Methionin-Reste	Sequenzabdeckung [%]
	VSMPITISSIPPQT	14	1	
-	RKGPNVVGPYGL	12	0	-
	IRTAYPRF	8	0	
NADH-Dehydrogenase-	RAVAQTISY	9	0	
Untereinheit 1 (ND1) <b>P03886</b>	TPLPMPNPL	9	1	23,9
	AETNRTPF	8	0	
	KPATSTITL	9	0	
-	ITTQEHL	7	0	-
	NPRSTEAAIKY	11	0	
-	VPEVTQGTPL	10	0	-
NADH-Dehvdrogenase-	AVLPYNPNM	9	1	
Untereinheit 2 (ND2)	EHTKPTPF	8	0	17
P03891	TNTTNQY	7	0	
	NSSTTTL	7	0	
	TQATASM	7	1	
NADH-Dehydrogenase-	EKSTPYECGF	10	0	
Untereinheit 3 (ND3)	QTTNLPL	7	0	20,9
P03897	SPARVPF	7	0	
	LPKAHVEAPIAGSM	14	1	
	ERTHSRIM	8	1	
	INTTTHSL	8	0	
NADH-Dehydrogenase-	NPDIITGF	8	0	
Untereinheit 4 (ND4)	THHINNM	7	1	16,1
P03905	ALPPTINL	8	0	
	NQINNNL	7	0	
	GNQPERL	7	0	
	IISIIPL	7	0	
NADH-Dehydrogenase-	ANIVPIAM	8	1	
Untereinheit 4L (ND4L)	AACEAAVGL	9	0	24,5
P03901	VSISNTY	7	0	

Name und	Chymotrypsin	Anzahl	Anzahl	Sequenzabdeckung
UniProt-Schlüssel	(C-term. zu F/Y/W/M/L)	Aminosäuren	Methionin-Reste	[%]
	LPKTISQHQISTSIITSTQKGM	22	1	-
	YPSITHRTIPYL	12	0	
	VNPNKKNSYPHY	12	0	
	ARADANTAAIQAIL	14	0	
	TQNDIKKIVAF	11	0	
	SKDHIIETANM	11	1	
	ITNNISPASPF	11	0	
	NNEQDIRKM	9	1	
	TNINENNPTL	10	0	
NADH-Dehydrogenase-	DQEVIISNW	9	0	
Untereinheit 5 (ND5)	VTIGINQPHL	10	0	34
P03915	NSDPNINQF	9	0	
	TGQPRFPTL	9	0	
	VKSIVASTF	9	0	
	CSGSIIHNL	9	0	
	NRIGDIGF	8	0	
	EGPTPVSAL	9	0	
	ATTQTTQL	8	0	
	HICTHAF	7	0	
	AAAGKSAQL	9	0	
	TSQNLPL	7	0	-
	IVSGVVGCVIIL	12	0	
	IREDPIGAGAL	11	0	-
	AIEEYPEAW	9	0	-
NADH-Dehydrogenase-	IVIEIARGN	9	0	-
Untereinheit 6 (ND6)	DGVVVVNF	9	0	41,4
F03523	SSKPSPIY	8	0	
	GSGVEVL	7	0	-
	EGEGSGL	7	0	-
	SSIAHITRDVNY	12	0	
	IDLPTPSNISAW	12	0	
	NTPPHIKPEW	10	0	
	GITSHSDKITF	11	0	
	IGGQPVSYPF	10	0	
	SAIPYIGTDL	10	0	-
Cytochrom b	TIIGQVASVL	10	0	31,8
P00156	HETGSNNPL	9	0	
	RSVPNKL	7	0	-
	SPDASTAF	8	0	-
	GATVITNI	8	0	
	SVDSPTL	7	0	
	HANGASM	7	1	
		1 '	l -	1

Name und	Chymotrypsin	Anzahl	Anzahl	Sequenzabdeckung
UniProt-Schlüssel	(C-term. zu F/Y/W/M/L)	Aminosäuren	Methionin-Reste	[%]
	IIAIPTGVKVF	11	0	
	STNHKDIGTL	10	0	
	GCPPPYHTF	9	0	
	NVIVTAHAF	9	0	
	DPAGGGDPIL	10	0	
	SHPGASVDL	9	0	
Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase	SGMPRRY	7	1	22.6
P00395	VEAGAGTGW	9	0	22,0
	DVDTRAY	7	0	
·	ISHIVTY	7	0	
·	SDYPDAY	7	0	
·	ITTIINM	7	1	
·	ASKRKVL	7	0	
·	SGKKEPF	7	0	
	DVDNRVVLPIEAPIRM	16	1	
	GQCSEICGANHSF	13	0	
·	TNTNISDAQEM	11	1	
·	TIKSIGHQW	9	0	
Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase	TDEVNDPSL	9	0	
Untereinheit 2 (Cox2)	KTDAIPGRL	9	0	46,7
P00403	TATRPGVY	8	0	
	QDATSPIM	8	1	
	TILPAIIL	8	0	
·	ITSQDVL	7	0	
°	AHAAQVGL	8	0	
	QGHHTPPVQKGL	12	0	
	GGHWPPTGITPL	12	0	
	RDVTRESTY	9	0	
Cytochrom- <i>c</i> -Oxidase	VKPSPWPL	8	0	
Untereinheit 3 (Cox3)	ENNRNQM	7	1	33,3
P00414	HVIIGSTF	8	0	
·	THQSHAY	7	0	
·	ASGVSITW	8	0	
°	TISDGIY	7	0	
	HNTKGRTW	8	0	
·	STINLPSTL	9	0	
ATP-Synthase-	RSKIKNAL	8	0	
Untereinheit a (ATP6)	LPQGTPTPL	9	0	29,6
P00846	TANITAGHL	9	0	
	VIIETISL	8	0	]
	GLPAAVL	7	0	
ATP-Synthase Protein 8	HLPPSPKPM	9	1	
(ATP8)	NTTVWPTM	8	1	35,3
P03928	HSLPPQS	7	0	

Tabelle 6.3: Auflistung der vollständigen Namen der Kupfer-Liganden auf Basis Tris (triazolylmethyl)amin nach Besanceney-Webler et al. (2011).

Ligand	Vollständiger Name nach IUPAC
TBTA	Tris[(1-benzyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
THPTA	Tris[(1-hydroxy-propyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amine
BTTES	2-[4-{(bis[(1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amino)-methyl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl]ethyl hydrogen
	sulfate
BTTAA	2-[4-{(bis[(1-tert-butyl-1H-1,2,3-triazol-4-yl)methyl]amino)-methyl}-1H-1,2,3-triazol-1-yl]acetic acid

# Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
°C	Grad Celsius
μg	Mikrogramm
μΙ	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar
<sup>35</sup> S	<sup>35</sup> Schwefel
A (Aminosäure)	Alanin
A (Nukleotid)	Adenin
Abs.	Absorption
АНА	Azidohomoalanin
APS	Ammoniumpersulfat
A-Stelle	AminoacylStelle
АТР	Adenosintriphosphat
ATP6	ATP-Synthase-Untereinheit a, Proteinname
ATP8	ATP-Synthase-Protein 8, Proteinname
BCA	Bicinchoninsäure
BrdU	Bromodesoxyuridin
BrU	5-Bromouridin
C (Aminosäure)	Cystein
C (Nukleotid)	Cytosin
CAPSO	3-(cyclohexylamino)-2-hydroxy-1-propansulfonsäure
CBS	CAPSO-gepufferte Salzlösung
ст	Zentimeter
CMC	critical micellar concentration
CMT	critical micellar temperature
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cox1-3	Cytochrom-c-Oxidase-Untereinheit 1-3, Proteinname
CsCl	Cäsiumchlorid
Cu	Kupfer
CuAAC	kupferkatalysierte 1,3-dipolaren Cycloaddition
CuBr	Kupferbromid
CuSO <sub>4</sub>	Kupfersulfat
Cys	Cystein
D (tRNA-Modifikation)	Dihydrouridin
D (Aminosäure)	Asparaginsäure
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	deoxyribonucleic acid - Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E (Aminosäure)	Glutaminsäure
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EdU	5-ethynyl-2'-Deoxyuridin
Ff-Tumt /Tsmt /G1mt	mitochondrial elongation factor Tu/Ts/G1
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N.N.N'.N'-tetraessigsäure
Fm.	Emission
E-Stelle	Exit-Stelle
EU	5-ethynyluridine
F (Aminosäure)	Phenylalanin
FBS	Fetal Bovine Serum
	Fisen

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
g (Gewichtsangabe)	Gramm
G (Aminosäure)	Glycin
G (Nukleotid)	Guanin
g (Zentrifugation)	Erdbeschleunigung (Konstante 9,81 m/s <sup>2</sup> )
Gln	Glutamin
Glu	Glutaminsäure
GTP	Guanosintriphosphat
h	hour
H (Aminosäure)	Histidin
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Phosphorsäure
HDFa	humane dermale Fibroblasten, adult
His	Histidin
HPG	Homopropargylglycin
HSP1+2	heavy strand promoter 1+2
I (Aminosäure)	Isoleucin
IF	Immunfluoreszenz
IF-2 mt +3mt	mitochondrial initiation factor 2+3
K (Aminosäure)	Lysin
KCI	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihvdrogenphosphat
1	Liter
L (Aminosäure)	Leucin
Leu	Leucin
	light strand promoter
 	large ribosomal subunit
M (Konzentrationsangabe)	molar
m	Meter
M (Aminosäure)	Methionin
m/z	Masse pro Ladung
mA	Milliampere
Met	Methionin
mg	Milligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mM	Millimolar
	Marzohm
mol	Stoffmange
	3-(N-Morpholino)-propagsulfonsäure
mRNA	messenger rihonucleic acid
MRDD1_3	mitochondrial RNace P protein 1-3
mc	Millisekunden
	mitochondrial codierte ATE-Synthase-Untereinheit6/8, Genname
MT-CO1-2	mitochondrial codierte Arr-Synthase-Onterennetto/8, Genname
MT-CVB	mitochondrial codiertes Cytochrom & Genname
	mitochondrial transcription termination factor 1.4
	Mothionul tRNA Formultransforaça
	niterihosomal large subunit
	mitoribusumu lurge subumit
	mitochondrial coulerte NADH-Denydrogenase-Untereinneit1 -b, Genname
	mitochonarial poly(A) polymerase
mtssu	mitoribosomal Small subunit

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
MW	Molekulargewicht
N (Aminosäure)	Asparagin
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid
ND1-6	NADH-Dehydrogenase-Untereinheit1 -6, Proteinname
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
·OH	Hydroxyl-Radikal
P (Aminosäure)	Prolin
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
Phe	Phenylalanin
pl	isoelektrischer Punkt
Ψ (PSI)	Pseudouridinylierung
P-Stelle	Peptidyl-Stelle
PTCD1-2	pentatricopeptide repeat domain protein 1
Q (Aminosäure)	Glutamin
R (Aminosäure)	Arginin
RNA	ribonucleic acid - Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomal ribonucleic acid
RT	Raumtemperatur
S	Sekunden
S (Sedimentationskoeffizient)	Svedberg
S (Aminosäure)	Serin
SDS	sodium dodecvlsulfate - Natrium Dodecvlsulfat
Ser	Serin
SSU	small ribosomal subunit
STED	stimulated emission depletion
T (Aminosäure)	Threonin
TBS	Tris buffered saline
ТСЕР	Tris-(carboxyethyl)-phosphin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TFAM	mitochondrial transcription factor A
TFB1M	mitochondrial transcription factor 1B
TFB2M	mitochondrial transcription factor 2B
Thr	Threonin
TPEN	N.N.N'.N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylendiamin
Tris	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1.3-propandiol
tRNA	transfer-ribonucleic acid
U (Nukleotid)	Uracil
V (Aminosäure)	Valin
v/v	volume/volume
Val	Valin
W (Aminosäure)	Tryptophan
w/v	weight/volume
WB	Western Blot
V (Aminosäure)	Tyrosin
- (Anniosaure)	Tyroshi

### Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1.1: A: Die mitochondriale Ultrastruktur als dreidimensionales Modell am Beispiel eines Mäuseherz-Mitochondriums, erzeugt per cryo-Elektronentomographie. B: Mikrograph einer einzelnen Schnittebene. Die Abbildung ist angepasst nach Kühlbrandt (2015).
   Abbildung 1.2: Schematische Darstellung des humanen mitochondrialen Genoms. Der schwere Strang (HS) ist

- Abbildung 1.4: Aminoacylierung am Beispiel der tRNA<sup>Met</sup>. Methionin (blau) wird von dem Enzym Methionyl-tRNA-Synthetase (MARS, magenta) mittels Hydrolyse von Adenosintriphosphat (ATP, grün) adenyliert (I). Das Zwischenprodukt ist ein Komplex aus MARS und dem Methionyl-Adenylat (grün), anorganisches Phosphat wird frei (II). MARS rekrutiert die tRNA<sup>Met</sup> (rot) und katalysiert die Esterifizierung am Adenosin der 3'-terminalen CCA-Sequenz der tRNA<sup>Met</sup> (siehe Abschnitt 1.2.3.5). Das Methionyl-Adenylat wird dabei gespalten und AMP wird frei. Die Esterifizierung der Ribose an der tRNA<sup>Met</sup> kann entweder am 2'-O oder am 3'-O geschehen, hier ist die 2'-O-Esterfizierung abgebildet (III). Das Enzym Methionyl-tRNA-Formyltransferase (MTF, magenta) rekrutiert die beladene tRNA und katalysiert die Formylierung von Methionin mit Hilfe des Co-Faktors N<sup>10</sup>-Formylterahydrofolat (FTHF, schwarz). Die Produkte sind fMettRNA<sup>Met</sup> und Tetrahydrofolat (THF, IV).
- Abbildung 1.6: Prinzip der der kupferkatalysierten 1,3-dipolaren Cycloaddition (CuAAC) zwischen einem terminalen Alkin (rot) und einem organischen Azid (blau)......24
- Abbildung 2.1: Strukturformeln der funktionalisierten Sonden a) Natives Biotin mit Polyethylenglycol-Linker und Azid-Funktionalisierung b) Desthiobiotin mit Polyethylenglycol-Linker und Azid-Funktionalisierung c) Natives Biotin mit Polyethylenglycol-Linker und Alkin-Funktionalisierung d) KK114-azid, Absorption bei 637 nm, Emission bei 660 nm (Kolmakov *et al.*, 2012; Wurm, 2012). e) Alexa488-azid, Absorption bei 488-498 nm, Emission bei 520 nm, Kommerzieller Farbstoff (Molecular Probes, Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA).
- Abbildung 3.1: Einfluss des Reduktionsmittels auf die Proteine. HeLa-Zellen wurden für 24 h mit 50 μM HPG inkubiert, anschließend wurde Alexa488 per CuAAC an HPG-positive Proteine aus Gesamtzellextrakt gekoppelt und im Western Blot per Antikörper gegen Alexa488 nachgewiesen. M: Größenstandard in kDa. a: Ponceau-Färbung. b: ECL-Reaktion. 1: CuAAC mit Ascorbinsäure/CuSO<sub>4</sub>/BCA (Verhältnis 10:1:1).
  2: Unbehandeltes Lysat, keine CuAAC. 3: CuAAC mit TCEP/CuSO<sub>4</sub>/BCA (Verhältnis 1:1:2)......49
- Abbildung 3.2 Kernkomponenten der CuAAC. a: Tris-(carboxyethyl)-phosphin (TCEP). Es verfügt über drei Carboxylgruppen und bringt ein weiteres Molekül HCl mit. b: Cu<sup>+</sup> von zwei Molekülen Bicinchoninsäure

(BCA) cheliert. Dieser Komplex hat einen charakteristischen tief lila Farbton und ist sowohl im BCA-Assay (P. K. Smith <i>et al.,</i> 1985) als auch bei der Etablierung des CuAAC-Reaktionscocktails in dieser Arbeit die relevante Messgröße <b>50</b>
Abbildung 3.3: Struktur der eingesetzten Radikalfänger a: tert-Butanol. b: Mannitol. Der Einsatz dieser Moleküle, insbesondere der von a, ermöglichte den Einsatz von TCEP als Reduktionsmittel in der CuAAC.
<ul> <li>Abbildung 3.4: Konzentrationsreihe von BCA bei konstanter Konzentration von CuSO<sub>4</sub> (3 mM) in der CuAAC.</li> <li>Biotin-PEG<sub>3</sub>-azid wurde an HPG-positive Proteine aus HeLa-Gesamtzellextrakt gekoppelt und im Western</li> <li>Blot per Antikörper gegen Biotin nachgewiesen M: Größenstandard in kDa. 1: CuAAC ohne BCA. 2:</li> <li>Verhältnis CuSO<sub>4</sub>:BCA 1:0,66. 3: Verhältnis 1:1. 4: Verhältnis 1:1,33.</li> </ul>
<ul> <li>Abbildung 3.5: a) Alkylierungsreagenz Iodessigsäure. b) Nachweis von ND5 im Western Blot auf mitochondriale Fraktion ohne Alkylierung (links) und mit Alkylierung (rechts). c) Ponceau-Färbung von jeweils 4,5 μg mitochondrialer Fraktion nach der CuAAC ohne Alkylierung (1) und mit Alkylierung (2). Größenstandard in kDa.</li> </ul>
<ul> <li>Abbildung 3.6: Empfindlichkeitssteigerung der Detektion im Western Blot durch das Neutravidin-System.</li> <li>Biotinyliertes Rinderserumalbumin (BSA) wurde in den angegebenen Mengen aufgetragen und nur mit dem Antikörper gegen Biotin (oben) und dem Neutravidin-System (unten) entwickelt. Alle</li> <li>Bandenintensitäten sind direkt vergleichbar, weil es dieselbe Membran ist, belichtet für 1 min</li></ul>
Abbildung 3.7: Chelatoren im Vergleich. a: N,N,N',N'-Tetrakis(2-pyridylmethyl)ethylendiamin (TPEN). b: Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), das zu pH-abhängig war, um die CuAAC effizient zu beenden58
<ul> <li>Abbildung 3.8: Nachweis mitochondria-ler Proteinsynthese in HeLa-Zellen. Die CuAAC-Desthiobiotinylierung wurde mittels Neutravidin-System nachge-wiesen. M: Größenstandard in kDa. 1: 3,8 μg mitochondriale Fraktion, inkubiert mit 500 μM HPG für 4 h, 50 μg/ml Cycloheximid und 62,5 μg/ml Thiamphenicol. 2: 3,8 μg mitochondriale Fraktion, inkubiert nur mit 500 μM HPG für 4 h und 50 μg/ml Cycloheximid.</li> <li>* markieren zahlreiche Proteine, die in Gegenwart von Thiamphenicol nicht synthetisiert wurden.</li> <li>* markieren endogenes Biotin</li></ul>
<ul> <li>Abbildung 3.9: Charakterisierung der zwei stärksten, unspezifischen Banden (*). 3,9 μg Hela-Mito-Fraktion in jeder Spur. 1: Rohlysat mit CuAAC. 2: Rohlysat ohne CuAAC. 3: Rohlysat nach Vorinkubation mit Streptavidin-Agarose, mit CuAAC. 4: Rohlysat nach Vorinkubation mit Streptavidin-Agarose, ohne CuAAC. 4: Rohlysat nach Vorinkubation mit Streptavidin-Agarose, ohne CuAAC. 6: M: Größenstandard in kDa.</li> </ul>
<ul> <li>Abbildung 3.10: Nachweis mitochon-drialer Proteinsynthese (*) im Eluat aus 4,7 μg HeLa-Mitochondrien- Fraktion nach 4 h Inkubation mit 500 μM HPG. Aufreinigung über Streptavidin-Agarose und Nachweis im Western Blot mit Neutravidin-System. M: Größen-standard in kDa. 1: 50 μg/ml Cycloheximid und 62,5 μg/ml Thiamphenicol. 2: Nur Cycloheximid. Geringe Mengen endogenen Biotins wurden eluiert (*), ebenso monomeres Streptavidin (*). Die Bande * entspricht dem erwarteten Molekulargewicht der humanen mitochondrialen methionyl-t-RNA-Synthetase.</li> </ul>
<ul> <li>Abbildung 3.11: Nachweis mitochondrialer Proteinsynthese in anderen Zelltypen. a: U2OS-Zellen, 500 μM HPG-Inkubation für 4 h. Rohlysate, Auftragsmenge nicht bestimmt, keine Aufreinigung. b: HDFa, primäre Fibroblasten, 500 μM HPG-Inkubation für 4 h. Alkylierte Lysate (siehe Abschnitt 3.1.3). Mit Aufreinigung, Eluate aus 3,4 μg Protein. Für a und b gilt: 1: Cycloheximid und Thiamphenicol. 2: Nur Cycloheximid. M: Größenstandard in kDa.</li> <li>Abbildung 3.12: Korrelation der Antikörner Signale mit der GuAAC Desthiobiotion/jigrung in Hela Zellen für dir GuAAC Desthiobi</li></ul>
drei angegebenen mitochondrialen Proteine. Dieselben Spuren einer Membran wurden der Länge nach durchtrennt. Der rote Rahmen umfasst immer den Nachweis von CuAAC-Desthiobiotinylierung mittels des Neutravidin-Systems aus Abschnitt 3.2. Der blaue Rahmen markiert den Nachweis des jeweils angegebenen mitochondrialen Proteins (Cox1, Cox3 und ND5). C steht für Cycloheximid, T für Thiamphenicol, U für unbehandeltes Ausgangsmaterial und A für alkyliertes Ausgangsmaterial
Abbildung 3.13: Zusammenfassung des Nachweises mitochondrialer Proteine in der massenspektrometrischen Analyse. Dargestellt ist die mittlere Anzahl der Peptide für jedes mitochondriale Protein aus zwei separaten Messungen. Blau: Trypsin-Verdau der mitochondrialen Fraktion von HeLa-Zellen. Rot: Chymotrypsin-Verdau der mitochondrialen Fraktion von HeLa-Zellen. Grün: Chymotrypsin-Verdau der mitochondrialen Fraktion von HDFa-Zellen

#### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.14: Dargestellt ist die ungefilterte Gesamtzahl der Peptide in P1 jedes Durchgangs (graue Balken) im direkten Vergleich mit der ersten Stufe der Hintergrundreduktion, der Entfernung aller Peptide aus P1, Abbildung 3.15: Zusammenfassung möglicher Situationen in Methionin-Positionen massenspektrometrisch gemessener Peptide. Dargestellt sind die Strukturformeln, die Summenformeln und die Differenz zu Methionin. Die Auswertung der Daten mit MaxQuant beruht auf der Eingabe der Summenformel-Differenz für jedes Atom relativ zu Methionin. a) internes HPG. b) N-terminales, formyliertes HPG. c) Aufgeteilt in  $c_1$  = internes HPG-Desthiobiotin und  $c_2$  = N-terminales, formyliertes HPG-Desthiobiotin. ....71 Abbildung 3.16: a) Räumliche Verteilung der mitochondrialen Proteinsynthese in einer exemplarischen HDFa-Zelle nach 2,5 h mit 500 μM HPG in Gegenwart von 50 μg/ml Cycloheximid. **b**) Identische Bedingungen wie a), mit zusätzlichen 62,5 µg/ml Thiamphenicol. Beide Abbildungen sind Aufsummierungen (add up) aus den Rohdaten konfolkaler z-Stapel, es wurden keine Bildbearbeitungen durchgeführt. Der Balken repräsentiert 5 μm......73 Abbildung 3.17: STED-Aufnahme der räumlichen Verteilung der mitochondrialen Proteinsynthese in einer HDFa-Zelle nach 2,5 h mit 500 µM HPG in Gegenwart von 50 µg/ml Cycloheximid. Vier exemplarische Bereiche sind vergrößert und zeigen deutlich die inhomogene Verteilung des Fluoreszenzsignals entlang der Mitochondrien. Die Aufnahme bildet eine einzelne konfokale Ebene ab. Es wurden keine Bildbearbeitungen durchgeführt. Der Balken repräsentiert 3 µm im Übersichtsbild (Mitte) und 1 µm in den Ausschnitten. ......74 Abbildung 3.18: Die Anwendung der CuAAC-Immunfluoreszenz-Kombination ermöglichte eine deutlich hellere Färbung der mitochondrialen Proteinsynthese nach 2,5 h mit 500 µM HPG (HDFa-Zellen).a) Inkubation in Abbildung 3.19: STED-Aufnahmen der CuAAC-Immunfluoreszenz-Kombination in HDFa-Zellen in Gegenwart von 50 mg/ml Cycloheximid. a-c) 500 μM HPG für 2,5h. Deutliche Markierung des mitochondrialen Netzwerks in vielen Zellen, aber auch hoher Hintergrund. **d-f**) ebenfalls 500 μM HPG, aber nur für 15 min. Nach so kurzer Zeit ist kein vollständiges Netzwerk gefärbt, es fallen nur vereinzelte Mitochondrien auf. Auch nach 15 min ist der Hintergrund bereits hoch; das Protokoll benötigt noch weitere Optimierung. Die Aufnahme bildet eine einzelne konfokale Ebene ab. Es wurden keine Bildbearbeitungen durchgeführt Der Balken repräsentiert überall 1 μm. ......76 Abbildung 4.1: Illustration der geringen Signalstärke mitochondrialer Proteinsynthese im Vergleich zur cytosolischen. Aufgetragen wurden gleiche Mengen mitochondrialer Fraktionen, die mit 500 µM HPGinkubiert und mit Thiamphenicol/Emetin (1) und nur Emetin (2) behandelt wurden bzw. unbehandelt waren (3). Beide Abbildungen zeigen die selbe Membran. Links: 10 s Belichtungszeit. Rechts: Spur 3 wurde mit einem Skalpell abgetrennt. 5 min Belichtungszeit mit deutlich stärker angepasstem Kontrast als links, erkennbar an der Intensität der unspezifischen Banden (\*). Einige mitochondriale Proteine wurden nachgewiesen (\*). Die Membran wurde mit dem Neutravidin-System entwickelt......77 Abbildung 4.2: Vergleich einiger Autoradiogramme mitochondrialer Proteinsynthese (a-e) aus verschiedenen Zelltypen mit dem CuAAC-Nachweis im Western Blot ohne radioaktive Isotope in dieser Arbeit (f). Dem eigenen Nachweis liegen Aufreinigungen von alkylierten mitochondrialen Fraktionen nach 5 h mit 500 μM HPG zugrunde. 1: Emetin 172 μg/ml. 2: Emetin 172 μg/ml und Thiamphenicol 62,5 μg/ml. Die Quellen der Autoradiogramme sind a) Jeffreys und Craig (1976). b) Sanchez et al. (2011). c) Wydro et al. (2010). d) Antonicka et al. (2017). e) Chomyn (1996). Tabelle 4.1 gibt eine Übersicht der Abbildung 4.3: Vergleich der nachgewiesenen Peptidzahlen der mitochondrialen Proteine nach einem Verdau mit Chymotrypsin. Die blauen Balken repräsentieren den Mittelwert aus zwei Durchgängen mit unbehandelten mitochondrialen Fraktionen, die roten Balken repräsentieren den Mittelwert aus den drei Durchgängen D<sub>a</sub> bis D<sub>c</sub> aus dem Nachweis nach der CuAAC-Aufreinigung (siehe Tabelle 3.6). Der schraffierte Balken bei ND4 bedeutet, dass dieses Protein als einziges nur in einem der drei Durchgänge nachgewiesen wurde. Alle anderen Proteine wurden in mindestens zwei separaten Durchgängen Abbildung 4.4: Abbildung angepasst nach Tucker et al. (2013). Gezeigt wird der Vergleich der mitochondrialen Proteinsynthese gesunder Fibroblasten (a) mit denen eines Spenders, in denen die Stabilität von

Cytochrom b durch die Mutation eines seiner Prozessierungsfaktoren schwer beeinträchtig ist (b). Der

## Abbildungsverzeichnis

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1: Rezept der PBS-Stammlösung. Die Reihenfolge der Auflistung der Salze entspricht der
Zugabereihenfolge zu etwa 70% des Endvolumens an Wasser. Es wurde immer gewartet, bis sich ein Salz
gelöst hatte, ehe das nächste zugesetzt wurde27
Tabelle 2.2: Puffer und ihre pKs-Werte.    27
Tabelle 2.3: Liste der Primärantikörper mit Details zu Eigenschaften und Einsatzbereich. Abkürzungen: IF =
Immunfluoreszenz, WB =Western Blot
<b>Tabelle 2.4:</b> Liste der Sekundärantikörper mit Details zu Eigenschaften und Einsatzbereich. Sekundärantikörper
wurden vor Benutzung für 3 min bei RT und 16000 x g zentrifugiert. <b>Abkürzungen</b> : IF =
Immunfluoreszenz, WB =Western Blot
Tabelle 2.5: Azid- und Alkin-funktionalisierte Sonden.         29
Tabelle 2.6: Übersicht der Zelltypen.    31
Tabelle 2.7: Medien und Gebrauchslösungen der Zellkultur31
Tabelle 2.8: Zellaussaatdichten und Wachstumsphasen
Tabelle 2.9: Liste der -Medien für die Methioninsubstitution.    33
Tabelle 2.10: Puffer für die Isolation von Mitochondrien.       35
Tabelle 2.11: Der Lysepuffer für die mitochondriale Fraktion.         35
Tabelle 2.12: Puffer, die zur Alkylierung von Rohlysaten mit Iodessigsäure verwendet wurden.       39
Tabelle 2.13:         Komponenten des CuAAC-Master-Mix, aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Zugabe.         In den
Master Mix musste bei den angegebenen Stammlösungen kein Wasser mehr zugegeben werden. 123 $\mu$ l
Master Mix wurden mit Lysat, CuSO₄ und TCEP auf 150 µl pro Reaktion aufgefüllt. Die Spalte
"Endkonzentration" bezieht sich auf die 150 µl Reaktionsgesamtvolumen. * = Stammlösung bildet nach
einiger Zeit Kristalle bei RT. Die Lösung wurde deshalb vor Gebrauch für 3-4 h bei 50°C gerührt und
invertiert. ** = Stets die freie Säure (Katalog-Nr. 14335) verwendet, nicht das Kalium-Salz. *** = Azid-
Sonde waren verschiedene Biotin-Derivate, siehe Tabelle 2.540
Tabelle 2.14: Komponenten der Stop-Lösung, aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Zugabe. Die
Endkonzentration bezieht sich auf die Mischung von 150 µl CuAAC-Reaktions-Cocktail mit 450 µl Stop-
Losung
Tabelle 2.15: Zusammensetzung des Auftragspuners. Der Puner war der Standard-Puner für alle
Taballa 2 16: Zusammansatzung der Cala für das Tric Tricin System. Die Beihanfolge der Auflictung antspricht
der Zugebereihenfelge
Taballa 2 17: Zusammansatzung der Cala für das Tric Clusin Sustem. Die Beihanfolge der Auflictung enterricht
der Zugebereihenfelge
Tabelle 2 18: Komposition von Extractions, und Waschnuffer
<b>Tabelle 2.10.</b> Komposition von Extraktions- und waschpunet
aufgelistet in der Reihenfolge ihrer Zugabe * Sonden siehe Tabelle 2.5
<b>Tabelle 3 1:</b> Ontimierung des nH-Wertes bei angegebenen Puffer- und Kunferkonzentrationen jeweils in
Donnel-bestimmung. Die Vorhereitung des Master-Mix erfolgte nach dem Schema von Tabelle 2.13. Der
nH-Wert wurde jeweils vor der Zugabe von TCEP bestimmt unmittelbar danach und anschließend nach
der Zugabe von CuSO <sub>4</sub> für 2 min, his er nicht mehr weiter gesunken ist $52$
<b>Tabelle 3.2:</b> Informationen zur Primärstruktur der 13 humanen mitochondrialen Proteine. Es werden die
Summen aller Threonin/Histidin ( <b>Thr/His</b> ) und Serin/Histidin ( <b>Ser/His</b> ) Sequenzabschnitte angegeben
(jeweils von N- und C-Terminus ausgehend). In Gegenwart von Cu <sup>2+</sup> können hier Pentidspaltungen
auftreten. Die Gesamtzahl der Cystein und Methionin-Reste ( <b>Cys</b> und <b>Met</b> ) wird angegeben, ebenso wie
ihr prozentualer Anteil an der Gesamtsequenz.
<b>Tabelle 3.3:</b> Zusammenfassung der Pufferkonzentration und pH-Werte während der Alkylierung, <b>pH</b> <sub>s</sub> ist der
Soll-pH-Wert, <b>pH</b> <sub>Exp</sub> der gemessene nach Mischung der Alkvlierungslösungen. Das Protokoll der
Alkylierung ist in Abschnitt 2.5.3 aufgeführt.
Tabelle 3.4: Zusammenfassung der 13 menschlichen mitochondrial codierten Proteine. Neben dem
theoretischen isoelektrischen Punkt ( $pI_T$ ) werden das vorhergesagte Molekulargewicht ( <b>MW</b> <sub>v</sub> ), das
theoretische, maximale Molekulargewicht ( <b>MW</b> <sub>T max</sub> ) und die Differenz zwischen beiden angegeben. Das

#### Tabellenverzeichnis

<b>MW</b> <sub>T_max</sub> bezieht sich auf einen vollständigen Austausch aller Methioninreste ge	gen HPG und
anschließender vollständiger Desthiobiotinylierung aller HPG-Reste in der CuAA	C60
Tabelle 3.5: Zusammenfassung der mitochondrialen Proteine, die in dieser Arbeit im V	Nestern Blot per
Antikörper nachgewiesen werden sollten. Für weitere Details zu den Antikörper	n siehe Abschnitt 2.1.2.
$\mathbf{MW}_{V}$ : vorhergesagtes Molekulargewicht. $\mathbf{MW}_{real}$ : beobachtetes Molekulargewic	ht64
Tabelle 3.6: Die Tabelle fasst alle Peptide aus mitochondrialen Proteinen zusammen,	die in den drei
Durchgängen D <sub>a</sub> , D <sub>b</sub> und D <sub>c</sub> gemessen wurden. Die Proteine Cytochrom b, Cox1,	Cox2 und Cox3 sind die
einzigen Proteine, die in mehr als einem Durchgang in P1 gemessen wurden. ND	4 hingegen ist das einzige
mitochondriale Protein, das nur einmal (in D <sub>b</sub> ) nachgewiesen wurde und wurde	der Tabelle aus diesem
Grund manuell hinzugefügt.	70
Tabelle 3.7: Zusammenfassung des Einbaunachweises von HPG in mitochondriale Pro	teine. Das CuAAC-
Produkt HPG-Desthiobiotin wurde in allen drei Durchgängen in verschiedenen P	eptiden nachgewiesen.
Die Spalte "Wahrscheinlichkeit der Lokalisation" zeigt die jeweilige Peptidseque	nz und einen Wert von 0-
1 (0-100%) für jede Modifikation, der die Wahrscheinlichkeit der Positionierung	der Modifikation an der
jeweiligen Stelle angibt. Ist diese Wahrscheinlichkeit >90%, wird die Positionsen	sprechung in der
Primärstruktur des Proteins angegeben	72
Tabelle 4.1: Zusammenfassung der experimentalen Bedingungen der Autoradiogramm	ne in Abbildung 4.2. <b>81</b>
Tabelle 4.2: Darstellung von pH-Werten, die im Zuge der Erstellung einiger TCEP-Stam	ımlösungen gemessen
wurden. Bei 600 mM beider Puffer nähert sich der gemessene pH-Wert dem pK	S-Wert an89
Tabelle 6.1: Vollständige Auflistung eines in silico-Verdaus der 13 mitochondrialen Pro	oteine mit Trypsin.
Angegeben sind alle Peptide mit mehr als 7 Aminosäuren, da dies die Mindestlä	nge für eine Zuordnung in
der massenspektrometrischen war. Da es sich um sehr hydrophobe Proteine ha	ndelt, ist es umso
unwahrscheinlicher, dass ein Peptid eluiert und detektiert wird, je länger es ist.	Zu beachten ist
außerdem, dass dieser theoretische Verdau vollständig ist. In der Realität werde	n nicht alle Schnittstellen
verdaut, weshalb die gemessenen Peptide von der Vorhersage abweichen könne	en 113
Tabelle 6.2: Vollständige Auflistung eines in silico-Verdaus der 13 mitochondrialen Pro	oteine mit Chymotrypsin.
Angegeben sind alle Peptide mit mehr als 7 Aminosäuren, da dies die Mindestlä	nge für eine Zuordnung in
der massenspektrometrischen war. Chymotrypsin scheidet sehr häufig, was zu v	ielen kleinen Peptiden
führt. Allerdings geht dadurch bei einem vollständigen Verdau der Proteine ein g	großer Anteil der
Primärstruktur verloren, weil die Peptide zu klein werden. Zu beachten ist, dass	dieser theoretische
Verdau vollständig ist. In der Realität werden nicht alle Schnittstellen verdaut, w	eshalb die gemessenen
Peptide von der Vorhersage abweichen können.	
Tabelle 6.3: Auflistung der vollständigen Namen der Kupfer-Liganden auf Basis Tris (tr	iazolylmethyl)amin nach
(Besanceney-Webler et al., 2011)	

#### Danksagung

An erster Stelle bedanke ich mich bei Prof Dr. Stefan Jakobs, sowohl für die die Betreuung und die Übernahme des Referats meiner Arbeit, als auch für Möglichkeit, in seiner Arbeitsgruppe unabhängig an diesem spannenden Projekt arbeiten zu können. Die wissenschaftlichen Diskussionen haben mich sehr unterstützt und viel zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

PD Dr. Thomas Teichmann danke ich für die Übernahme des Koreferats meiner Arbeit und seine Hilfsbereitschaft in den Diskussionen.

Ich bedanke mich bei Prof. Dr. Blanche Schwappach, Prof. Dr. Peter Rehling, Prof. Dr. Ralph Kehlenbach und Prof. Dr. Gerhard Braus für die Bereitschaft, Mitglieder meiner Prüfungskommission zu sein.

Ich danke Prof. Dr. Dr. Stefan W. Hell für die freundliche Aufnahme in die Abteilung NanoBiophotonik.

Bei Prof. Dr. Henning Urlaub bedanke ich mich für die hilfreichen Diskussionen zur Massenspektrometrie und bei Monika Raabe und Uwe Pleßmann für die Messung zahlreicher Proben.

Ich danke Dr. Vladimir Belov und der Chemie-Facility für die Synthese des Farbstoffes KK114-Azid.

Meinem Kollegen Christian Brüser danke ich herzlich für seine große Hilfsbereitschaft, das Korrekturlesen meiner Arbeit und die gute Arbeitsplatz-Nachbarschaft.

Mein Dank gilt allen Mitgliedern der AG Jakobs für das freundliche Miteinander und die entspannte Atmosphäre im Labor wie auch bei Unternehmungen außerhalb.

Ich danke Rita Schmitz-Salue für die stets harmonierende Schreibplatz-Nachbarschaft, für unzählige Hilfen und darüber hinaus ihr, Ellen Rothermel, Tanja Gilat, Maria Sermond und Cornelia Heistermann für die unermüdliche Arbeit, den Laborbetrieb am Laufen zu halten. Dasselbe gilt für Sylvia Löbermann, der ich zudem sehr für das akribische Lesen meiner Arbeit danke.

Auch Jaydev Jethwa danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Von Herzen danke ich meiner Freundin Daniela, die mich seit vielen Jahren und so auch während dieser Arbeit mit all ihren Hochs und Tiefs begleitet und immer zu mir hält. Ihr Rückhalt gibt mir stets die nötige Kraft.

Von großer Bedeutung ist mir auch der Dank an meine Eltern dafür, dass sie immer hilfsbereit und für mich erreichbar sind.

## Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Moritz Fabian Heuser
Geburtsdatum und -ort:	23.06.1985 in Hamburg
Staatsangehörigkeit	Deutsch
Promotion	
06/2012 – 05/2017	<ul> <li>Georg-August-Universität Göttingen, Arbeit angefertigt am Max-</li> <li>Planck-Institut für biophysikalische Chemie in Göttingen, betreut von</li> <li>Prof. Dr. Stefan Jakobs (Arbeitsgruppe Struktur und Dynamik von</li> <li>Mitochondrien) in der Abteilung NanoBiophotonik von Prof. Dr. Dr.</li> <li>Stefan Hell.</li> <li>Titel der Doktorarbeit: "Etablierung eines Nachweisverfahrens zur</li> <li>Untersuchung der räumlichen und zeitlichen Verteilung mitochondrial</li> <li>translatierter Proteine mit hochauflösender STED-Mikroskopie durch</li> <li>metabolische Markierung mit nicht-kanonischen Aminosäuren"</li> </ul>
Hochschulstudium	
10/2009 - 09/2011	Philipps-Universität Marburg, Master-Studium Molecular and Cellular
	Biology. Abschluss: Master of Science
10/2005 – 09/2008	Universität Hamburg, Bachelor-Studium Biologie. Abschluss Bachelor
	of Science
Schulbildung	
1996-2005	Gymnasium Grootmoor, Hamburg. Abschluss: Allgemeine
	Hochschulreife
1992-1996	Grundschule Strenge, Hamburg

Praktika	
07/2010 - 08/2010	Praktikum im Max-Planck-Institut für biophysikalische Chemie in
	Göttingen, Arbeitsgruppe Struktur und Dynamik von Mitochondrien
	von Prof. Dr. Stefan Jakobs, Abteilung NanoBiophotonik von Prof. Dr.
	Dr. Stefan Hell
10/2008 - 03/2009	Praktikum bei der Beiersdorf AG, Hamburg, im Bereich Forschung und
	Entwicklung/Körperpflege
08/2007 –09/2007	Praktikum beim Alfred Wegener Institut für Polar- und
	Meeresforschung in der biologischen Anstalt auf Helgoland im Bereich
	der mikrobiellen Ökologie
Beschäftigungen	
05/2009 – 07/2009	Nachhilfeunterricht für Chemie im Studienkreis Poppenbüttel,
	Hamburg
Semesterbegleitend	Begleitung fachbezogener Lehrveranstaltungen als Tutor (Universität
2007, 2008	Hamburg, Fachbereich Biologie)
Wintersemester 2006, 2007	Mitgestaltung der Orientierungseinheit für Erstsemester (Universität
	Hamburg, Fachbereich Biologie)
Sprachkenntnisse	
Englisch	Flüssig in Wort und Schrift, auch in der Fachsprache, u.a. Bachelor
	Thesis in englischer Sprache
Französisch	DELF-Diplom Niveau B1 des europäischen Referenzrahmens
	(04/2009)

### EDV-Kenntnisse

MaxQuant&Perseus (Prof. Dr. Jürgen Cox, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) Imspector (Abberior Instruments) Leica Application Suite – *Advanced Fluorescence* Photoshop MS Office

Göttingen, den 22.06.2017