

*Funktionen charakteristischer
Sequenzmotive endogener und
toxischer mitochondrialer Proteine*

**Dissertation zur Erlangung
des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)**

Fakultät Naturwissenschaften
Universität Hohenheim

Institut für Mikrobiologie

vorgelegt von

Panagiotis Papatheodorou
aus Ludwigsburg

2006

Dekan: **Prof. Dr. rer. nat. Heinz Breer**
1. berichtende Person: **Prof. Dr. rer. nat. Joachim Rassow**
2. berichtende Person: **Prof. Dr. rer. nat. Lutz Graeve**
Eingereicht am: **01.08.2006**
Mündliche Prüfung am: **01.12.2006**



Die vorliegende Arbeit wurde am **02.11.2006** von der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim als „Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften“ angenommen.

*„Studiere die Dinge dieser Welt, es ist die Pflicht deines Berufes;
aber schau sie nur mit einem Auge an, dein anderes Auge auf das
ewige Leben gerichtet! Höre die Gelehrten, aber nur mit einem
Ohr!“*

André Ampère (1775-1836), französischer Physiker und Mathematiker

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1. Intrazelluläre Lokalisationsmechanismen von Proteinen in Eukaryonten	2
1.2. Biogenese mitochondrialer Vorstufenproteine	4
1.2.1. Mitochondriale Zielerkennungssignale	5
1.2.2. Mitochondriale Zielerkennung und Translokation in Mitochondrien	7
1.2.3. Submitochondriale Translokations- und Insertionsmechanismen	10
1.3. Das Map-Toxin enteropathogener <i>Escherichia coli</i> – Stämme	13
1.4. Metabolit – Translokatoren der mitochondrialen Innenmembran	15
2. Material und Methoden	18
2.1. Material	18
2.1.1. Geräte	18
2.1.2. Chemikalien und Enzyme	19
2.1.3. Verwendete <i>E. coli</i> – und <i>S. cerevisiae</i> – Stämme	22
2.1.4. DNA-Vektoren	23
2.1.5. Antikörper	24
2.1.6. Weitere Materialien	24
2.1.7. Angewandte Computerprogramme und Internetressourcen	25
2.2. Methoden	26
2.2.1. Molekularbiologische Methoden	26
2.2.1.1. Isolierung von Plasmid – DNA aus <i>E. coli</i>	26
2.2.1.2. Photometrische Bestimmung der DNA – Konzentration	27
2.2.1.3. Aufkonzentrieren der DNA durch Ethanolfällung	27
2.2.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA – Fragmenten	27
2.2.1.5. Isolierung von DNA – Fragmenten aus einem Agarosegel	28
2.2.1.6. Spaltung von DNA – Molekülen mit Restriktionsendonukleasen	29
2.2.1.7. Verknüpfen von DNA – Fragmenten mit der T4 – DNA – Ligase	29
2.2.1.8. Herstellung kompetenter <i>E.coli</i> – Stämme	30

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.9. Transformation von DNA in kompetente <i>E.coli</i> – Zellen	30
2.2.1.10. Amplifikation von DNA mit der Polymerase – Kettenreaktion (PCR)	31
2.2.1.11. Aufreinigung von PCR – Produkten	32
2.2.1.12. PCR-basierte, zielgerichtete DNA-Mutagenese (<i>QuikChange™</i>)	32
2.2.1.13. Klonierungsstrategien	34
2.2.2. Zellbiologische Methoden	39
2.2.2.1. Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	39
2.2.2.2. Herstellung kompetenter Hefezellen	39
2.2.2.3. Transformation von DNA in Hefezellen	39
2.2.2.4. Isolierung von Mitochondrien aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
2.2.2.5. Isolierung von Mitochondrien aus der Leber von <i>Rattus norvegicus</i>	41
2.2.2.6. Proteinexpression in <i>E.coli</i>	42
2.2.2.7. Proteinexpression in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
2.2.2.8. Test auf Vitalität von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
2.2.2.9. <i>In vitro</i> Import von Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien	44
2.2.2.10. Selektives Öffnen der mitochondrialen Aussenmembran	45
2.2.3. Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.3.1. Denaturierende Auftrennung von Proteinen (SDS – PAGE)	46
2.2.3.2. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western Blot)	47
2.2.3.3. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure	48
2.2.3.4. Native Auftrennung von Proteinkomplexen (BN – PAGE)	48
2.2.3.5. Denaturierende Auftrennung von Proteinkomplexen (2D – PAGE)	50
2.2.3.6. <i>In vitro</i> Synthese radioaktiv markierter Proteine	50
2.2.3.7. Aufreinigung von Proteinen aus Einschlusskörperchen von <i>E. coli</i>	51
2.2.3.8. Chemisches Quervernetzen von mitochondrialen Proteinen	51
2.2.3.9. Degradation mitochondrialer Oberflächenproteine mit Trypsin	52
2.2.3.10. Degradation von Vorstufenproteinen mit Proteinase K	53
2.2.3.11. Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranproteine	53
2.2.3.12. Koimmunfällung von Proteinen mit Protein A Microbeads	54
2.2.4. Proteinanalytische Methoden	55
2.2.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	55

Inhaltsverzeichnis

2.2.4.2. Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie	55
2.2.4.3. Färben von Proteinen auf Nitrozellulose mit Ponceau S	56
2.2.4.4. Detektion radioaktiv markierter Proteine durch Autoradiographie	56
2.2.4.5. Detektion von Proteinen durch Antikörpernachweis	56
2.2.5. Mikroskopische Methoden	57
2.2.5.1. <i>In vivo</i> Färbung von Hefemitochondrien mit MitoTracker	57
2.2.5.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen	57
2.2.6. Immunologische Methoden	58
2.2.6.1. Immunisieren von Kaninchen	58
2.2.6.2. Ausbluten von Kaninchen zur Antikörpergewinnung	58
3. Ergebnisse	60
3.1. Mitochondriale Zielerkennung des Map-Toxins enteropathogener <i>E. coli</i>	60
3.1.1. Das Map-Toxin ist zur Translokation in isolierte Mitochondrien befähigt	60
3.1.2. Das Map-Toxin verwendet den TOM-Komplex für den Eintritt in Mitochondrien	64
3.1.3. Der N-Terminus des Map-Toxins weist Gemeinsamkeiten mit Präsequenzen mitochondrialer Proteine der Matrix auf	69
3.1.4. Das Map-Toxin wird über den TIM23-Komplex in die Matrix der Mitochondrien importiert	70
3.1.5. Der N-Terminus des Map-Toxins ist für die mitochondriale Zielerkennung notwendig und hinreichend	74
3.1.6. Die mitochondriale Lokalisation des Map-Toxins hat morphologische Veränderungen der Mitochondrien zur Folge	78
3.1.7. Die Map-vermittelte Fragmentierung der Mitochondrien führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials	80
3.1.8. Der Aminosäureabschnitt 101-152 des Map-Toxins ist essentiell für die Fragmentierung der Mitochondrien	81
3.1.9. Die Map-vermittelte Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks geschieht unabhängig von Komponenten der mitochondrialen Spaltungsmaschinerie	83
3.1.10. Die Auswirkungen des Map-Toxins auf die Morphologie der Mitochondrien erhöhen nicht die Zytotoxizität	85

Inhaltsverzeichnis

3.1.11. Das in Map-Homologen konservierte WXXXE-Motiv ist essentiell für die cytosolische Toxizität des Map-Toxins	87
3.1.12. Das WXXXE-Motiv ist für die Map-vermittelte Spaltung der Mitochondrien erforderlich	89
3.2. Zielerkennung endogener Metabolit-Translokatoren der mitochondrialen Innenmembran	92
3.2.1. Die N-terminale Präsequenz des Citrat-Translokators ist nicht an der mitochondrialen Zielerkennung beteiligt	92
3.2.2. Die <i>Carrier Signature</i> des Dicarboxylat-Translokators ist nicht für die mitochondriale Zielerkennung erforderlich	96
3.2.3. Die <i>Carrier Signature</i> ist nicht an der Anbindung des Dicarboxylat-Translokators an den Tim9/Tim-10-Komplex beteiligt	100
3.2.4. Die <i>Carrier Signature</i> stimuliert die Insertion des Dicarboxylat-Translokators in die mitochondriale Innenmembran	104
3.2.5. Die Assemblierung des Dicarboxylat-Translokators zu einem Dimer geschieht unabhängig von der <i>Carrier Signature</i>	109
3.2.6. Die <i>Carrier Signature</i> ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Transportaktivität des Dicarboxylat-Translokators	116
4. Diskussion	121
4.1. Rolle von Sequenzmotiven bei der Biogenese mitochondrialer Metabolit-Translokatoren	122
4.1.1. Die Rolle der konservierten <i>Carrier Signature</i> mitochondrialer Metabolit-Translokatoren in Zielerkennung und Funktion	122
4.1.2. Die Funktion der Präsequenz mitochondrialer Metabolit-Translokatoren	124
4.2. Sequenzmotive des Map-Toxins enteropathogener <i>E. coli</i> – Stämme für Zielerkennung und Funktion	126
4.2.1. Mechanismen der mitochondrialen Zielerkennung des Map-Toxins und dessen Translokation in Mitochondrien	127
4.2.2. Auswirkungen des Map-Toxins in Mitochondrien und im Cytosol	128

Inhaltsverzeichnis

5. Zusammenfassung / Summary **132**

6. Literaturverzeichnis **134**

Abkürzungsverzeichnis

Lebenslauf

Publikationsliste

Danksagung

1. Einleitung

Zahlreiche Proteine einer eukaryontischen Zelle müssen nach ihrer Synthese im Cytosol in Mitochondrien befördert werden, um dort ihre Funktion auszuüben. Darüber hinaus konnten in jüngster Zeit auch mehrere bakterielle und virale Toxine identifiziert werden, die in der Lage sind, in Mitochondrien von Wirtszellen zu gelangen. Die Aufklärung der hierfür notwendigen mitochondrialen Transportmechanismen ist bis heute ein aktueller Forschungsgegenstand vieler Arbeitsgruppen auf der Welt. Während einige Aspekte der mitochondrialen Zielerkennung sehr detailliert aufgeklärt werden konnten, sind dennoch viele fundamentale Fragen bislang offen geblieben. Im ersten Teil der vorliegenden Dissertation sollte der mitochondriale Zielerkennungsmechanismus eines bakteriellen Toxins aufgeklärt werden und zusätzlich Anhaltspunkte für dessen Funktion in Mitochondrien gewonnen werden. Hierbei handelt es sich um das Protein Map aus enteropathogenen *Escherichia coli* – Stämmen, welches nach Abgabe in die Wirtszellen in der Lage ist, mit den Mitochondrien des Wirtes zu wechselwirken. Diese Arbeit stellt die erste systematische Untersuchung der mitochondrialen Zielerkennung und Funktion eines bakteriellen Toxins in Mitochondrien dar. Als zusätzliche Aufgabe sollte die mitochondriale Zielerkennung von Metabolit-Translokatoren der Innenmembran von Mitochondrien näher untersucht werden. Diese Proteine erlauben den spezifischen Austausch von Metaboliten zwischen Mitochondrien und dem Cytosol. Bisher konnten keine mitochondrialen Zielerkennungsmotive von Metabolit-Translokatoren ausfindig gemacht werden. Die Rolle einer in allen Metabolit-Translokatoren konservierten Aminosäuresequenz, der *Carrier Signature*, sowie einer in manchen Metabolit-Translokatoren aus Säugetieren und Pflanzen vorkommende Präsequenz, sollte in Bezug zur mitochondrialen Zielerkennung, Biogenese und Funktion näher untersucht werden. Als Modellproteine dienten hierbei der Dicarboxylat-Translokator aus *Saccharomyces cerevisiae* und der Citrat-Translokator aus *Rattus norvegicus*.

1.1. Intrazelluläre Lokalisationsmechanismen von Proteinen in Eukaryonten

Eukaryontische Zellen weisen im Gegensatz zu Prokaryonten eine hohe Kompartimentierung auf. Die unterschiedlichen Kompartimente oder Zellorganellen werden durch eine Lipidmembran vom Cytosol der Zelle abgegrenzt. Damit ist eine räumliche Trennung von enzymatischen Funktionen die separat ablaufen müssen sichergestellt (Nakamura & Hase, 1990-91). Zu den wichtigsten von einer Membran umschlossenen Kompartimenten gehören das endoplasmatische Retikulum, der Nukleus, Mitochondrien, Lysosomen, Endosomen, Peroxisomen und bei pflanzlichen Zellen zusätzlich die Chloroplasten. Proteine, welche ihre Funktion in einem speziellen Zellkompartiment ausüben, müssen zunächst im Cytosol hergestellt und danach in das jeweilige Kompartiment befördert werden (Wickner & Schekman, 2005). Nur wenige Proteine befinden sich bereits nach der Synthese im Zielkompartiment. Dies ist bei Mitochondrien und Chloroplasten der Fall, denn diese Organellen verfügen über eigene DNA, welche die Gene für eine kleine Anzahl an Proteinen enthalten.

Erst in den siebziger Jahren des 20. Jahrhunderts wurde von Günther Blobel eine Hypothese aufgestellt zu der Frage, wie die im Cytosol hergestellten Proteine an ihren späteren Aufenthaltsort gelangen. Er postulierte, dass Proteine Signalsequenzen aufweisen, die von Rezeptoren der Zellorganellen erkannt werden. Die Erkennung der Signalsequenz durch einen Rezeptor ermöglicht unter Verbrauch von Energie den Eintritt des Proteins in die Organelle über eine hierfür spezialisierte Translokationsmaschinerie. Signalsequenzen können aus einer kurzen Kette aus Aminosäuren bestehen und intern oder am Ende eines Polypeptides lokalisiert sein. Alternativ können separat gelegene Aminosäuren erst in der Tertiärstruktur räumlich aufeinander treffen und dadurch ein Lokalisationssignal erzeugen (Lingappa & Blobel, 1980; Simon, 1993). Günther Blobels Hypothese hatte sich als richtig erwiesen und er wurde im Jahr 1999 mit dem Nobelpreis geehrt. Die unterschiedlichen Topologien von Lokalisationssignalen sind in Abb. 1.1.1. schematisch dargestellt.

Einleitung

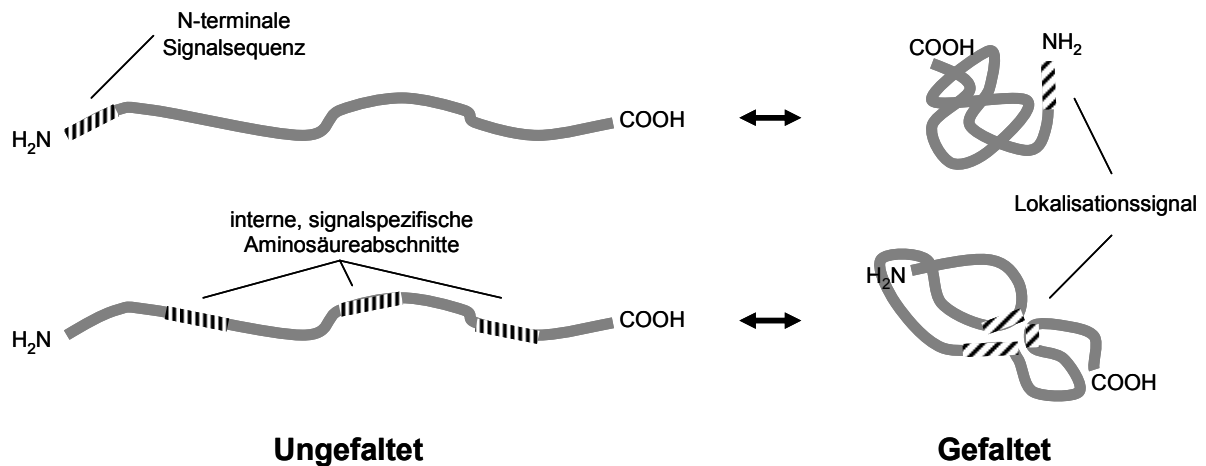


Abb. 1.1.1.: Schematische Darstellung von Lokalisationssignalen. In Anlehnung an *Molecular Biology of the Cell* (Alberts et al.).

Der Transport von Proteinen in unterschiedliche Zellkompartimente kann in drei unterschiedliche Typen eingeteilt werden. (I) Im Cytosol synthetisierte Kernproteine gelangen in den Nukleus direkt über die großen Kernporen (*gated transport*), welche ebenfalls die Diffusion von kleinen Molekülen zwischen den beiden Kompartimenten erlauben. Die Topologie von Cytosol und Nukleus ist in diesem Fall äquivalent und es ist daher keine Überquerung einer Membran notwendig (Pemberton & Paschal, 2005). (II) Der Transport von Vorstufenproteinen aus dem Cytosol in topologisch unterschiedliche Zellzwischenräume, wie z.B. endoplasmatisches Retikulum, Mitochondrien, Chloroplasten und Peroxisomen, erfordert die Überquerung einer Membran und verläuft mit Hilfe von membrangebundenen Proteintranslokatoren (*transmembrane transport*). Hierbei werden die Vorläuferproteine in einem entfalteten Zustand in das Zielkompartiment transloziert (Swanton & Bulleid, 2003; Baker & Sparkes, 2005; Heiland & Erdmann, 2005; Gutensohn, 2006; Mokranjac & Neupert, 2005). (III) Proteine können in einer Membran eingeschlossen und dann aus einem Zellkompartiment abgeschnürt werden. Die Fusion des Membranvesikels mit der Membran des Zielkompartimentes ermöglicht die Freisetzung des eingeschlossenen Proteins und somit den Proteintransport zwischen zwei Zellorganellen (*vesicular transport*). Als Beispiel kann hierbei der Transport von Proteinen zwischen endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat genannt werden (Mancias & Goldberg, 2005). Die unterschiedlichen Typen des intrazellulären Proteintransports sind in Abb. 1.1.2. dargestellt.

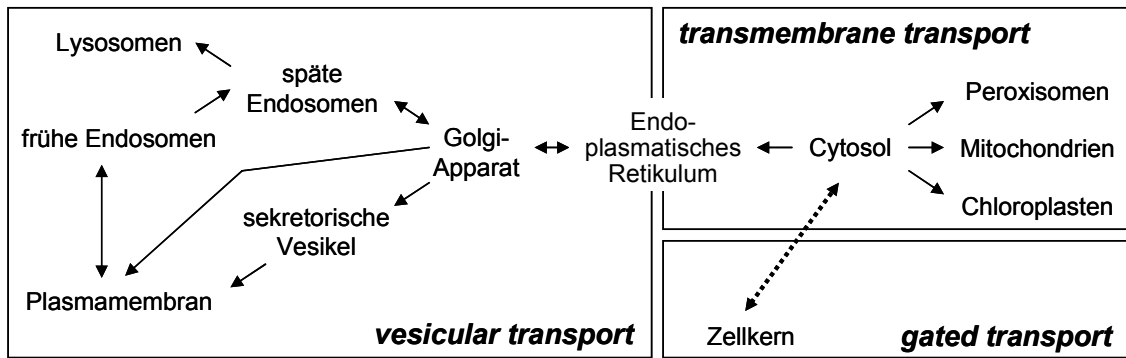


Abb. 1.1.2.: Schematische Darstellung von unterschiedlichen Typen des intrazellulären Proteintransports. In Anlehnung an *Molecular Biology of the Cell* (Alberts et al.).

Bakterielle oder virale Toxine können in eukaryontischen Zellen eine hohe Diversität an Funktionen aufweisen. Mitunter ist der vorherige Transport eines nicht-endogenen Proteins in ein bestimmtes intrazelluläres Kompartiment notwendig, damit es seine Funktion entfalten kann. Hierbei stellt sich die Frage, welche Mechanismen von Bakterien oder Viren entwickelt worden sind, damit deren abgegebene Toxine in das intrazelluläre Kompartiment gelangen können, in dem sie ihre Funktion entfalten sollen. Das an Mitochondrien lokalisierte Map-Toxin enteropathogener *E. coli* – Stämme stellt im Rahmen dieser Arbeit das erste bakterielle Protein dar, dessen mitochondrialer Zielerkennungsmechanismus im Detail aufgeklärt werden soll. Die fundamentale Frage hierbei lautet, ob die zellulären Zielerkennungs- und Translokationsmechanismen in diesem speziellen Fall umgangen oder nachgeahmt werden.

1.2. Biogenese mitochondrialer Vorstufenproteine

Die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine wird im Cytosol hergestellt und posttranslational in ungefaltetem Zustand in die Mitochondrien importiert. Mitochondriale Proteine können vier mitochondriale Subkompartimente als Bestimmungsort haben. Die äußere oder innere Membran, den Intermembranraum und die Matrix der Mitochondrien. Unabhängig vom letztendlichen Bestimmungsort müssen alle mitochondrialen Proteine zunächst von Rezeptoren der mitochondrialen Außenmembran erkannt werden. Da mitochondriale Proteine unterschiedliche Typen an mitochondrialen Zielerkennungsmotiven aufweisen können, sind seitens der Mitochondrien mehrere, spezialisierte Rezeptoren für die Erkennung eines

bestimmten Zielerkennungsmotives notwendig. Für die Translokation von erkannten Vorstufenproteinen über die äußere und innere Membran der Mitochondrien, sowie für die Insertion von Außen- bzw. Innenmembranproteinen sind jeweils spezialisierte und in den Membranen verankerte Proteinkomplexe erforderlich (Mokranjac & Neupert, 2005; Perry & Lithgow, 2005).

1.2.1. Mitochondriale Zielerkennungssignale

Für die Erkennung durch Rezeptoren der mitochondrialen Außenmembran sind seitens der zu importierenden Vorläuferproteine Signalsequenzen notwendig. Zielerkennungssignale können zugleich die Information für die submitochondriale Sortierung eines importierten Proteins beinhalten. Es konnten unterschiedliche Typen von mitochondrialen Zielerkennungssignalen ausfindig gemacht werden (Endo, 2003).

Matrix-Proteine, sowie manche Proteine der Innenmembran besitzen eine N-terminale, alpha-helikale und abspaltbare Präsequenz. Die Präsequenz kann eine Länge von bis zu 40 Aminosäuren aufweisen und enthält mehrere positiv geladene Aminosäuren. Die positiven Ladungen sind auf einer Seite der Alpha-Helix ausgerichtet, während die gegenüberliegende Seite hauptsächlich hydrophobe Aminosäurereste aufweist. Manche Vorstufenproteine besitzen eine zusätzliche, hinter der N-terminalen Präsequenz gelegene Transmembrandomäne, welche zur Insertion des Proteins in die Innenmembran führt. Bei Proteinen des Intermembranraumes kann die Transmembrandomäne eine endständige, zusätzliche Spaltstelle für mitochondriale Proteasen des Intermembranraumes enthalten. Nach Abspaltung der in der Innenmembran inserierten Transmembrandomäne kann das prozessierte Vorstufenprotein in den Intermembranraum entlassen werden (Omura, 1998). Das Map-Toxin enteropathogener *E. coli* weist einen Aminoterminus mit auffälligen Ähnlichkeiten zu N-terminalen Präsequenzen endogener, mitochondrialer Proteine auf. Darüber hinaus weisen manche Metabolit-Translokatoren der mitochondrialen Innenmembran aus Pflanzen und Säugetieren, denen auch der Citrat-Translokator aus *Rattus norvegicus* angehört, ebenfalls eine N-terminale Präsequenz auf. Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich unter anderem mit der Frage, ob es sich in beiden Fällen tatsächlich um mitochondriale Zielerkennungssequenzen handelt.

Die meisten Mitglieder der Familie der Metabolit-Translokatoren der mitochondrialen Innenmembran besitzen in der Regel bis auf wenige Ausnahmen keine N-terminale Präsequenz. Es wird davon ausgegangen, dass interne Sequenzabschnitte innerhalb der sechs hydrophoben Transmembrandomänen von Translokatorproteinen für die Erkennung durch Rezeptoren der Außenmembran zuständig sind. Diese konnten bisher nicht identifiziert werden (de Marcos-Lousa, 2006). In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob ein in allen mitochondrialen Metabolit-Translokatoren konserviertes Motiv, die so genannte *Carrier Signature*, an der mitochondrialen Zielerkennung und Biogenese beteiligt ist.

Mitochondriale Proteine, welche in die Außenmembran inseriert werden, weisen eine N- oder C-terminale, alpha-helikale Transmembrandomäne auf, welche als Membrananker dient. Poren bildende Proteine der äußeren Membran werden über β -Faltblattstrukturen in die Membran eingebaut. An der Rezeptorerkennung von β -Faltblattproteinen der Außenmembran scheint die Tertiärstruktur und nicht ein lineares Sequenzmotiv von Bedeutung zu sein (Müller, 2002; Rapaport, 2005).

Die unterschiedlichen Typen von mitochondrialen Zielerkennungssignalen sind in Abb. 1.2.1.1. dargestellt.

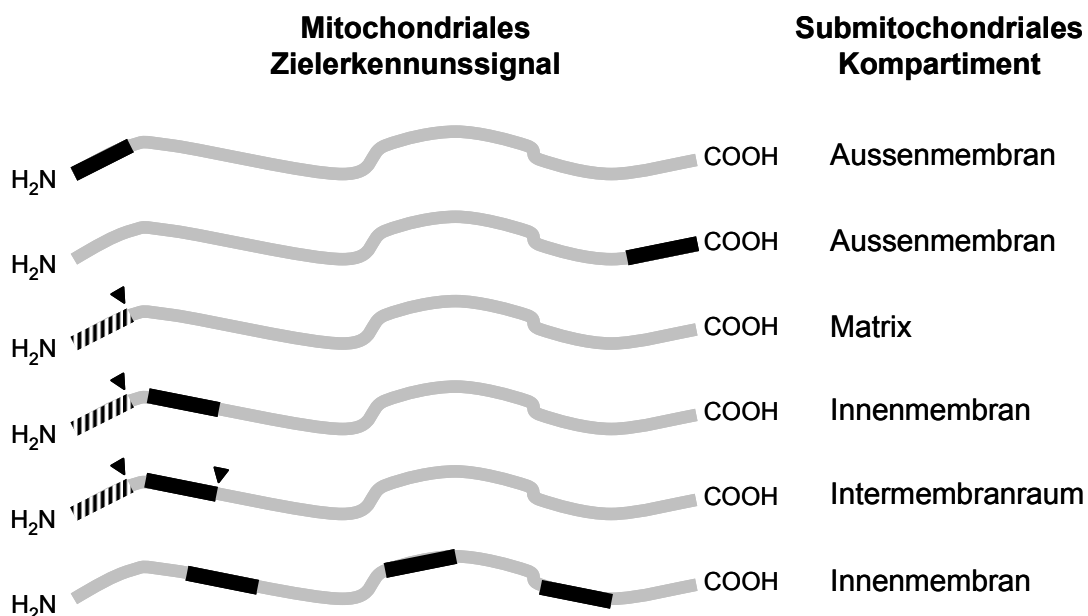


Abb. 1.2.1.1.: Schematische Darstellung typischer mitochondrialer Zielerkennungssignale von Vorstufenproteinen. N-terminale, positiv geladene Präsequenzen sind schraffiert dargestellt. Transmembranhelices sind als schwarze Balken dargestellt. Pfeile deuten auf Spaltstellen mitochondrialer Peptidasen hin.

Die Erforschung der Biogenese mitochondrialer Proteine beschränkte sich in den letzten Jahrzehnten zumeist auf wenige Modellproteine. Hiermit konnten zwar bedeutende Fortschritte in der Aufklärung von fundamentalen Mechanismen in der Mitochondrien-Biogenese erzielt werden. Durch die enge Wahl an Modellproteinen ist aber die Aufklärung alternativer Zielerkennungsmechanismen in Mitochondrien stark eingeschränkt. Die vorliegende Dissertation soll einen wichtigen Beitrag zur Erweiterung des bisherigen Modells der Zielerkennung mitochondrialer Proteine liefern, indem Zielerkennungsmechanismen von Proteinen untersucht werden, welche bisher nicht standardmäßig der Erforschung der Biogenese von Mitochondrien gedient haben.

1.2.2. Mitochondriale Zielerkennung und Translokation in Mitochondrien

Alle mitochondrialen Proteine, welche über die Außenmembran der Mitochondrien in submitochondriale Kompartimente transloziert werden, verwenden hierfür eine aus mehreren Proteinen bestehende Translokationsmaschinerie, den TOM-Komplex (*translocase of the outer membrane*). Er besteht aus den Proteinen Tom40, Tom22, Tom5, Tom6, Tom7 und den beiden peripher assoziierten Proteinen Tom20 und Tom70. Das Tom40-Protein stellt im dimeren Zustand die Eintrittspforte des TOM-Komplexes für mitochondriale Vorstufenproteine dar. Es lagert sich über β -Faltblätter in die Außenmembran ein und bildet einen Kanal mit einer Größe von etwa 22 Å. Bei den Proteinen Tom20, Tom22 und Tom70 handelt es sich um die Rezeptoren des TOM-Komplexes (Rapaport, 2002). Der Tom20-Rezeptor erkennt N-terminale Präsequenzen von Vorstufenproteinen und leitet die erkannten Proteine an den Tom22-Rezeptor weiter (Moczko, 1993). Tom22 dient darüber hinaus nicht nur als Rezeptor, sondern auch als den TOM-Komplex stabilisierendes Protein (van Wilpe, 1999). Der Tom70-Rezeptor ist für die Erkennung von hydrophoben Membranproteinen der Innenmembran mit internen Zielerkennungssequenzen zuständig (Hines, 1990). Kleinere TOM-Proteine, wie Tom5, Tom6 und Tom7, sind primär an der korrekten Assemblierung des TOM-Komplexes beteiligt (Sherman, 2005).

Die im Cytosol hergestellten Vorstufenproteine werden posttranslational in die Mitochondrien importiert. Für die Assoziation von hydrophoben Vorstufenproteinen mit Mitochondrien können hierbei cytosolische Chaperonproteine notwendig sein.

Nach der Synthese im Cytosol wird eine Selbstaggregation verhindert und die Vorstufenproteine in einer für den Import in Mitochondrien kompetente Konformation gehalten. Eines der wichtigsten Chaperonproteine, welches den Import von hydrophoben Vorstufenproteinen in Mitochondrien ermöglicht, ist Hsc70. Für die Aufrechterhaltung der Kompetenz von Vorstufenproteinen zur Translokation in Mitochondrien kann auch ATP eine Rolle spielen (Rassow & Pfanner, 1996; Mihara & Omura, 1996; Asai, 2004).

Vorstufenproteine mit N-terminalen, amphipatischen Präsequenzen werden zunächst vom Tom20-Rezeptor erkannt. Helices innerhalb der Präsequenz-Bindestelle des Tom20-Rezeptors binden hierbei an die hydrophobe Seite von mitochondrialen Präsequenzen (Abe, 2000; Zara, 2005). Da die Interaktion zwischen Tom20-Rezeptor und Präsequenz von hydrophober Natur ist, ist die Annahme berechtigt, dass auch die Vorstufen von hydrophoben Innenmembranproteinen mit internen Signalsequenzen vom Tom20-Rezeptor erkannt werden. Doch es konnte festgestellt werden, dass solche Vorstufenproteine vorrangig vom Tom70-Rezeptor erkannt werden. Die Vorstufen der hydrophoben Innenmembranproteine binden in Abwesenheit von ATP an mehrere Tom70-Dimere. Tom70 fungiert neben seiner Rolle als Rezeptor auch als molekulares Chaperon, welches die Aggregation der hydrophoben Vorstufenproteine an der Oberfläche der Mitochondrien verhindert (Tokatlidis & Schatz, 1999; Tokatlidis, 2000). Definierte Sequenzmotive für die Erkennung von hydrophoben Vorstufenproteinen durch den Tom70-Rezeptor konnten bisher nicht identifiziert werden. In dieser Arbeit sollten die in allen Metabolit-Translokatoren konservierte Motive der *Carrier Signature* auf eine Rolle bezüglich der Erkennung durch den Tom70-Rezeptor untersucht werden. Manche Metabolit-Translokatoren aus Säugern und Pflanzen besitzen eine variable N-terminale Präsequenz, welche ebenfalls positive Ladungen enthält und damit den Präsequenzen mitochondrialer Matrix-Proteine ähnelt. Es ist bislang unklar geblieben, ob diese Präsequenz an der Erkennung durch Importrezeptoren beteiligt ist. Dieser Frage sollte in dieser Dissertation nachgegangen werden.

Nachdem Vorstufenproteine von Tom20 bzw. Tom70 erkannt worden sind, werden sie an den Tom22-Rezeptor weitergeleitet. Der Tom22-Rezeptor befindet sich in unmittelbarer Nähe zur Tom40-Pore und weist neben einer Transmembrandomäne, zwei lösliche Domänen auf (van Wilpe, 1999; Yano, 2000; Saeki, 2000). Die zum Cytosol exponierte Domäne des Tom22-Rezeptors weist eine hohe Anzahl an

negativ geladenen Aminosäuren auf. Es wurde daher vermutet, dass N-terminale, positiv geladene Präsequenzen mittels ionischer Wechselwirkungen mit dem Tom22-Rezeptor interagieren und die Vorstufenproteine dadurch in die Tom40-Pore weitergeleitet werden (*acid chain theory*) (Bolliger, 1995; Moczko, 1997; Schatz, 1997; Komiya, 1998). Die vorliegende Dissertation beschäftigt sich u. a. auch mit der mitochondrialen Zielerkennung des Map-Toxins enteropathogener *Escherichia coli* – Stämme. Es ist daher besonders interessant der Frage nachzugehen, ob das zur Assoziation mit Mitochondrien befähigte bakterielle Toxin ebenfalls die endogenen Zielerkennungs- und Translokationsmechanismen zu diesem Zweck verwendet. Die Rolle des N-Terminus des Map-Toxins, welches auffällige Ähnlichkeiten zu mitochondrialen Präsequenzen aufweist, sollte diesbezüglich näher untersucht werden. Der schematische Aufbau des TOM-Komplexes ist in der Abb. 1.2.2.1. dargestellt.

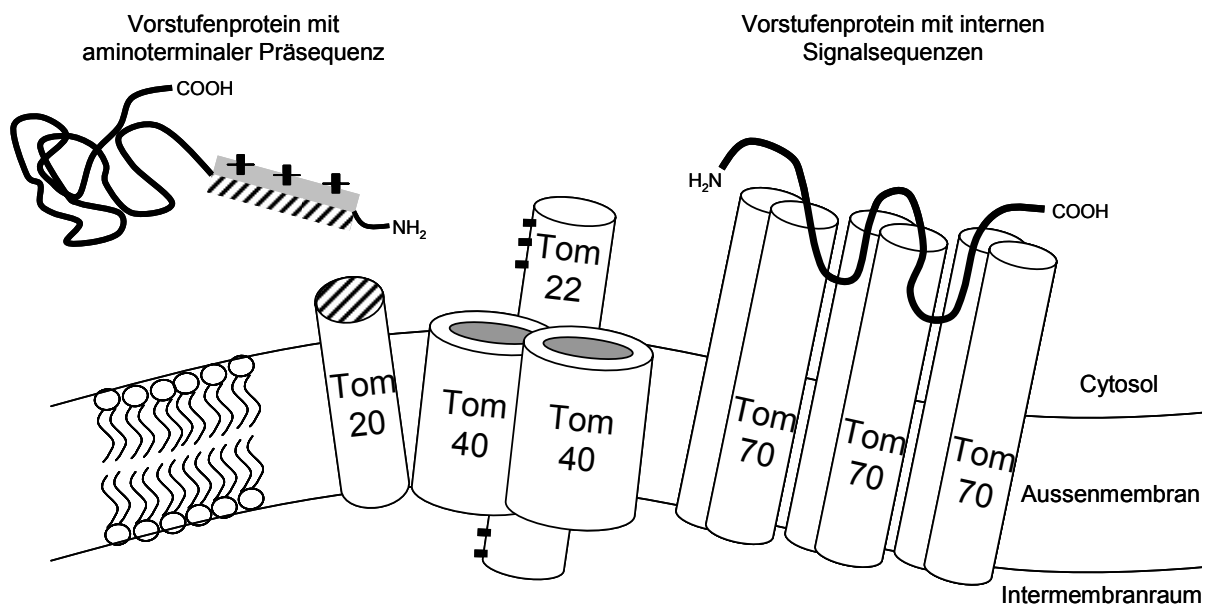


Abb. 1.2.2.1.: Schematische Darstellung des TOM-Komplexes und Modell der Zielerkennung von Vorstufenproteinen mit N-terminalen und internen Signalsequenzen. Die Proteine Tom5, Tom6 und Tom7 wurden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt. Die hydrophobe Seite mitochondrialer Präsequenzen (schraffiert) wird von der hydrophoben Erkennungsdomäne des Tom20-Rezeptors (schraffiert) gebunden und das Vorstufenprotein über ionische Wechselwirkungen an den Tom22-Rezeptor weitergegeben. Hydrophobe Innenmembranproteine mit internen Signalsequenzen werden von drei Tom70-Dimeren gebunden und während der Übergabe an Tom22 vor Aggregation geschützt. Die Vorstufenproteine gelangen über die Poren des Tom40-Dimers in den Intermembranraum.

1.2.3. Submitochondriale Translokations- und Insertionsmechanismen

Die Mehrzahl der mitochondrialen Vorstufenproteine ist an die Matrix der Mitochondrien adressiert. Matrix-Proteine werden zunächst über N-terminale Präsequenzen von Rezeptoren des TOM-Komplexes erkannt und anschließend mithilfe des TIM23-Komplexes (*translocase of the inner membrane*) an Kontaktstellen der äußeren und inneren mitochondrialen Membran in die Matrix transloziert. Der TIM23-Komplex besteht aus den integralen Innenmembranproteinen Tim23, Tim50, Tim21 und Tim17 (Dekker, 1993; Maarse, 1994; Geissler, 2002; Yamamoto, 2002; Mokranjac, 2003; Chacinska, 2005; Mokranjac, 2005). Das Tim23-Protein bildet als Dimer zwei Translokationsporen in der Innenmembran. Für die Bildung des Tim23-Dimers ist ein Membranpotential an der Innenmembran notwendig. Die Interaktion des Tim23-Proteins mit Präsequenzen führt zur Öffnung der Translokationspore nach Dissoziation des Tim23-Dimers (Bauer, 1996). Das Tim21-Protein ermöglicht die Interaktion des TIM23-Komplexes mit dem TOM-Komplex (Mokranjac, 2005). Tim50 und Tim17 sind an der Anbindung von Vorstufenproteinen im Intermembranraum beteiligt. Während der Translokation von Vorstufenproteinen in die Matrix der Mitochondrien ist der TIM23-Komplex unter Ausschluss des Tim21-Proteins mit einem weiteren Proteinkomplex, dem PAM-Komplex (*presequence translocase-associated motor*) assoziiert. Der PAM-Komplex besteht aus den Proteinen Tim44, Pam18 (Tim14), Pam17, Pam16 (Tim16), Mge1 und mtHsp70 (Kang, 1990; Maarse, 1992; Laloraya, 1994; Truscott, 2003; Mokranjac, 2003; Frazier, 2004; Kozany, 2004; van der Laan, 2005). Das mitochondriale Hitzeschockprotein mtHsp70 erzeugt unter ATP-Verbrauch gemeinsam mit dem Membranpotential der Innenmembran die notwendige Kraft zur Entfaltung und vollständigen Translokation von Vorstufenproteinen in die mitochondriale Matrix. Mge1 dient hierbei als Nukleotidaustauschfaktor (Miao, 1997). Tim44 ermöglicht die Anbindung des mtHsp70-Proteins an die Translokationspore und wird seinerseits durch die beiden miteinander interagierenden Proteine Pam16 und Pam18 hierbei stimuliert. Die beiden Proteine Pam16 und Pam18 werden ihrerseits wiederum vom Pam17-Protein stimuliert (van der Laan, 2005). Ein weiteres Protein, Zim17 (Tim15, Hep1), ist nicht Teil des PAM-Komplexes, verhindert jedoch die Aggregation des mtHsp70-Proteins und trägt somit indirekt dazu bei, die Translokation von Vorstufenproteinen in die Matrix aufrechtzuerhalten (Buri, 2004; Sichtung, 2005; Yamamoto, 2005). Nach der

Translokation in die mitochondriale Matrix wird die Präsequenz der Vorstufenproteine durch das Protein MPP (*matrix-processing peptidase*) abgespalten (Hawlitsek, 1988). An der Rückfaltung der importierten Proteine in eine funktionelle Konformation sind die Matrix-Chaperonproteine mtHsp70, mtHsp60, mtHsp10 und Cyclophilin20 beteiligt (Hohfeld & Hartl, 1994; Rassow, 1995; Martin, 1997). Der mitochondriale Präsequenz ähnelnde Aminoterminus des Map-Toxins deutet auf eine submitochondriale Lokalisation des bakteriellen Proteins in der Matrix von Mitochondrien hin. Diese Vermutung sollte in dieser Dissertation untersucht werden, sowie die Beteiligung des TIM23-Komplexes an der Translokation des Map-Toxins in Mitochondrien.

Innenmembranproteine, welche über eine einzelne Transmembrandomäne in der Membran verankert werden, verwenden für die Insertion in die Innenmembran ebenfalls den TIM23-Komplex. In diesem Fall ist der TIM23-Komplex nicht mit dem PAM-Komplex, sondern mit dem Tim21-Protein assoziiert (Chacinska, 2005). Abhängig von der Aminosäuren-Zusammensetzung der Transmembrandomäne werden die Vorstufen der Innenmembran-Proteine entweder lateral aus der Tim23-Pore direkt in die Membran entlassen oder zunächst vollständig über die Tim23-Pore transloziert und anschließend aus der Matrix in die Membran inseriert (Herrmann & Neupert, 2003; Meier, 2005). Manche Vorstufenproteine des Intermembranraumes werden vorerst ebenfalls TIM23-abhängig in die Innenmembran entlassen. Nach Abspaltung der Transmembrandomäne an einer endständigen Erkennungssequenz durch Intermembranraum-Peptidasen wird schließlich das reife Protein in den Intermembranraum entlassen. Andere Intermembranraumproteine weisen keine Transmembrandomäne auf. Solche Proteine arretieren nach der Überquerung des TOM-Komplexes im Intermembranraum durch augenblickliche Faltung in eine stabile, funktionelle Konformation (Herrmann & Hell, 2005).

Hydrophobe Innenmembranproteine mit mehreren Transmembrandomänen, denen die Mitglieder der Familie der mitochondrialen Metabolit-Translokatoren angehören, werden unter Beteiligung des TIM22-Komplexes in die Innenmembran inseriert (Tokatlidis, 2000). Der TIM22-Komplex beinhaltet die integralen Membranproteine Tim22, Tim54, Tim18, sowie das peripher assoziierte Protein Tim12 (Sirrenberg, 1996; Kerscher, 1997; Sirrenberg, 1998; Kerscher, 2000; Köhler, 2000). Das Tim22-Protein stellt den Kanal des Membrankomplexes dar (Kovermann, 2002). Für den Transfer der hydrophoben Vorstufenproteine vom TOM-Komplex zum TIM22-

Komplex ist die Überquerung des wässrigen Milieus des Intermembranraumes erforderlich. Ein löslicher, hexamerer Proteinkomplex des Intermembranraumes, bestehend aus gleichen Anteilen der beiden Proteine Tim9 und Tim10, schirmt die hydrophoben Proteinabschnitte von Vorstufen der Metabolit-Translokatoren ab und verhindert deren Aggregation im Intermembranraum. Eine Rolle der *Carrier Signature* bei der Anbindung der Vorstufenproteine von Metabolit-Translokatoren an die kleinen Tim-Proteine wurde vorgeschlagen, bisher aber noch nicht experimentell bestätigt (Endres, 1999). In der vorliegenden Dissertation sollte auf diese offene Fragestellung eingegangen und experimentell die Bedeutung der *Carrier Signature* an den Wechselwirkungen der Vorstufen der Metabolit-Translokatoren mit den kleinen Tim-Proteinen aufgeklärt werden. Die Vorstufenproteine werden durch den Tim9/Tim10-Komplex unter Beteiligung von Tim12 in die Tim22-Pore abgegeben und bei Anwesenheit des mitochondrialen Membranpotentials lateral aus dem TIM22-Komplex in die Innenmembran entlassen (Koehler, 1998; Sirrenberg, 1998; Adam, 1999; Endres, 1999; Rehling, 2003; Webb, 2006). Auf die Rolle der *Carrier Signature* an den zuletzt genannten Schritten sollte in dieser Dissertation ebenfalls eingegangen werden.

Poren bildende Außenmembranproteine, welche durch β -Faltblattstrukturen in die Membran inseriert werden, verwenden hierfür einen auf solche Proteine spezialisierten Komplex der Außenmembran, den SAM-Komplex (*sorting and assembly machinery*) oder auch TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer-membrane beta-barrel proteins*) genannt (Pfanner, 2004; Taylor & Pfanner, 2004; Paschen, 2005). Er beinhaltet die Außenmembranproteine Sam50 (Tob55), Sam35 (Tob38, Tom38), Mas37 und Mdm10 (Wiedemann, 2003; Kozjak, 2003; Meisinger, 2004; Milenkovic, 2004; Ishikawa, 2004; Gentle, 2004; Waizenegger, 2004). Die Vorstufen von β -Fass-Proteinen der Außenmembran werden zuerst über den TOM-Kanal in den Intermembranraum transloziert und letztlich unter Beteiligung des Tim9/Tim10-Komplexes bzw. Tim8/Tim13-Komplexes an den SAM/TOB-Komplex zur Insertion in die Außenmembran der Mitochondrien weitergeleitet (Wiedemann, 2004; Hoppins & Nargang, 2004). Weitere Außenmembranproteine mit N- bzw. C-terminalem Membrananker werden nach Erkennung durch Rezeptoren des TOM-Komplexes lateral aus oder an der Tom40-Pore in die Außenmembran entlassen (Rapaport, 2005; Ahting, 2005). Für das Außenmembranprotein Bcl-2 konnte jedoch

gezeigt werden, dass die Membraninsertion des Proteins unabhängig vom Tom40-Protein ist (Motz, 2002).

Die unterschiedlichen Mechanismen der submitochondrialen Sortierung und die daran beteiligten Komplexe sind schematisch in Abb. 1.2.3.1. dargestellt.

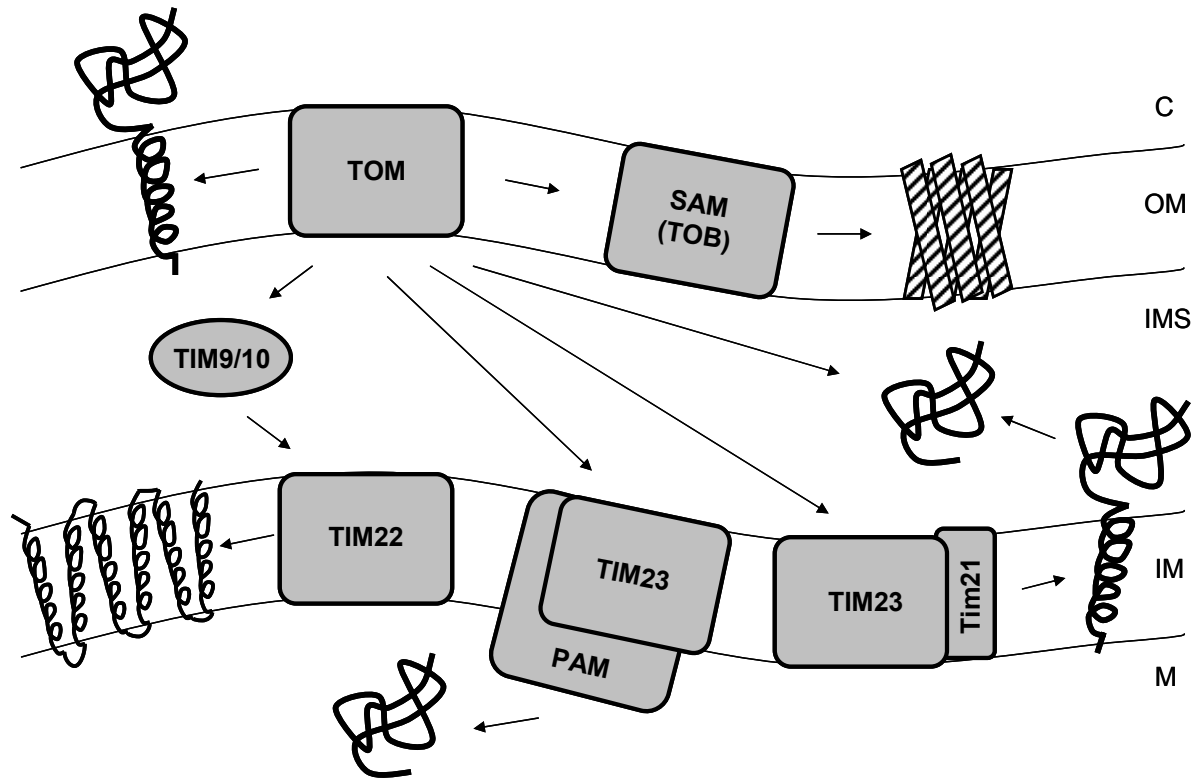


Abb. 1.2.3.1.: Schematische Darstellung von submitochondrialen Translokations- und Insertionsmechanismen. C: Cytosol, OM: Außenmembran, IMS: Intermembranraum, IM: Innenmembran, M: Matrix.

1.3. Das Map-Toxin enteropathogener *Escherichia coli* – Stämme

Das Map-Protein (*mitochondria-associated protein*) ist eines von mehreren Toxinen enteropathogener *E. coli* – Stämme (EPEC). EPECs besiedeln den menschlichen Intestinaltrakt und werden für schwere Durchfallerkrankungen verantwortlich gemacht. Durch Infektionen mit EPEC-Erregern sterben in Entwicklungsländern jährlich mehrere Tausend Kinder an der von der Diarrhöe verursachten Austrocknung des Körpers. Map wird gemeinsam mit weiteren Effektorproteinen von enteropathogenen *E. coli* – Stämmen über ein Typ-III-Sekretionssystem in die Darmepithelzellen des Wirtes injiziert, nachdem die Bakterien sich an die Zelloberfläche angelagert haben (*attachment*). Das Zusammenspiel der bakteriellen

Effektorproteine hat kennzeichnend für EPECs die Rückbildung der absorptiven Mikrovilli von Darmepithelzellen zur Folge (*effacement*). Diese von EPECs verursachten Schädigungen der Darmepithelschicht werden gemeinhin auch als A/E-Läsionen (*attachment/effacement*) bezeichnet. Die unterschiedlichen Effektorproteine, sowie die Komponenten des Typ-III-Sekretionsapparates, sind in einer chromosomalen Pathogenitätsinsel kodiert, welche als „*Locus of enterocyte effacement* (LEE)“ bezeichnet wird.

Das Map-Effektorprotein ist nach seinem Eintritt in Darmepithelzellen zum größten Teil an Mitochondrien lokalisiert. Der erste Zusammenhang zwischen dem Map-Toxin enteropathogener *E. coli* und Mitochondrien wurde von Brendan Kenny und Mark Jepson in Zellkulturexperimenten aufgestellt. Map konnte mittels Immunofluoreszenz-Mikroskopie innerhalb der Zellen an Mitochondrien lokalisiert werden (Kenny & Jepson, 2000). Ein direkter Nachweis, dass Map auch in der Lage ist in Mitochondrien zu translozieren, gelang den beiden Forschern aber nicht. Es ist jedoch bisher nicht bekannt, wie und zu welchem Zweck dies geschieht. Es konnte dabei lediglich eine Herabsetzung des mitochondrialen Membranpotentials beobachtet werden (Kenny & Jepson, 2000). Eine Überprüfung der Primärstruktur des Map-Toxins mithilfe eines Programmes zur Vorhersage mitochondrialer Proteine (MitoProt; Claros & Vincens, 1996) ergab eine nahezu 100%ige Wahrscheinlichkeit, dass es sich hierbei um ein mitochondriales Protein handelt. Das Map-Protein stellt aber ein bakterielles Toxin mit unterschiedlichen Funktionen innerhalb der Wirtszelle dar. Neben der mitochondrialen Lokalisation wurden auch Funktionen des Map-Toxins im Cytosol der Wirtszelle beschrieben. Dazu gehört die Umlagerung des Zytoskeletts durch Stimulierung des kleinen GTPase-Proteins Cdc42, was schließlich zur Aktinpolymerisation und Ausbildung von Filopodien führt. Zunächst wurde postuliert, dass das Map-Toxin einen Nukleotidaustauschfaktor darstellt, der das Cdc42-Protein in seine GTP-gebundene, aktive Form zu überführen vermag (Kenny, 2002). In einer späteren Arbeit wurde gezeigt, dass das Map-Toxin zu einer Familie von bakteriellen Effektorproteinen gehört, welche Ras-ähnliche GTPasen nachahmen. Es handelt sich hierbei um strukturelle Mimikry, da Mitglieder der bakteriellen Proteinfamilie keine GTPase-Domänen besitzen und die gleiche Funktion ohne Bindung von Guanosidnukleotiden ausüben. Das Map-Toxin ahmt diesen Daten zufolge das Protein Cdc42 in seiner aktiven Form nach, statt es zu aktivieren (Alto, 2006). In zwei unabhängigen Arbeiten wurde darüber hinaus eine im

Cytosol stattfindende Interaktion des Map-Proteins mit Ebp50 nachgewiesen (Alto, 2006; Simpson, 2006). Ebp50 (*Ezrin-binding protein 50*) reguliert Ionenkanäle der Plasmamembran und wird nach Interaktion mit Map proteolytisch abgebaut (Simpson, 2006). Schließlich konnte in einer weiteren Arbeit im Modellsystem der Hefe nachgewiesen werden, dass das Map-Protein im Cytosol die Depolarisation des kortikalen Aktinzytoskeletts auslöst und dadurch hemmend auf das Wachstum der Hefezellen wirkt (Rodriguez-Escudero, 2005).

Zu Beginn der vorliegenden Arbeit sollte der Mechanismus der mitochondrialen Zielerkennung und Translokation des Map-Toxins der enteropathogenen *Escherichia coli* (EPEC) in Mitochondrien aufgeklärt werden. Neben den Untersuchungen zur mitochondrialen Zielerkennung des Map-Toxins sollten Auswirkungen der Wechselwirkung des Map-Toxins mit Mitochondrien für die Wirtszelle im Modellsystem der Bäckerhefe (*Saccharomyces cerevisiae*) aufgeklärt werden, um zusätzlich zu den bekannten Funktionen des Map-Proteins im Cytosol, eventuell auch Rückschlüsse auf die Funktion von Map in Mitochondrien ziehen zu können.

1.4. Metabolit-Translokatoren der mitochondrialen Innenmembran

Die mitochondriale Innenmembran ist im Gegensatz zur Außenmembran der Mitochondrien nicht permeabel für kleinere, wasserlösliche Moleküle. Sie stellt eine unüberwindbare Barriere dar und grenzt die mitochondriale Matrix von anderen Kompartimenten der Zelle ab. Ein gewisser Metabolitaustausch zwischen Matrix und Cytosol muss jedoch gewährleistet sein. Dies ist bei verschiedenen Stoffwechselwegen, welche ganz oder teilweise in der Matrix der Mitochondrien stattfinden, wie z.B. der Zitronensäurezyklus, die β -Oxidation von Fettsäuren, der Harnstoffzyklus, die Synthese von Häm und Eisen-Schwefel-Clustern, der Fall. Für den selektiven Austausch von Molekülen über die innere, mitochondriale Membran ist eine aus mehreren Metabolit-Translokatoren bestehende Familie an Innenmembranproteinen zuständig. Eukaryontische Zellen weisen typischerweise zwischen 35 bis 55 unterschiedliche Translokatorproteine auf (Kunji, 2004). Proteine der Translokatorenfamilie (MCF; *mitochondrial carrier family*) weisen untereinander eine hohe Sequenzähnlichkeit, sowie bestimmte Merkmale auf. Typischerweise bestehen die Translokatorproteine der Innenmembran aus drei homologen Modulen, bestehend aus jeweils etwa 100 Aminosäuren. Jedes Modul weist zwei alpha-

helikale Transmembrandomänen auf, die auf der zur Matrix gerichteten Seite der Innenmembran über eine Schlaufe (*Loop*) verbunden sind. Die Module sind untereinander auf der zum Cytosol gerichteten Seite der Innenmembran ebenfalls über *Loops* verbunden (Aquila, 1987). Jeweils zwei Translokatorproteine assoziieren in der Innenmembran zu einem funktionellen Dimer.

Alle Metabolit-Translokatoren sind im Zellkern codiert und werden posttranslational in Mitochondrien importiert. Die Biogenese von mitochondrialen Translokatorproteinen wurde am eingehendsten mit dem ATP/ADP-Translokator (AAC; *ATP/ADP carrier*) als Modellprotein untersucht und resultierte in der Einteilung von fünf charakteristischen Stufen: (I) Synthese des AAC an Ribosomen im Cytosol und Anbindung an cytosolische Chaperonproteine. (II) Anbindung des AAC/Chaperon-Komplexes an den Tom70-Rezeptor der mitochondrialen Außenmembran. (III) Translokation des AAC über die generelle Importpore und Anbindung an den Tim9/Tim10-Komplex des Intermembranraums. (IV) Insertion des AAC in die Innenmembran über den TIM22-Komplex. (V) Dimerisierung von zwei AAC-Monomeren zum funktionellen Metabolit-Translokator (Ryan, 1999; Rehling, 2003; de Marcos-Lousa, 2006).

Für die mitochondriale Zielerkennung von Metabolit-Translokatoren sind im Gegensatz zu Präsequenz-tragenden Proteinen der mitochondrialen Matrix, offensichtlich mehrere, interne Sequenzabschnitte verantwortlich, welche bisher nicht genau definiert werden konnten. Es stellt sich nun die Frage, ob dennoch bestimmte Sequenzmotive innerhalb der Primärsequenz der mitochondrialen Translokatoren für die Zielerkennung und Biogenese wichtig sind. Ein solches Motiv müsste bei allen Familienmitgliedern der *Mitochondrial Carrier Family* konserviert sein. Dieses Kriterium erfüllt eines, mit wenigen Ausnahmen, in allen drei Modulen und Translokatorproteinen vorkommendes Motiv, die so genannte *Carrier Signature* (CS) (Nelson, 1998). Die CS weist die Sequenz Prolin – beliebig – Aspartat/Glutamat – beliebig – beliebig – Lysin/Arginin (P-X-[D/E]-X-X-[K/R]) auf und befindet sich jeweils am Übergang zwischen der ersten Transmembrandomäne und dem Loop eines jeden Moduls. Die drei Module des ATP/ADP-Translokators (AAC) und Dicarboxylat-Translokators (DIC) sind unabhängig voneinander in der Lage, in Mitochondrien zu translozieren (Endres, 1999; Brandner, 2005). Dies weist darauf hin, dass mindestens in jedem Modul ein mitochondriales Zielerkennungsmotiv enthalten sein muss. Für die Erkennung von mitochondrialen Translokatorproteinen ist seitens der

Mitochondrien der Tom70-Rezeptor der mitochondrialen Außenmembran zuständig. Für die Erkennung von Translokator-Vorstufenproteinen sind stets drei Tom70-Dimere erforderlich (Wiedemann, 2001). Dies deutet ebenfalls auf eine in Translokatorproteinen dreifach vorhandene Zielerkennungssequenz hin. Die in allen drei Modulen vorkommende *Carrier Signature* könnte durchaus das für die Zielerkennung von Mitochondrien erforderliche Motiv darstellen. In der vorliegenden Dissertation sollte der Frage nachgegangen werden, ob eventuell die hochkonservierte CS eine Rolle bei der mitochondrialen Zielerkennung und Biogenese von Metabolit-Translokatoren der Innenmembran spielt. Als Modellprotein diente hierzu der Dicarboxylat-Translokator von *Saccharomyces cerevisiae*. Es konnten aber auch Metabolit-Translokatoren in Säugetieren und Pflanzen gefunden werden, welche eine zusätzliche N-terminale, abspaltbare Präsequenz mit gewissen Ähnlichkeiten zu Präsequenzen mitochondrialer Matrixproteine aufweisen (Palmieri, 1996; Zara, 2003; Murcha, 2004). Bei Matrixproteinen vermitteln die Präsequenzen die Erkennung durch Rezeptoren des TOM-Komplexes und die Membranpotential-abhängige Überquerung der mitochondrialen Innenmembran über den TIM23-Komplex (Roise & Schatz, 1988). Auch für die Präsequenz des bovinen Phosphat-Translokators (PiC) wurde eine Beteiligung an Rezeptorerkennung und Translokation in Mitochondrien festgestellt (Zara, 1991; Zara, 1992). Eine andere Studie hat wiederum ergeben, dass die Präsequenz des ATP/ADP-Translokators aus *Solanum tuberosum* unter *in vivo* Bedingungen nicht für die mitochondriale Zielerkennung benötigt wird und dass sie unter *in vitro* Bedingungen nicht hinreichend für den Import eines nicht-mitochondrialen Proteins in Mitochondrien ist (Mozo, 1995). Für den Citrat-Translokator (CIC) aus *Rattus norvegicus* wurde beobachtet, dass die Präsequenz für den Import in Mitochondrien nicht zwingend erforderlich ist und als intramolekulares Chaperon die Löslichkeit des CIC-Proteins erhöht (Zara, 2003). Da aber Translokatorproteine auch über interne Zielerkennungsmotive in Mitochondrien importiert werden können, muss der Verlust der Präsequenz nicht zwangsläufig eine Herabsetzung der Importeffizienz zur Folge haben. Aus diesem Grund sollten die Interaktionen der N-terminalen Präsequenz mit den Komponenten der mitochondrialen Translokationsmaschinerien näher untersucht werden, um eine mögliche Beteiligung an der mitochondrialen Zielerkennung von Präsequenz-tragenden Metabolit-Translokatoren genauer aufzuklären. Als Modellprotein diente in diesem Fall der Citrat-Translokator aus *Rattus norvegicus* (Ratte).

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1. Geräte

Autoklaven	Sanoclav, H+P Varioclav
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen
Feinwaage	Sartorius CP224S
Geltrockner	UniEquip Unigeldryer 3545D, Biorad Model 583 Gel Dryer
Heizblock	UniTek HBS-130
Heizschränke	Heraeus, Memmert
Konfokales Laser Scanning Mikroskop	Leica TCS SP2 & DM RE microscope stand
Kühltruhen (-80°C)	New Brunswick Scientific C54285, TIRA TDF8637H
Magnetrührer	IKAMAG RH, Heidolph MR2000
Millipore-Anlage	Millipore – Millipack 0,22 µm
Netzgerät	Biometra P25, Consort E865
PCR-Gerät	Biometra T3 & Tgradient
pH-Meter	Metrohm 620 & 632
Phosphorimager	Fujifilm BAS-1500
Photometer	Dr. Lange LP2W, Novaspec Plus, Uvikon 930, WPA biowave CO8000, Perkin-Elmer Lambda 15
Schüttelinkubatoren	HAT Infors AG
Sterilbank	BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH
Taumelschüttler	Heidolph Polymax 1040
Thermomixer	Eppendorf Thermomixer Comfort
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250 (Spitze: Heinemann)
UV-Tisch	Ultra-Violet Products Inc., San Gabriel, California, USA
Vortexgerät	Vortex Genie 2
Vakuumpumpe	KNF Neuberger Laboport
Zentrifugen	Eppendorf Centrifuge 5415D, Hettich Rotanta, Hermle ZK630 Processor, Beckman Coulter Avanti J-25 (Rotoren JLA-10.500, JLA-16.250, JA-25.50, JA-20), Beckman TL-100 Ultracentrifuge (Rotor TLA-120.2)

2.1.2. Chemikalien und Enzyme

³⁵ S-Methionin	ICN, Eschwege, Deutschland
Aceton	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Deutschland
Adenin	Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland
Adjuvans	Biogenes GmbH
Agar	Difco Laboratories, Detroit, MC, USA
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Riedl-de Haën AG, Seelze, Deutschland
Ampicillin	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Arginin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Aspartat	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
ATP	Boehringer, Mannheim Deutschland
Bicin	USB, Cleveland, OH, USA
Bistris	USB, Cleveland, OH, USA
Borsäure	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Bradford-Reagenz	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
Calciumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Cardiolipin	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Coomassie-Brilliant-Blue	Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland
Cystein	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Digitonin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Dithioerithrol	Gerbu, Gaiberg, Deutschland
DMSO	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA-Probenpuffer	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
dNTP-Mix	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
EACA	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
ECL-Reagenzien	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
EDTA	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
EGTA	Merck, Darmstadt, Deutschland
Essigsäure	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland

Material und Methoden

Ethylenglykol	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Fettsäure-freies BSA	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Flüssigstickstoff	Air Liquide, Düsseldorf, Deutschland
Galaktose	Beckton-Dickinson, Le Pont der Claix, Frankreich
<i>GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus, ready-to-use</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
<i>GFX™ Micro Plasmid Prep Kit</i>	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
<i>GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification Kit</i>	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
Glukose	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Deutschland
Glycerin	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Deutschland
Glycin	USB, Cleveland, OH, USA
Harnstoff	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
HCl (37%, rauchend)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefeextrakt	Difco Laboratories, Detroit, MC, USA
HEPES	USB, Cleveland, OH, USA
Histidin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Hydroxyapatit	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
IPTG	Gerbu, Gaiberg, Deutschland
Isoleucin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Kaliumacetat	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Kanamycin	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Ketamin	Ceva Tiergesundheit GmbH, Neumünster, Deutschland
KH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
KOH	Merck, Darmstadt, Deutschland
Lachssperma-DNA	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Lidocainhydrochlorid	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Lysin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Lysozym	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Magermilchpulver	Heirler Cenovis GmbH, Radolfzell, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Manganchlorid	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA

Material und Methoden

<i>MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methionin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>MitoTracker™ Orange CMTMRos</i>	Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland
MBS	Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, USA
MOPS	USB, Cleveland, OH, USA
NaCl	USB, Cleveland, OH, USA
NADH	Boehringer, Mannheim, Deutschland
NaOH (Plätzchen, reinst)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
<i>O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Oligonukleotide	biomers.net GmbH, Ulm, Deutschland MWG-BIOTECH AG, Ebersberg, Deutschland
Pepton	Difco Laboratories, Detroit, MC, USA
Percoll	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
<i>Pfu Ultra™ High Fidelity DNA Polymerase</i>	Stratagene, La Jolla, CA, USA
Phenylalanin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
PMSF	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyethylenglykol 1000	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Ponceau S	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Prolin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Proteinase K	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Raffinose	Beckton-Dickinson, Le Pont der Claix, Frankreich
Restriktions- endonukleasen	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Rotiphorese 30, Acrylamid/Bisacrylamid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Rubidiumchlorid	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA

Saccharose	Beckton-Dickinson, Le Pont der Claix, Frankreich
SDS – Pellets	Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland
Serin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Serva Blue G	Serva GmbH & Co, Heidelberg, Deutschland
Sorbit	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sorbitol	Merck, Darmstadt, Deutschland
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
TEMED	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Threonin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>TNT[®] T7/Sp6 Coupled Reticulocyte Lysate System</i>	Promega, Mannheim, Deutschland
Trichloressigsäure	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Deutschland
Tricin	Promega, Mannheim, Deutschland
Tris	USB, Cleveland, OH, USA
Triton X-100	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Trypsin-Inhibitor	Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Trypton	Difco Laboratories, Detroit, MC, USA
Tryptophan	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Tyrosin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
<i>Unstained Protein Molecular Weight Marker</i>	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Valin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Xylazin	Alvetra GmbH, Neumünster, Deutschland
<i>Yeast nitrogen base</i>	Beckton-Dickinson, Le Pont der Claix, Frankreich
Zymolyase	Seikagaku Corporation, Tokyo, Japan

2.1.3. Verwendete *E. coli* – und *S. cerevisiae* – Stämme

Escherichia coli – Stämme:

E. coli XL1 blue: *supE44, hsdR17, recA1, endA1, gyr, A96, thi, relA1, lac⁻*

E. coli C41(DE3): *F⁻, ompT, hsdS_β(r_β-m_β-), dcm, gal, (DE3) tonA*

Saccharomyces cerevisiae – Stämme:

BY4742 (Euroscarf): MAT α ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*

KKY3.7 (Krimmer, 2001): MAT α ; *his3- Δ 200*; *leu2-3112*; *ade2-101*; *suc2- Δ 9*; *trp1- Δ 901*; *ura3-52*; *tom40::HIS3* (pRS314-TOM40)

KKY3.4 (Krimmer, 2001): MAT α ; *his3- Δ 200*; *leu2-3112*; *ade2-101*; *suc2- Δ 9*; *trp1- Δ 901*; *ura3-52*; *tom40::HIS3* (pRS314-tom40-4)

OL223 (van Wilpe, 1999): MAT α ; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*; *ura3-52*; *trp1- Δ 63*; *rho*^o

OL201 (van Wilpe, 1999): MAT α ; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*; *ura3-52*; *trp1- Δ 63*; *tom22::HIS3*; *rho*^o

OL200-AH49 (Moczko, 1997): MAT α ; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*; *ura3-52*; *trp1- Δ 63*; *tom22::HIS3+pRS414(TRP1)-tom22-2*

YPH499 (Sikorski & Hieter, 1989): MAT α ; *ura3-52*; *lys2-801*; *ade2-101*; *trp1- Δ 63*; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*

YPH500 (Sikorski & Hieter, 1989): MAT α ; *ura3-52*; *lys2-801*; *ade2-101*; *trp1- Δ 63*; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*

PK82 (Gambill, 1993): MAT α ; *his4-713*; *lys2*; *ura3-52*; *Δ trp1*; *leu2-3*; 112

PK83 (Gambill, 1993): MAT α ; *ade2-101*; *lys2*; *ura3-52*; *Δ trp1*; *leu2-3*; *ssc1-3(LEU2)*

Δ dnm1 (Euroscarf): MAT α ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*; YLL001w::kanMX4

Δ fis1 (Euroscarf): MAT α ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*; YIL065c::kanMX4

Δ gag3 (Euroscarf): MAT α ; *his3 Δ 1*; *leu2 Δ 0*; *lys2 Δ 0*; *ura3 Δ 0*; YJL112w::kanMX4

MM208 (Moczko, 1994): MAT α ; *ura3-52*; *lys2-801*; *ade2-101*; *trp1- Δ 63*; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*; *tom70::HIS3*

MM112-C (Moczko, 1994): MAT α ; *ura3-52*; *lys2-801*; *ade2-101*; *trp1- Δ 63*; *his3- Δ 200*; *leu2- Δ 1*; *tom20::URA3*

2.1.4. DNA-Vektoren

pET28a (Novagen): Expression in *E. coli*; *in vitro* Transkription/Translation

pGEM-4 (Promega): *in vitro* Transkription/Translation

pGEM-4z (Promega): *in vitro* Transkription/Translation

pGEM-11z (Promega): *in vitro* Transkription/Translation

pYES2 (Invitrogen): Expression in *S. cerevisiae*; *in vitro* Transkription/Translation

2.1.5. Antikörper

Anti-Tom40 (rabbit) 1:5000 in TBS	Prof. Pfanner (Universität Freiburg)
Anti-Tim10 (rabbit) unverdünnt	Prof. Pfanner (Universität Freiburg)
Anti-AAC (rabbit) 1:500 in TBS	Von AG Rassow hergestellt
Anti-DIC (rabbit) 1:2500 in TBS	Prof. Zara (Universität Lecce, Italien)
Anti-GFP (rabbit) 1:200 in TBS	Clontech Laboratories Inc., CA, USA <i>Living Colors[®] Peptide Antibody</i>
Anti-SUMO (rabbit) 1:1000 in MP/TBS	Rockland Immunochemicals Inc., PA, USA <i>Purified IgG fraction of anti-yeast-SUMO</i>
Anti-Rabbit (goat) 1:50000 in TBS	Amersham Inc., Cleveland, OH, USA <i>ECL Rat IgG, HRP-Linked Whole Antibody</i>

2.1.6. Weitere Materialien

<i>μMACS[™] Protein A MicroBeads</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, D
<i>μMACS[™] separator</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, D
<i>μColumns[™]</i>	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch-Gladbach, D
Agarosegel-Kammer	Owl Separation Systems
Alu – Blöcke	Zitt-Thoma, Freiburg, Deutschland Chatzivassileiou C. & Taipliadis G.
BN-PAGE-Kammer	Hoefer Electrophoresis Unit, SE600 Series
Chromatographiepapier (dünn & dick)	Schleicher & Schuell
Deckgläser	Menzel – Gläser
<i>Dounce</i> -Homogenisator (30 ml)	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Eppendorfgefäße (1.5 ml, 2 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Falcon-Röhrchen (15 ml, 50 ml)	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland
Glasplatten für SDS-PAGE	Zitt-Thoma, Freiburg, Deutschland
Gradientenmischer	Amersham Inc., Cleveland, OH, USA
<i>Hamilton</i> -Spritze	Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz
Klarsichtfolie	Saran DOW
Lichtempfindliche Filme	AGFA Cronex S
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Optibran BA-S 83
Phosphorimager-Platten & Kassetten	Fujifilm BAS-MS 2025 & BAS cassette2 2025
Plastikküvetten	Sarstedt, Nürnberg, Deutschland

Polylysin-beschichtete Objektträger	Menzel – Gläser (Polylysine™)
Quarzküvetten	Hellma Quarzglas Suprasil
SDS-PAGE-Kammer	Zitt-Thoma, Freiburg, Deutschland
Sterilfilter 0,22 µm	Sarstedt, Nürnbrecht, Deutschland
Sterile Plastikplatten	Greiner, Nürtingen, Deutschland
<i>Venofix-Butterfly</i>	B. Braun, Melsungen, Deutschland
Western-Blot-Apparatur	Owl Separation Systems

2.1.7. Angewandte Computerprogramme und Internetressourcen

Computerprogramme (unter Windows XP Professional, Microsoft):

Office XP, <i>Microsoft</i>	Textverarbeitung, Tabellenkalkulation, Präsentation
Acrobat 5.0.1., <i>Adobe</i>	Dokumentdarstellung, -erstellung
Photoshop 7, <i>Adobe</i>	Bildbearbeitung
AIDA, <i>Raytest GmbH</i>	Bandenquantifizierung
DIANA, <i>Raytest GmbH</i>	Darstellung Agarosegele/EtBr
pDRAW32, <i>Acaclone</i>	DNA – Analyse und –Annotation
ClustalX, <i>Higgins D. G.</i>	<i>Multiple Sequence Alignment</i>
Chromas, <i>McCarthy C.</i>	Auswertung ABI-Gramme aus DNA-Sequenzierungen
LCS software, <i>Leica</i>	Steuerung konfokales Laser Scanning Mikroskop

Internetressourcen (Stand: Juli 2006):

PubMed	pubmed.gov	Literaturrecherche
BLAST	ncbi.nlm.nih.gov/blast	<i>Single Sequence Alignment</i>
ExPASy	expasy.org	<i>Proteinknowledgebase & Tools</i>
PDB	rcsb.org/pdb	Proteinstrukturen-Datenbank
SGD	yeastgenome.org	<i>S.cerevisiae</i> Genomdatenbank
Euroscarf	web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf	<i>S.cerevisiae</i> Deletionsmutanten
Mitoprot	ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html	<i>Prediction mitochondr. targeting</i>
OligoCalc	basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html	Oligonukleotid-Design
DoubleDigest	fermentas.com/doubledigest	Pufferwahl Restriktionsenzyme
NEBcutter	tools.neb.com/NEBcutter2	DNA-Restriktion
SUMOPlot	abgent.com/doc/sumoplot	<i>Prediction Protein SUMOylation</i>
Helical Wheel	kael.net/helical.htm	<i>Helical Wheel</i> Darstellungstool

2.2. Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA wurden hauptsächlich die *GFXTM Micro Plasmid Prep* Reagenzien der Firma Amersham (Cleveland, USA) verwendet. Damit wurde eine schnelle und qualitativ hochwertige Isolierung von Plasmid-DNA aus 2 ml Bakterienkultur erreicht. Die isolierte Plasmid-DNA konnte anschließend für enzymatische Modifizierungen herangezogen werden. Das Prinzip der DNA-Isolierung basiert auf der alkalischen Lyse und anschließender Adsorption der DNA an einem Glasfaserfilter.

Plasmid-enthaltende *E. coli* – Zellen wurden in 2ml LB-Flüssigmedium (1,5% [w/v] Trypton, 0,5% [w/v] Hefeextrakt, 1% [w/v] NaCl, pH7.5) überimpft, die Kultur mit einer Antibiotikallösung ergänzt und über Nacht bei 37°C im Schüttler inkubiert. Aus der Übernachtskultur wurden 1,5 ml in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und für 1 min bei 5000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und die Bakterien in 150 µl Lösung I (100 mM Tris/HCl pH7.5, 10 mM EDTA, 40% [w/v] RNase I) resuspendiert. Das Eppendorfgefäß wurde nach Zugabe von 150 µl Lösung II (1 M NaOH, 5,3% [w/v] SDS) vorsichtig geschwenkt, bis die Trübung klar wurde (Lyse der Bakterien). Durch die Zugabe von 300 µl Lösung III (enthält Acetat und chaotrope Substanzen) und mehrmaligem Kippen des Eppendorfgefäßes, wurde die Fällung von Proteinen und chromosomaler DNA erzielt. Eine Inkubation für 5 min bei Raumtemperatur optimierte diesen Schritt. Anschließend folgte eine Zentrifugation für 5 min bei 16000 g. Der klare Überstand wurde entnommen, in einen GFX-Filter mit Auffanggefäß pipettiert und für 30 sec bei 16000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschrte mit je 400µl Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH8.0, 1 mM EDTA, 80% [v/v] Ethanol), bei denen jeweils für 1 min bei 16000 g zentrifugiert und der Durchfluss anschließend verworfen wurde. Nach den Waschschrten wurde der Filter durch 2-minütige Zentrifugation bei 16000 g getrocknet. Der Filter wurde anschließend in ein neues, steriles Eppendorfgefäß eingesetzt. Um die Plasmid-DNA aus dem Filter zu eluieren, wurde die gewünschte Menge steriles Wasser auf den Filter pipettiert und für 2 min bei 16000 g zentrifugiert.

Die Plasmid-DNA befand sich nach der Zentrifugation in Wasser gelöst im Eppendorfgefäß. Die Plasmid-DNA wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.2. Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Bestimmung der DNA-Konzentration in einer Lösung erfolgte spektrophotometrisch. Dabei gilt für doppelsträngige DNA, dass eine Extinktion von 1, gemessen bei einer Wellenlänge von 260 nm, einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht. Es ergibt sich hierdurch folgende Formel zur Berechnung der DNA-Konzentration:

$$c [\mu\text{g/ml}] = E_{260} \times 50 \mu\text{g/ml} \times F$$

c = DNA – Konzentration, E = Extinktion bei $\lambda_{260\text{nm}}$, F = Verdünnungsfaktor

2.2.1.3. Aufkonzentrieren der DNA durch Ethanolfällung

Um die DNA-Konzentration einer bestimmten DNA-Lösung zu erhöhen wurde die DNA mit Natriumacetat und Ethanol gefällt und anschließend in geringerem Volumen Wasser wieder aufgenommen. Das Prinzip der Ethanolfällung besteht darin, dass langkettige Nukleinsäuren unter Anwesenheit von Alkohol und chaotropen Salzen spontan ausfallen und durch Zentrifugation vom Wasser abgetrennt werden können. Die zu fällende DNA-Lösung wurde mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 4,8) versetzt und Ethanol zu einer Endkonzentration von 70% [v/v] dazugegeben. Nach einer Inkubation des Ansatzes über Nacht bei -20°C erfolgte eine Zentrifugation bei 21000 g für 30 min und 4°C. Der Überstand wurde verworfen, die gefällte DNA durch 10-minütiges Schütteln bei 30°C im Inkubator getrocknet und schließlich in der gewünschten Menge Wasser resuspendiert.

2.2.1.4. Elektrophoretische Auftrennung von DNA-Fragmenten

Lineare DNA-Moleküle lassen sich in einem Agarosegel proportional zu ihrem Molekulargewicht auftrennen. Wird an eine solche Gelmatrix Spannung angelegt, wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle abhängig von ihrer Größe zur Kathode. Die Nukleinsäuren lassen sich dann durch Ethidiumbromid sichtbar machen. Diese Substanz interkaliert zwischen den aromatischen Ringsystemen der

Nukleotide und leuchtet durch Anregung mit UV-Licht rosa-orange. Bei Agarosekonzentrationen zwischen 0,3 bis 3 Prozent lassen sich, abhängig vom erforderlichen Trennbereich, Trennungen von DNA-Molekülen von 100bp bis 50kb durchführen. In dieser Dissertation wurden in der Regel Gele mit 1% Agarose verwendet.

Für ein einprozentiges Agarosegel wurde 0,5 g Agarose in einem Erlenmeyerkolben abgewogen und durch Kochen in 50ml TBE-Puffer (0.89 M Tris, 0.89 M Borsäure, 20 mM EDTA) in Lösung gebracht. Nach Abkühlen der Gellösung auf unter 60°C wurde 5µl Ethidiumbromid-Lösung (10mg/ml) hinzugegeben. Die Gellösung wurde in einen vorbereiteten Gelschlitten innerhalb der Elektrophoreseapparatur gegossen. Ein entsprechender Kamm (Taschenformer) wurde ebenfalls in den Gelschlitten eingesetzt. Nach der Erstarrung des Agarosegels wurde der Kamm vorsichtig entfernt. Der Gelschlitten wurde dann mit der richtigen Orientierung (Taschen auf der Seite der Anode) in die mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer eingesetzt. Die Geltaschen wurden mit den DNA-Proben beladen, die zuvor mit DNA-Probenpuffer (*6x Loading Dye Solution*, MBI Fermentas) im Verhältnis 5:1 vermischt wurden. Dadurch erhöhte sich die Dichte der Proben und erleichterte deren Einsinken in die Taschen. Die Elektrophorese wurde bei 100V durchgeführt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel unter UV-Licht (302 nm) ausgewertet. Um die Größe der DNA-Fragmente auf dem Agarosegel bestimmen zu können, wurden zusätzlich geeignete DNA-Größenstandards mit DNA-Fragmenten definierter Größe neben den DNA-Proben auf dem Gel aufgetragen. Es wurden ausschließlich DNA-Größenstandards der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet: *MassRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use*; *O'GeneRuler™ DNA Ladder Mix, ready-to-use*; *GeneRuler™ 1kb DNA Ladder Plus, ready-to-use*.

2.2.1.5. Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel

Für die Isolierung von aufgetrennten DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurden die *GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification* Reagenzien der Firma Amersham (Cleveland, USA) verwendet.

Die Bande des gewünschten DNA-Fragments wurde unter UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nach Zugabe von 1 µl *Capture Buffer* (enthält Acetat und chaotrope Substanzen) pro

mg Gelgewicht wurde das Gelstück durch Erhitzen für 10 min bei 60°C geschmolzen. Der Inhalt des Eppendorfgefäßes wurde dann in eine GFX-Säule mit entsprechendem Auffanggefäß überführt und für 30 sec bei 16000 g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Es folgten zwei Waschschriffe mit 500µl Waschpuffer (10 mM Tris/HCl pH8.0, 1 mM EDTA, 80% [v/v] Ethanol) und ein zusätzlicher Trockenzentrifugationsschritt. Bei den drei Zentrifugationsschritten wurde jeweils für 1 min bei 16000 g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die GFX-Säule wurde anschließend in ein steriles Eppendorfgefäß eingesetzt und die gewünschte Menge an Wasser zugegeben. Die DNA wurde durch 2-minütige Zentrifugation bei 16000 g eluiert und befand sich danach im Eppendorfgefäß. Die isolierten und aufgereinigten DNA-Fragmente wurden bei -20°C.

2.2.1.6. Spaltung von DNA-Molekülen mit Restriktionsendonukleasen

Bei Restriktionsendonukleasen handelt es sich um Enzyme bakteriellen Ursprungs, die DNA-Doppelstränge sequenzspezifisch spalten können. Typische Erkennungssequenzen sind palindromisch und bestehen meistens aus sechs bis acht Nukleotiden. Die Spaltung findet gewöhnlich innerhalb der Erkennungssequenz statt, dabei können je nach Restriktionsenzym entweder überhängende oder glatte Enden entstehen. Die zahlreichen bekannten Restriktionsenzyme werden mit Abkürzungen benannt, die auf den Ursprungsorganismus hinweisen. In dieser Arbeit wurden ausschließlich die Restriktionsenzyme und zugehörigen Puffer der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot, Deutschland) verwendet. Ein Standard-Restriktionsansatz enthielt 300 – 500 ng DNA, 10% [v/v] Restriktionspuffer (10-fach), 5-10% [v/v] Restriktionsenzym und wurde auf ein Gesamtvolumen von 10-20 µl mit Wasser aufgefüllt. Enthielten die Ansätze mehrere Restriktionsenzyme, wurde ein für alle Enzyme geeigneten Puffer anhand von Herstellerangaben ausgewählt. Die Restriktionsansätze wurden für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.7. Verknüpfen von DNA-Fragmenten mit der T4-DNA-Ligase

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde die T4-DNA-Ligase verwendet. Dieses Enzym katalysiert unter ATP-Verbrauch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxylende des einen DNA-Fragmentes und dem 5'-

Phosphatende des anderen Fragmentes. Das Standardvolumen von Ligationsansätzen in dieser Arbeit betrug 20 µl.

Die in einem Vektor zu inserierende DNA und die Vektor-DNA wurden im Verhältnis 3:1 eingesetzt, auf 16µl mit bidest. H₂O aufgefüllt und anschließend für 10 min bei 65°C inkubiert. Der Ligationsansatz wurde anschließend für kurze Zeit auf Eis abgekühlt und 2µl Ligasepuffer (10x), 1µl 0,1 M ATP und 1µl T4-DNA-Ligase (5 U/µl) zugegeben. Die Ligation wurde über Nacht bei 14°C oder für 1h bei 22°C durchgeführt und durch 10-minütiges Erhitzen bei 65°C die Ligase wieder deaktiviert.

2.2.1.8. Herstellung kompetenter *E. coli* – Zellen

In dieser Arbeit wurden anhand der Rubidiumchlorid-Methode kompetente Zellen der beiden *E. coli* – Stämme XL1 blue und C41 (DE3) hergestellt.

Für die Herstellung kompetenter Bakterienzellen wurde 100 ml vorgewärmtes LB-Medium mit 1 ml einer Vorkultur angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 geschüttelt. Danach wurde die Kultur bei 3000 g und 4°C zentrifugiert. Die Bakterien wurden in 30 ml eiskaltem TFB1-Puffer (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KAc, 10 mM CaCl₂, 15% [v/v] Glycerol, pH5.8) resuspendiert und für 90 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einer zweiten Zentrifugation (5 min, 3000 g, 4°C) wurden die Bakterien in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15% [v/v] Glycerol, pH8.0) aufgenommen und für weitere 15 – 60 min auf Eis inkubiert. Die kompetenten Zellen wurden dann in Aliquote mit 100 µl Volumen aufgeteilt und durch kurzes Eintauchen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquots wurden bei -80°C gelagert.

2.2.1.9. Transformation von DNA in kompetente *E. coli* – Zellen

Es wurden 100 µl kompetente Zellen auf Eis aufgetaut und mit 1 µl Plasmid-DNA-Lösung (0,1 bis 1 µg DNA) vermischt. Nach einer 30-minütigen Inkubation auf Eis, folgte ein Hitzeschritt bei 42°C für 90 Sekunden. Danach wurde der Transformationsansatz für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde der Transformationsansatz mit 500 µl LB-Medium versetzt und für 90 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Transformationsansatz wurde abschließend auf selektiven LB-Platten ausplattiert, um diejenigen Zellen zu vermehren, die das

Plasmid aufgenommen haben. Die Platten wurden zur Vermehrung von Transformanten über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.10. Amplifikation von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit der Polymerasen-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) kann eine niedrige Menge an Ausgangs-DNA unter *in vitro* Bedingungen sehr stark vermehrt werden. Darüber hinaus lassen sich mit dieser Methode einzelne Gene aus chromosomaler DNA amplifizieren. Eine gewöhnliche PCR weist einen Zyklus mit drei aufeinander folgenden Schritten auf. Im ersten Schritt wird die Ausgangs-DNA (*template*) durch Hitze denaturiert und in seine beiden Einzelstränge getrennt. Im zweiten Schritt binden definierte Oligonukleotide (*primer*) an die komplementäre Sequenz der einzelsträngigen DNA-Moleküle und definieren somit den Beginn (*forward primer*) und das Ende (*reverse primer*) der zu amplifizierenden DNA-Sequenz. Oligonukleotide können am 5'-Ende nicht-komplementäre Basenpaare aufweisen, welche Teil einer Erkennungssequenz von Restriktionsendonukleasen sind. Damit können die amplifizierten DNA-Moleküle leicht in die *multiple cloning site* eines Zielvektor eingebracht werden. Im dritten Schritt beginnt die DNA-Polymerase mit der Synthese von Doppelstrang-DNA und nutzt hierbei die einzelsträngige Ausgangs-DNA als Matrize, sowie die daran gebundenen Oligonukleotide als Startpunkt. Die DNA-Polymerase muss hitzestabil sein, da bei der Denaturierung der Ausgangs-DNA eine hohe Temperatur (95°C) notwendig ist. In dieser Arbeit wurde die *Pfu UltraTM High Fidelity DNA Polymerase* der Firma Stratagene (La Jolla, USA) verwendet, da diese eine *proof reading activity* aufweist. Dies bedeutet, dass sie in der Lage ist, falsch eingebaute Nukleotide zu erkennen und mit den korrekten Nukleotiden zu ersetzen. Damit ist die Wahrscheinlichkeit, dass die amplifizierte DNA Fehler enthält extrem gering. Durch das mehrmalige Wiederholen der drei PCR-Schritte lässt sich die Ausgangs-DNA nahezu exponentiell vermehren, da bei jedem Zyklus die Anzahl der DNA-Matrizen sich vervielfacht.

In einem Reaktionsgefäß wurden folgende Substanzen eingesetzt:

5 µl Reaktionspuffer (10x)

1 µl *forward primer* (10 pmol/µl)

1 µl *reverse primer* (10 pmol/µl)

5 µl dNTP-Mix (2mM)

1 µl Ausgangs-DNA (10 – 100 ng)

1 µl *Pfu UltraTM High Fidelity DNA Polymerase* (2,5 U/µl)

37 µl Wasser

Folgendes PCR-Programm wurde gestartet:

95°C 2 min

95°C 30 sec

X°C 30 sec

72°C Y sec

72°C 10 min



30 Zyklen

X : durchschnittliche Schmelztemperatur der Oligonukleotide – 5°C

Y : Länge der zu amplifizierenden DNA in Kilobasen * 60 sec

2.2.1.11. Aufreinigung von PCR-Produkten

Die PCR-Produkte wurden nach der PCR-Reaktion mit den *GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification* Reagenzien der Firma Amersham (Cleveland, USA) aufgereinigt. Zu Beginn wurde der PCR-Ansatz (bis zu 100 µl Gesamtvolumen) mit 500 µl *Capture Buffer* vermischt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des PCR-Produktes über eine GFX-Säule (siehe 2.2.1.5.).

2.2.1.12. PCR-basierte, zielgerichtete DNA-Mutagenese (*QuikChangeTM*)

Zur zielgerichteten Mutagenese von Gensequenzen wurde die *QuikChangeTM* Methode der Firma Stratagene (La Jolla, USA) angewendet. Die Methode basiert auf die Verwendung einer hitzestabilen DNA Polymerase mit *proof reading activity* und zweier, zueinander komplementären Oligonukleotide, welche in zentraler Position die gewünschte Mutation enthalten. Es wird außerdem vorausgesetzt, dass die zu verändernde Gensequenz in einer zirkulären Vektor-DNA enthalten ist. Zunächst wird eine PCR-Reaktion durchgeführt. Hierbei entsteht in jedem Zyklus ein neuer DNA-Strang, welcher die gewünschte Mutation beinhaltet. Da aber die beiden Oligonukleotide zueinander komplementär sind, wird die Plasmid-DNA nur linear amplifiziert, denn die neu synthetisierten DNA-Stränge können im nächsten Zyklus nicht mehr als Matrize dienen. Nach Beenden der PCR-Reaktion können Plasmide entstehen, welche aus einem unveränderten DNA-Strang der Ausgangs-DNA und

einem hierzu komplementären, neu synthetisierten DNA-Strang mit der gewünschter Mutation bestehen. Während zuvor die Ausgangs-DNA in *E. coli* – Zellen vermehrt und hieraus isoliert worden ist, weist sie an definierten Stellen Methylierungen auf. Die in der PCR-Reaktion neu synthetisierten DNA-Stränge sind hingegen nicht methyliert. Durch den Einsatz der Restriktionsendonuklease *DpnI* können nun methylierte und hemimethylierte Plasmide erkannt (Erkennungssequenz: 5'-Gm⁶ATC-3') und in kleine DNA-Fragmente gespalten werden. Plasmide, welche aus zwei neu synthetisierten DNA-Stränge bestehen, sind hiervon nicht betroffen. Durch die *DpnI* – abhängige Selektion neusynthetisierter, mutationstragender Plasmide wird die Ausbeute an positiven Klonen nach der Transformation des *QuikChange*TM – Ansatzes in kompetente *E. coli* XL1 blue – Zellen erheblich erhöht.

Wichtige Kriterien bei der Wahl von mutagenen Oligonukleotiden:

- beide mutagenen Oligonukleotide müssen die gewünschte Mutation tragen und komplementär sein
- die gewünschten Mutationen sollte zentral eingebaut werden
- die Oligonukleotide sollten 20 – 45 bp lang sein
- der GC-Gehalt der Oligonukleotide sollte zwischen 40 – 75 % liegen
- die Schmelztemperatur der Oligonukleotide sollte zwischen 60 – 70 °C liegen

Für die *QuikChange*TM – PCR folgende Substanzen in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

- 5 µl Reaktionspuffer (10x)
- 1 µl Oligonukleotid (5'→3', 100 ng/µl)
- 1 µl Oligonukleotid (3'→5', 100 ng/µl)
- 1 µl dNTP-Mix (2 mM)
- 17 µl Wasser

In das Reaktionsgefäß wurde ein steriles Wachskügelchen gegeben. Anschließend wurde der Reaktionsansatz für 2 min auf 65°C erhitzt und dann auf 10°C abgekühlt. Es bildete sich dadurch eine Wachsschicht oberhalb des Reaktionsgemisches, auf der folgende Substanzen ergänzt wurden:

- 1 µl Plasmid-DNA (5 – 50 ng)
- 23 µl Wasser
- 1 µl *Pfu Ultra High Fidelity DNA Polymerase* (2,5 U/µl)

Folgendes PCR-Programm wurde gestartet:

95°C 2 min

95°C 30 sec

50°C 1 min

72°C Y sec

72°C 7 min

} 30 Zyklen

Y : Länge der Plasmid-DNA in Kilobasen * 60 sec

Nach der PCR-Reaktion wurde das Reaktionsgemisch mit 1 µl *DpnI* (5 U/µl) ergänzt und für mindestens 2 h bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde der Reaktionsansatz in kompetente *E. coli* XL1-blue – Zellen transformiert.

2.2.1.13. Klonierungsstrategien

Alle in dieser Arbeit hergestellten DNA – Konstrukte und Plasmide wurden durch Auftragssequenzierung bei der Firma GATC Biotech (Konstanz, Deutschland) verifiziert.

Herstellung von unterschiedlichen DIC-Derivaten in pGEM-4z:

Die wildtypische DNA-Sequenz des DIC-Gens aus *Saccharomyces cerevisiae* befand sich innerhalb der MCS des pGEM-4z – Vektors und wurde von Prof. Dr. Vincenzo Zara (Universität Lecce, Italien) zur Verfügung gestellt. Hierbei ist ein das DIC-Gen enthaltender, genomischer Sequenzabschnitt über zwei flankierende EcoRI-Überhänge in den ebenfalls mit EcoRI geöffneten pGEM-4z – Vektor ligiert worden. Das innerhalb des pGEM-4z – Vektors inserierte DIC-Gen befindet sich unmittelbar hinter dem SP6-Promotor.

Die Derivate DIC_{P33A}, DIC_{D35A} und DIC_{K38A} wurden ausgehend von pGEM-4z/DIC mittels QuikChange-Verfahren (siehe 2.2.1.12.) hergestellt. Hierbei wurden jeweils folgende, mutagene Oligonukleotidpaare verwendet:

P33A-fw: 5'-CATGGTGACACATGCTCTAGACTTGGCC-3'

P33A-rev: 5'-GGCCAAGTCTAGAGCATGTGTCACCATG-3'

D35A-fw: 5'-GTGACACATCCTCTTGCCTTGGCCAAAGTCAG-3'

D35A-rev: 5'-CTGACTTTGGCCAAGGCAAGAGGATGTGTCAC-3'

K38A-fw: 5'-CTTGACTTGGCAGCTGTCAGACTGCAGGC-3'
K38A-rev: 5'-GCCTGCAGTCTGACAGCTGCCAAGTCAAG-3'

Ausgehend vom Derivat DIC_{K38A} konnte dann das Derivat DIC_{ΔCS1} hergestellt werden, indem durch ein mutagenes Oligonukleotidpaar mittels QuikChange-Verfahren die beiden weiteren Codons für P33 und D35 in ein Alanin-Codon umgewandelt wurden.

DIC_{ΔCS1}-fw: 5'-CCATGGTGACGCAAGCGCTAGCCTTGGCAGCTGTC-3'
DIC_{ΔCS1}-rev: 5'-GACAGCTGCCAAGGCTAGCGCTTGCGTCACCATGG-3'

Die beiden Derivate DIC_{ΔCS2} und DIC_{ΔCS1/2} wurden ebenfalls mittels QuikChange-Verfahren hergestellt. In beiden Fällen wurde ein identisches, mutagenes Oligonukleotidpaar verwendet, welches die Codons der drei Aminosäuren P227, D229 und K232 in ein Codon für Alanin umwandelt. Für die Herstellung von DIC_{ΔCS2} wurde pGEM-4z/DIC als Ausgangs-DNA verwendet. DIC_{ΔCS1/2} wurde ausgehend vom Derivat DIC_{ΔCS1} hergestellt.

DIC_{ΔCS2}-fw: 5'-GTGTGCTCTGCAGCAGCCGTCATGGCCACACGTATC-3'
DIC_{ΔCS2}-rev: 5'-GATACGTGTGGCCATGACGGCTGCTGCAGAGCACAC-3'

Umklonierung von DIC und dessen Derivate aus pGEM-4z in pET28a:

Ausgehend vom pGEM-4z – Vektor sollte das DIC – Insert in den pET8a – Vektor umkloniert werden. Für die Insertion in die MCS des pET28a – Vektors wurden die beiden Schnittstellen NcoI und HindIII oder EcoRI ausgewählt. Während innerhalb des pGEM-4z – Vektors eine HindIII- oder EcoRI-Schnittstelle hinter dem DIC – Stoppcodon vorhanden war, musste am Beginn des DIC – Inserts eine NcoI – Schnittstelle generiert werden. Dies konnte nicht realisiert werden, da zwei weitere NcoI – Schnittstellen innerhalb der DIC – Sequenz vorhanden sind und dadurch keine Umklonierung mit NcoI möglich ist. Stattdessen wurde eine PciI – Schnittstelle mittels QuikChange – Verfahren am Beginn des DIC – Inserts realisiert. PciI weist identische Überhänge mit NcoI auf. Folgendes mutagene Oligonukleotidpaar wurde zur Einführung der PciI-Schnittstelle verwendet:

PciI-fw: 5'-CGCAACAGCTGGACGACATGTCAACCAACG-3'
PciI-rev: 5'-GCGTTGGTTGACATGTCGTCCAGCTGTTGCG-3'

Nach der QuikChange – Mutagenese wurde das DIC – Insert aus dem pGEM-4z – Vektor mittels PciI und HindIII oder EcoRI herausgeschnitten und in den mit NcoI und HindIII oder EcoRI geöffneten pET28a – Vektor durch Ligation inseriert. Durch eine identische Klonierungsstrategie wurden auch die Sequenzen aller DIC – Derivate aus dem pGEM-4z – Vektor in den pET28a – Vektor umklont.

Herstellung von pGEM-4/Map_{M7A}:

Ein Plasmid pGEM-4/Map wurde von Prof. Dr. Brendan Kenny (Universität Newcastle, UK) zur Verfügung gestellt. Hierbei ist ein Map-kodierender Sequenzabschnitt aus der Pathogenitätsinsel des EPEC – Stammes E2348/69 (*Genebank Accession Number*: 2865296) über EcoRI und PstI in den pGEM-4 – Vektor inseriert worden. Das innerhalb des pGEM-4 – Vektors inserierte Map – Gen befindet sich unmittelbar hinter dem SP6 – Promotor.

Das Codon der Aminosäure M7 wurde mittels QuikChange – Verfahren in ein Codon für Alanin umgewandelt unter Verwendung von folgendem, mutagenem Paar an Oligonukleotiden:

Map_{M7A}-fw: 5'-GTTTAGTCCAACGGCAGCTGTAGGTAGAGCGTTAG-3'

Map_{M7A}-rev: 5'-CTAACGCTCTACCTACAGCTGCCGTTGGACTAAAC-3'

Herstellung von Map-GFP, Map(45-203)-GFP, Map(1-100)-GFP, Map(1-152)-GFP und EspF-GFP in pYES2:

Zunächst wurde ein GFP-kodierendes Gen über BamHI und XhoI in die MCS des pYES2 – Vektors inseriert. Das GFP-Insert befand sich hierbei hinter dem GAL4 – Promotor. Dazwischen waren weitere Schnittstellen der MCS zur Insertion weiterer Gene vorhanden, welche die Herstellung von C-terminalen GFP-Fusionsproteinen erlauben. Voraussetzung war, dass die zu inserierenden Gene kein Stoppcodon aufweisen.

Ausgehend vom Plasmid pGEM-4/Map wurden die entsprechenden Map-Bereiche, welche in pYES2 vor der GFP-Sequenz inseriert werden sollten, mittels PCR amplifiziert. Es kamen Oligonukleotidpaare zum Einsatz, welche nach der

Amplifikation am 5'-Ende eine HindIII- und am 3'-Ende eine SacI- (bei Map[1-203] und Map[45-203]) bzw. BamHI-Schnittstelle (bei Map[1-100], Map[1-152] und EspF) erzeugen. Das Stoppcodon wurde jeweils nicht mitamplifiziert. Bei der Amplifikation von Map(45-203) wurde über das 5'-Oligonukleotid zusätzlich ein Startcodon eingeführt. Durch Inkubation der Amplifikationsprodukte mit den Restriktionsenzymen HindIII und SacI bzw. BamHI wurden entsprechende Überhänge erzeugt, die eine Insertion durch Ligation in das ebenfalls mit HindIII und SacI bzw. BamHI geöffnete Plasmid pYES2/GFP erlauben. Die Proteinkomponenten der Fusionsproteine Map(1-203)-GFP und Map(45-203)-GFP werden über das Hexapeptid Glu-Leu-Gly-Ser-Pro-Ile miteinander verbunden. Bei den Fusionsproteinen Map(1-100)-GFP, Map(1-152)-GFP und EspF-GFP bildet das Tetrapeptid Gly-Ser-Pro-Ile die Verbindung der beiden, miteinander fusionierten Proteine. Nachfolgend sind die verwendeten Oligonukleotidpaare zur Durchführung der PCR-Amplifikation aufgelistet:

Map(1-203)-fw: 5'-CAAGCTTACCATGTTTAGTCCAATGA-3'
Map(1-203)-rev: 5'-CAAGGAGCTCCAACCGAGTATACTGTAC-3'
Map(45-203)-fw: 5'-CGCGAAGCTTAGCATGTCTGAACCTTATGATTAATC-3'
Map(45-203)-rev: 5'-CTAGAGCTCCAGCCGAGTATCCTGCACATTGTC-3'
Map(1-100)-fw: 5'-TATTAAGCTTATGTTTAGTCCAACGGCAATG-3'
Map(1-100)-rev: 5'-ACTGGATCCCGAATTACTACTCATGC-3'
Map(1-152)-fw: 5'-TATTAAGCTTATGTTTAGTCCAACGGCAATG-3'
Map(1-152)-rev: 5'-ATCGGATCCTTTACCACACTGC-3'
EspF-fw: 5'-GGCAAAGCTTATGCTTAATGGAATTAGTAAC-3'
EspF-rev: 5'-TTAGGATCCTTTCTTCGATTGCTCATA-3'

Herstellung von Map(1-44)-GFP in pYES2:

Die Sequenz der N-terminalen 44 Aminosäuren des Map-Toxins kodierender DNA-Einzelstrang wurde als Oligonukleotid gemeinsam mit einem komplementären Oligonukleotid bestellt. Die beiden Oligonukleotide wurden so gewählt, dass nach Hybridisierung ein 5'-HindIII- und ein 3'-BamHI-Überhang erzeugt wird. Das aus der Hybridisierung der beiden Oligonukleotide entstandene doppelsträngige DNA-Fragment konnte mittels HindIII und BamHI in das ebenfalls mit HindIII/BamHI geöffnete Plasmid pYES2/GFP durch Ligation inseriert werden. Im Fusionsprotein ist

der N-Terminus des Map-Toxins (AS 1-44) durch das Tetrapeptid Gly-Ser-Pro-Ile mit dem GFP-Protein verbunden.

Map(1-44)-fw: 5'→3'

AGCTTATGTTT TAGTCCAACGGCAATGGTAGGTAGAGCGTTAGCTCAGGCGGTTA
CACAAACTCTTAGACCCGCTGTAACCAAGGCTGCGACGCAAGCGGGCATGGCA
GCCAGTGGTATGAGGTTACACCTATGCAGG

Map(1-44)-rev: 5'→3'

ATACAAATCAGGTTGCCGTTACCATCCATCTCGCAATCGAGTCCGCCAATGTGT
TTGAGAATCTGGGCGACATTGGTTCCGACGCTGCGTTCGCCCCGTACCGTCGGT
CACCATACTCCAAGTGTGGATACGTCCCTAG

Herstellung von Map(1-203)_{W74A}-GFP, Map(45-203)_{W74A}-GFP, Map(1-203)_{K76R}-GFP
und Map(45-203)_{K76R}-GFP in pYES2:

Zunächst wurden die gewünschten Aminosäuresubstitutionen des Map-Toxins (W74A bzw. K76R) ausgehend vom Plasmid pGEM-4/Map mittels QuikChange-Verfahren durchgeführt. Hierbei kamen folgende mutagene Oligonukleotide zum Einsatz:

Map_{W74A}-fw: 5'-GTGATACCCAGCAAGCTTTCAAGCAAGAGCAG-3'

Map_{W74A}-rev: 5'-CTGCTCTTGCTTGAAAGCTTGCTGGGTATCAC-3'

Map_{K76R}-fw: 5'-CAGCAATGGTTCAGGCAAGAGCAGATTAC-3'

Map_{K76R}-rev: 5'-GTAATCTGCTCTTGCCTGAACCATTGCTG-3'

Anschließend wurde Map_{W74A} und Map_{K76R} aus dem Ausgangsvektor pGEM-4 mit den Oligonukleotidpaaren Map(1-203)-fw/-rev bzw. Map(45-203)-fw/-rev mittels PCR amplifiziert. Durch Inkubation der Amplifikationsprodukte mit den Restriktionsenzymen HindIII und SacI wurden entsprechende Überhänge erzeugt, die eine Insertion durch Ligation in das ebenfalls mit HindIII und SacI geöffnete Plasmid pYES2/GFP erlauben. Das Tetrapeptid Glu-Ser-Pro-Ile fungierte bei den Fusionsproteinen als Übergang der Map-Domäne zum GFP-Protein.

2.2.2. Zellbiologische Methoden

2.2.2.1. Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Saccharomyces cerevisiae kann sowohl in fermentierbarem als auch in nicht-fermentierbarem Nährmedium wachsen. In der Regel wurde in den Nährmedien Glycerin als nicht-fermentierbare Kohlenstoffquelle verwendet. Vor allem bei der Isolierung von Hefemitochondrien war dies von Vorteil, da die Zellen gezwungen werden zu atmen und dadurch ein ausgeprägtes mitochondriales Netzwerk aufweisen. Alternativ wurde auch Glukose als Kohlenstoffquelle angeboten. Da Glukose fermentierbar ist, können in Glukose-haltigen Nährmedien auch atmungsdefiziente Hefestämme wachsen. Hefestämme wurden in YPG – Medium (1% [w/v] Hefeextrakt, 2% [w/v] Pepton, 3% [v/v] Glycerin, pH4.8-5.0) oder YPD – Medium (1% [w/v] Hefeextrakt, 2% [w/v] Pepton, 2% [w/v] Glukose, pH6.5) durch Inkubation bei 30°C unter Schütteln angezüchtet. Für die Durchführung von Verdünnungsausstrichen zur Entnahme von Einzelkolonien wurde den Nährmedien 2% (w/v) Agar zugegeben und nach dem Autoklavieren hieraus Platten mit Nährmedium zum Ausstreichen der Hefezellen gegossen.

2.2.2.2. Herstellung kompetenter Hefezellen

Hefezellen wurden in 5 ml YPD – Medium durch Inkubation bei 30°C angezüchtet und in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600nm}=0,6$) durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 g wieder geerntet. Die Zellen wurden dann in 1 ml Lösung A (1 M Sorbit, 10 mM Bicin pH8.35, 3% [w/v] Ethylenglykol) resuspendiert und bei -80°C bis zur Transformation gelagert.

2.2.2.3. Transformation von DNA in Hefezellen

Etwa 10 µl Plasmid-DNA (0,1-2 µg/µl) und 5 µl gescherte Lachssperma-DNA (10 µg/µl) wurden zu den gefrorenen, kompetenten Hefezellen gegeben und für 5 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Lösung B (40% [w/v] Polyethylenglykol 1000, 200 mM Bicin, pH8.35) zugegeben und für 1h bei 30°C inkubiert. Danach wurden die Hefezellen durch Zentrifugation für 5 min bei 1500 g reisoliert, in 1 ml

Lösung C (150 mM NaCl, 10 mM Bicin, pH8.35) resuspendiert, erneut abzentrifugiert und schließlich in 150 µl Lösung C aufgenommen. Die Hefesuspension wurde auf entsprechendes Selektivmedium ausplattiert und zum Heranwachsen von Transformanten bei 30°C inkubiert.

2.2.2.4. Isolierung von Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*

Die Hefezellen wurden vor der Isolierung der Mitochondrien in YPG-Medium angezüchtet. Hierbei werden Gärungsvorgänge unterdrückt und das Mitochondrienwachstum angeregt. Das YPG-Medium enthält als Kohlenstoffquelle Glycerin. Die Mitochondrienisolierung kann prinzipiell in drei Schritte eingeteilt werden. Als erstes muss die Zellwand der Hefezellen mit Zymolyase abgebaut werden. Anschließend erreicht man durch einen osmotischen Schock das Aufbrechen der Zellen. Die Mitochondrien können daraufhin durch differentielle Zentrifugation isoliert werden.

Für die Anzüchtung der Hefezellen wurden 50 ml YPG-Medium mit einer Kolonie der entsprechenden Stammplatte angeimpft und über Nacht bei 30 °C unter Schütteln inkubiert. Mit der Übernachtskultur wurden weitere 400 ml YPG-Medium angeimpft und ebenfalls bei 30 °C über Nacht unter Schütteln inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde dann zum Animpfen von 8 l YPG-Medium verwendet, welches nach einer Inkubation über Nacht bei 30 °C unter Schütteln zur Isolierung der Mitochondrien verwendet wurde. Die Zellen der Hefekultur wurden abzentrifugiert (10 min, 1600 g, 4 °C), in Wasser resuspendiert und erneut abzentrifugiert (5 min, 2800 g, 4 °C). Das Nassgewicht der Zellen wurde bestimmt und die Zellen dann in DTT-Puffer (100 mM Tris/H₂SO₄ pH9.4, 10 mM DTT) resuspendiert (2 ml DTT-Puffer pro Gramm Zellen). Es folgte eine Inkubation bei 30°C für 30 min unter Schütteln. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert (5 min, 2800 g, 4 °C), die Zellen dann in 1,2 M Sorbitol resuspendiert und durch Zentrifugation (5 min, 2800 g, 4 °C) reisoliert. Die Zellen wurden zur Herstellung von Spheroplasten in 7 ml pro Gramm Nassgewicht der Zellen Zymolyase-Puffer (1,2 M Sorbitol, 20 mM KH₂PO₄, pH7.4) resuspendiert, mit etwa 2 – 3 g Zymolyase ergänzt und bei 30°C für 30 – 45 min geschüttelt. Anschließend wurden die Spheroplasten durch Zentrifugation reisoliert (5 min, 2800 g, 4 °C), in 1,2 M Sorbitol resuspendiert, erneut abzentrifugiert (5 min, 2800 g, 4 °C) und schließlich in Homogenisierungspuffer (1,2 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl pH7.4, 1

mM EDTA, 0.2% [w/v] BSA, 1 mM PMSF) aufgenommen (7 ml Homogenisierungspuffer pro Gramm Nassgewicht der Zellen). In 30 ml Portionen wurde die Suspension in einem auf Eis gekühlten Dounce-Homogenisator gegeben und mit 150 µl PMSF (Endkonzentration 1 mM) ergänzt. Die Spheroplasten wurden mechanisch aufgebrochen, indem ein im Homogenisator eng angepasster Teflon-Stempel auf und ab (etwa zehn Mal) bewegt wurde. Es folgte die differentielle Zentrifugation (stets bei 4°C) zur Isolierung der Mitochondrien aus dem Zelllysat:

Durch zwei aneinanderfolgende Zentrifugationsschritte (5 min, 1100 g und 5 min, 1900 g), in denen jeweils der Niederschlag verworfen wurde, konnten Zelltrümmer und nicht aufgeschlossene Spheroplasten vom Zelllysat abgetrennt werden. Die im Überstand sich befindenden Mitochondrien wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 12100 g reisoliert, dann in 5 – 10 ml SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH7.2) aufgenommen und mit 25 – 50 µl 200 mM PMSF ergänzt. Durch eine erste Zentrifugation der Mitochondriensuspension für 5 min bei 1900 g wurden restliche Zelltrümmer und Spheroplasten abzentrifugiert. Die im Überstand verbliebenen Mitochondrien wurden schließlich durch Zentrifugation für 10 min bei 12100 g reisoliert und in ca. 250 µl SEM-Puffer resuspendiert. Mit Hilfe einer Proteinbestimmung nach Bradford wurde die Konzentration der Mitochondriensuspension bestimmt. Durch Zugabe von SEM-Puffer wurde die Konzentration der Mitochondriensuspension auf 10 mg/ml eingestellt. Schließlich wurde die Mitochondriensuspension in Aliquote von 10 – 50 µl aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff augenblicklich eingefroren und bei –80 °C gelagert.

2.2.2.5. Isolierung von Mitochondrien aus der Leber von *Rattus norvegicus*

Rattenleber wurde in kleinere Stücke geschnitten und in Puffer A (300 mM Saccharose, 2 mM EGTA, 10 mM Tris/HCl pH7.4) mit Zugabe von 5 mg/ml BSA und 1 mM PMSF unter Kühlung auf Eis homogenisiert. Durch Zentrifugation bei 500 g und 4°C für 10 min wurden Zellrückstände abgetrennt. Der Überstand wurde bei 12000 g und 4°C für 6 min abzentrifugiert, um eine grobe Anreicherung an Mitochondrien zu erhalten. Die Mitochondrien wurden zur Aufreinigung in 12 ml Puffer A resuspendiert und mit 5% (v/v) Percoll ergänzt. Durch Zentrifugation bei 16000 g und 4°C für 10 min wurden die Mitochondrien reisoliert, in Puffer A resuspendiert, erneut abzentrifugiert und schließlich wieder in einem geringen

Volumen Puffer A aufgenommen. Nach Bestimmung der Proteinkonzentration der Mitochondrien nach Bradford wurde die Konzentration von mitochondrialem Protein auf 10 mg/ml eingestellt. Die Rattenleber-Mitochondrien wurden unmittelbar nach der Isolierung bei Experimenten eingesetzt.

2.2.2.6. Proteinexpression in *E. coli*

Der in dieser Arbeit zur Proteinexpression herangezogene *E. coli* – Stamm C41 (DE3) weist ein Gen zur Herstellung der T7-RNA-Polymerase auf. Das Gen ist über den Bakteriophagen λ DE3 in dessen Chromosom integriert. Die Transkription des Gens zur Herstellung der T7-RNA-Polymerase steht unter der Kontrolle eines IPTG-induzierbaren *lacUV5* – Promotors. Wird die Herstellung der T7-RNA-Polymerase durch Zugabe von IPTG induziert, so kann gleichzeitig auch die Expression von Fremdgenen induziert werden, wenn diese unter der Kontrolle eines T7-Promotors stehen. Für die T7-induzierbare Expression von Fremdgenen in *E. coli* eignen sich besonders die Vektoren der pET-Reihe von der Firma Novagen. In dieser Arbeit kam der Vektor pET28a zum Einsatz. Die Gene, welche exprimiert werden sollten, wurden zunächst in den pET28a-Vektor eingebracht und dann kompetente *E. coli* – Zellen des Stammes C41 (DE3) damit transformiert. Anschließend wurde eine Vorkultur (2 ml LB-Medium, 30 μ g/ml Kanamycin) mit Transformanten angeimpft und ü.N. bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Mit der Vorkultur wurde eine Expressionskultur (500 ml LB-Medium, 30 μ g/ml Kanamycin) angeimpft und bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 angezüchtet. Anschließend wurde durch Zugabe von 1 mM IPTG und Inkubation für 16 h bei 37°C die Expression des Fremdgens induziert.

2.2.2.7. Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Proteinexpression in *Saccharomyces cerevisiae* wurde in dieser Arbeit der Vektor pYES2 verwendet. Das Gen, welches exprimiert werden sollte, wurde darin inseriert und das Plasmid anschließend in kompetente Hefezellen mit einem *ura3* Genotyp transformiert. Das zur Uracil-Synthese notwendige URA3-Gen ist Teil des pYES2-Vektors und komplementiert die URA3-Deletion in Transformanten. Die Transformanten können somit auf Minimalmedien selektiert werden, welche kein Uracil enthalten. Da Uracil essentiell für das Wachstum der Hefezellen ist, können in

synthetischem Minimalmedium ohne Uracil nur diejenigen Zellen heranwachsen, welche das Plasmid aufgenommen haben. Darüber hinaus weist der pYES2-Vektor einen GAL1-Promotor auf. Dieser kontrolliert die Transkription der inserierten Fremdgene und kann durch Wachstum der Hefezellen in Galaktose induziert werden.

Synthetisches Minimalmedium ohne Uracil (SM/-ura):

0.67% (w/v) *yeast nitrogen base*, 0.01% (w/v) Adenin, Arginin, Cystein, Lysin, Threonin, Tryptophan, 0.005% (w/v) Aspartat, Histidin, Isoleucin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Tyrosin, Valin.

Eine Vorkultur (5 ml SM/-ura, 2% [w/v] Raffinose) wurde zunächst mit Kolonien einer Platte angeimpft und ü.N. bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Mit einer oder mehreren Vorkulturen wurde ein beliebiges Volumen SM/-ura + 2% (w/v) Galaktose angeimpft und durch Schütteln ü.N. bei 30°C die Genexpression induziert. Sollte die Dauer der Induzierung nur wenige Stunden betragen, wurden die Zellen zunächst in Raffinose-haltigen Minimalmedium bis zu einer OD von 1 – 3 angezüchtet. Anhand der Formel $x \text{ (ml)} = 0.5 / OD_{\text{erreicht}} * \text{Volumen}_{\text{gewünscht}}$ wurde die Menge an Kulturvolumen berechnet, welche bei 1500 g für 5 min abzentrifugiert werden muss, um anschließend nach Aufnahme der Zellen in Galaktose-haltigem Minimalmedium eine $OD_{600\text{nm}}$ von etwa 0,5 zu erreichen. Mit Aufnahme der Zellen in Galaktose-haltiges Minimalmedium wurde der Beginn der Induzierung definiert und erfolgte für die gewünschte Dauer durch Inkubation der Kulturen bei 30°C unter Schütteln.

2.2.2.8. Test auf Vitalität von *Saccharomyces cerevisiae*

Wurde ein Fremdgen in *Saccharomyces cerevisiae* zur Expression gebracht, sollte unter Umständen untersucht werden, ob das hergestellte Fremdprotein einen negativen Einfluss auf das Wachstum der Hefezellen ausübt. Hierzu wurden Hefezellen, welche den Fremdgen-tragenden Expressionsvektor aufweisen und solche die nur den leeren Expressionsvektor aufweisen, in Raffinose-haltigem synthetischem Minimalmedium (bei pYES2 ohne Uracil) ü.N. bei 30°C angezüchtet. Die Zelldichte der beiden Kulturen wurde mit Hilfe eines Photometers bestimmt und durch Zugabe von Minimalmedium diese angeglichen. Anschließend wurden Verdünnungen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} in Minimalmedium hergestellt. Direkt aus den

unverdünnten Kulturen (10^0), sowie aus den Verdünnungsstufen, wurden jeweils 5 – 10 μ l auf eine Glukose- und eine Galaktose-haltige Agarplatte mit Minimalmedium nebeneinander aufgetropft. Die Platten wurden bei 30°C für 2 – 3 Tage inkubiert und anschließend das Wachstum Fremdgen-enthaltender Hefezellen mit Hefezellen, welche den leeren Expressionsvektor besitzen, unter induzierenden (Galaktose) und nicht-induzierenden (Glukose) Bedingungen verglichen. Alternativ konnten auch die Folgen zweier Proteine, welche sich durch eine Deletion oder Punktmutation unterscheiden, auf das Wachstum der Hefezellen miteinander verglichen werden.

2.2.2.9. *In vitro* Import von Vorstufenproteinen in isolierte Mitochondrien

Der Import von Vorstufenproteinen in Mitochondrien kann unter *in vitro* Bedingungen untersucht werden, indem isolierte Mitochondrien mit radioaktiv-markiertem Protein aus Retikulozytenlysat unter geeigneten Pufferbedingungen inkubiert werden. Der Translokationsprozess kann eingehender durch Verwendung von Mitochondrien aus bestimmten Hefemutanten und durch Änderung der Pufferbedingungen untersucht werden. Die meisten Vorstufenproteine können unter Standardbedingungen in isolierte Mitochondrien importiert werden. Typische Importansätzen weisen ein Gesamtvolumen von 50 μ l auf, enthalten 25 – 50 μ g Mitochondrien (gemessen an mitochondrialem Protein) und 1 – 10 μ l Retikulozytenlysat. Unter Standardbedingungen enthält der Importpuffer 10 mM MOPS pH7.4, 3% (w/v) Fettsäure-freies BSA, 250 mM Saccharose, 80 mM KCl, 1 mM NADH, 0.5 mM ATP, 20 mM Kaliumphosphat und 5 mM Magnesiumchlorid.

Die isolierten Mitochondrien wurden zunächst mit dem Importpuffer vermischt und für 5 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde Retikulozytenlysat hinzugegeben und damit der Beginn der Importreaktion definiert. Die Importreaktion wurde unter Standardbedingungen bei 25°C durchgeführt. Durch Überführung des Importansatzes auf Eis wurde die Importreaktion gestoppt. Nicht-importierte Vorstufenproteine des Retikulozytenlysats wurden durch Zugabe von Proteinase K in einer vorher bestimmten Konzentration, welche zur Degradation des Vorstufenproteins ausreicht, in einer 10-minütigen Inkubation auf Eis abgebaut. Die Proteinase K wurde durch Zugabe von 2 mM PMSF und 5-minütiger Inkubation auf Eis gestoppt. Anschließend wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation bei 16000 g für 10 min und 4°C reisoliert, in 100 μ l SEM-Puffer (250 mM Saccharose, 1 mM

EDTA, 10 mM MOPS, pH7.2) resuspendiert und wieder abzentrifugiert. Durch Überführung der Mitochondrien in 20 µl SDS-Probenpuffer, 5-minütigem Kochen bei 95°C und Auftrennen der mitochondrialen Proteine in der Probe durch SDS-PAGE konnte nach Trocknen des SDS-Gels und Exposition auf einem strahlungsempfindlichen Film, durch Autoradiographie der importierte Anteil an radioaktiv-markiertem Vorstufenprotein nachgewiesen und quantitativ mit AIDA-Software bestimmt werden.

2.2.2.10. Selektives Öffnen der mitochondrialen Außenmembran

Die submitochondriale Lokalisation von importierten Vorstufenproteinen kann teilweise durch selektives Öffnen der mitochondrialen Außenmembran untersucht werden. Das Öffnen der Außenmembran von Mitochondrien wird durch Inkubation in hypotonischem Puffer erreicht (Schwellen der Mitochondrien). Durch das osmotische Ungleichgewicht, bedingt durch die hohe Ionenstärke in der mitochondrialen Matrix, dringt Wasser in die Mitochondrien ein und führt zum Ausdehnen der mitochondrialen Innenmembran. Da diese eine weitaus größere Oberfläche als die Außenmembran aufweist, bricht letztere aufgrund der starken Dehnkräfte auseinander. Dabei entstehen Mitoplasten, welche keine Außenmembran mehr aufweisen. Im Intermembranraum bzw. in der Außenmembran lokalisierte Proteine sind nach dem Schwellvorgang zugänglich für Proteinase K oder nicht mehr mit den Mitochondrien assoziiert. In der Innenmembran inserierte Proteine, sowie Proteine, welche in die Matrix importiert worden sind, bleiben für die Proteinase K unzugänglich und können durch Zentrifugation mit den Mitochondrien reisoliert werden. Der Schwellvorgang kann durch ein Protein der Innenmembran (z.B. ADP/ATP-Translokator) überprüft werden, da die Termini dieses Proteins in den Intermembranraum ragen und bei Mitoplasten durch Proteinase K abgebaut werden.

Nach Durchführung der Importreaktion wurde der Importansatz (50 µl) mit 450 µl EM-Puffer (1 mM EDTA, 10 mM MOPS, pH7.2) vermischt und für 20 – 30 min auf Eis inkubiert, um Mitoplasten zu erzeugen. Anschließend wurde Proteinase K in einer geeigneten Konzentration zur Degradation nicht-importierter und nach Schwellen zugänglicher Vorstufenproteine hinzugegeben. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde die Proteinase K mit 2 mM PMSF wieder gestoppt und die Mitoplasten bei 16000 g für 10 min und 4°C abzentrifugiert. Nach Waschen in 100 µl SEM-Puffer

wurden die Mitoplasten in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C gekocht. Durch SDS-PAGE und Autoradiographie konnte die submitochondriale Lokalisation des importierten Vorstufenproteins untersucht werden.

2.2.3. Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1. Denaturierende Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Bei der SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese) erreicht man durch Vorbehandlung der Proteine mit Natriumlauroylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), dass nur das Molekulargewicht der Proteine für die Wanderung im elektrischen Feld ausschlaggebend ist. SDS ist ein synthetisches Detergenz mit stark amphipatischen Eigenschaften. Oligomere Proteine zerfallen in Anwesenheit von SDS in ihre Untereinheiten und werden hierbei denaturiert. An die entfalteten Proteine binden SDS-Moleküle, dadurch erhalten die Proteine eine negative Ladung. Die SDS-PAGE wurde in einem senkrecht angeordneten Gel aus polymerem Acrylamid durchgeführt. Die Proben wurden zunächst in einem Sammelgel konzentriert und anschließend im daran angrenzenden Trenngel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Anhand eines mitaufgetragenen Proteinmarkers konnte das Molekulargewicht der einzelnen Proteine bestimmt werden.

Bodengel (20%):

6.7 ml Acrylamid (30 %, Rotiphorese 30, Acrylamid/Bisacrylamid 37/1), 1.1 ml H₂O, 2.0 ml Trenngelpuffer (22.68% [w/v] Tris, pH8.8), 0.1 ml SDS-Lösung (10% [w/v] SDS), 100 µl APS-Lösung (10% [w/v] Ammoniumpersulfat), 20 µl TEMED

Trenngel (17.5%):

9.7 ml Acrylamid (30 %, Rotiphorese 30, Acrylamid/Bisacrylamid 37/1), 3.5 ml H₂O, 3.5 ml Trenngelpuffer (22.68% [w/v] Tris, pH8.8), 0.167 ml SDS-Lösung (10% [w/v] SDS), 100 µl APS-Lösung (10% [w/v] Ammoniumpersulfat), 20 µl TEMED

Sammelgel (17.5%):

0.83 ml Acrylamid (30 %, Rotiphorese 30, Acrylamid/Bisacrylamid 37/1), 3.6 ml H₂O, 0.5 ml Trenngelpuffer (7.26% [w/v] Tris, pH6.8), 0.05 ml SDS-Lösung (10% [w/v] SDS), 50 µl APS-Lösung (10% [w/v] Ammoniumpersulfat), 10 µl TEMED

Das Boden-, Trenn- und Sammelgel wurde nacheinander zwischen zwei in einen Gelschuh vertikal aufgestellte Glasplatten (Abmessungen: 14,5 cm x 13 cm) gegossen. Um bei der Polymerisation des Trenngels eine glatte Oberfläche zu erhalten, wurde die Gellösung mit Isopropanol überschichtet. Ein Kamm wurde nach Gießen der Sammelgellösung eingesetzt und nach der Polymerisation des Sammelgels wieder vorsichtig entfernt. In die dadurch entstandenen Taschen konnten die in SDS-Probenpuffer (2% [w/v] SDS, 10% [w/v] Glycerin, 60 mM Tris/HCl pH6.8, 0.02% [w/v] Bromphenolblau, 5% [v/v] Mercaptoethanol) gelösten Proben mit einer Hamilton-Spritze aufgetragen werden, nachdem sie für 5 min bei 95 °C gekocht wurden. Das Gel wurde vor dem Auftragen der Proben in eine Elektrophorese-Kammer eingespannt. Der Anoden- und Kathodenvorratsbehälter wurde mit Elektrophoresepuffer (1.44% [w/v] Glycin, 0.1% [w/v] SDS, 0.3% [w/v] Tris) befüllt. Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA durchgeführt. Um das Molekulargewicht der Proben auf dem SDS-Gel bestimmen zu können, wurde zusätzlich ein Proteinmarker der Firma Fermentas mitaufgetragen. Der Proteinmarker enthielt folgende Markerproteine: β-Galactosidase aus *E. coli* (116 kD), Rinderserum-Albumin aus Rinder-Plasma (66,2 kD), Ovalbumin aus Hühnereiweiß (45 kD), Lactatdehydrogenase aus Schweinemuskel (35 kD), Restriktionsendonuklease Bsp981 aus *E. coli* (25 kD), β-Lactoglobulin aus Kuhmilch (18,4 kD), Lysozym aus Hühnereiweiß (14,4 kD).

2.2.3.2. Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose (Western Blot)

Wurden die Proteine durch SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt, konnten sie durch Anlegen eines elektrischen Feldes auf eine Nitrozellulosemembran transferiert werden. Dieser Vorgang wird auch als Western Blot bezeichnet.

Jeweils zwei Stücke dünnes und dickes Chromatographiepapier und eine Membran wurden in Gelgröße zurechtgeschnitten und in den Blot-Puffer (20 mM Tris, 150 mM Glycin, 0.02% [w/v] SDS, 20% [v/v] Methanol) getränkt. Die einzelnen Komponenten

zur Durchführung des Transfers der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran wurden in folgender Reihenfolge luftblasenfrei auf der Anode der Western-Blot-Apparatur übereinander geschichtet:

- eine Lage dickes Chromatographiepapier
- eine Lage dünnes Chromatographiepapier
- das Gel
- die Membran
- eine Lage dünnes Chromatographiepapier
- eine Lage dickes Chromatographiepapier

Nach dem Aufsetzen der Kathode wurde der Transfer der Proteine bei konstanter Stromstärke von 250 mA (2 mA/cm^2) und einer Dauer von 90 min durchgeführt.

2.2.3.3. Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Die Proteinlösung wurde mit eiskalter Trichloressigsäure (*trichloric acid*, TCA) versetzt (Endkonzentration 10%) und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Proteine durch Zentrifugation bei 16000 g für 15 min und 4°C abzentrifugiert und zweimal mit Aceton gewaschen. Die Proteine wurden in Probenpuffer aufgenommen und für 5 min bei 95°C gekocht.

2.2.3.4. Native Auftrennung von Proteinkomplexen (BN-PAGE)

Die blaue Nativgelelektrophorese (*blue native polyacrylamide gel electrophoresis*, BN-PAGE) erlaubt die Auftrennung von löslichen Proteinkomplexen und solubilisierten Membranproteinen. Die von Schagger und Jagow (1991) entwickelte Methode erlaubt im Hinblick auf die Erforschung der Mitochondrien-Biogenese, die Aufklärung der Assemblierung importierter Vorstufenproteine und die Charakterisierung von submitochondrialen Translokationsmaschinerien. Bei der BN-PAGE werden Membranproteine und Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dies wird erreicht, indem die Proteine von dem anionischen Farbstoff Coomassie Blue G-250 gebunden werden.

Vorbereitung der Proben:

Nach einem Importexperiment wurden die Mitochondrien in 70 µl Lysepuffer (1% [w/v] Digitonin, 20 mM Tris 20 mM, 0.1 M EDTA, 50 mM NaCl, 10% [v/v] Glycerin, 1 mM PMSF, pH7.0) aufgenommen und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden Aggregate durch 20-minütige Zentrifugation bei 16000 g und 4°C abzentrifugiert und die solubilisierten und löslichen Proteine des Überstandes mit 7 µl BN-Probenpuffer (500 mM EACA, 100 mM Bistris, 5% [w/v] Serva Blue G, pH7.0) vermischt.

Vorbereitung des BN-Gels:

Ausgehend von einer wässrigen Acrylamid (49,5% [v/v]) / Bisacrylamid (3% [v/v]) – Mischung (AB-Mix) wurde eine 4 und 16 %-ige bzw. 6 und 20 %-ige Trenngellösung ($[\text{Acrylamidkonzentration}_{\text{gewünscht}} * 2]\%$ AB-Mix, 33.3% [v/v], 66 mM EACA, 49.5 mM Bistris, pH7.0) hergestellt. Die 16 bzw. 20 %-ige Trenngellösung enthielt zusätzlich 20% (w/v) Glycerin. Durch Zugabe von 0,4% (v/v) APS und 0,04% (v/v) TEMED wurde die Polymerisation der Trenngellösungen begonnen. Mit Hilfe eines Gradientenmischers wurden in dieser Arbeit Trenngele mit Acrylamidkonzentrationen von 4-16% bzw. 6-20% gegossen. Auf das auspolymerisierte Trenngel wurde eine Sammelgellösung (8% [v/v] AB-Mix, 66 mM EACA, 49.5 mM Bistris, pH7.0) gegossen und durch Zugabe von 0,8% (v/v) APS und 0,32% (v/v) TEMED zur Polymerisation gebracht. Ein Kamm wurde eingesetzt, um nach dem Auspolymerisieren des Sammelgels, die für das Beladen der Proben erforderlichen Taschen zu erhalten.

Durchführung der Elektrophorese:

Das mit den Proben beladene BN-Gel wurde in eine kühlbare Elektrophoreseapparatur eingesetzt und Anodenpuffer (50 mM Bistris, pH7.0) bzw. Kathodenpuffer (50 mM Tricin, 15 mM Bistris, 0.02% [w/v] Serva Blue G, pH7.0) in die hierfür vorgesehenen Behälter gefüllt. Die Elektrophorese wurde unter ständiger Kühlung zunächst für 90 min bei 200 V und anschließend ü. N. bei 500 V mit Begrenzung auf 15 mA Stromstärke durchgeführt. Für die Molekulargewichtsbestimmung wurden folgende Markerproteine verwendet: Carb. Anhydr. (29 kD), BSA (66 kD), ADH (150 kD), β -Amylase (200 kD), Apoferritin (440 kD), Thyroglobulin (696 kD).

2.2.3.5. Denaturierende Auftrennung von Proteinkomplexen (2D-PAGE)

Eine 2D-PAGE ist die Kombination zweier unterschiedlicher Elektrophoresen. In dieser Arbeit wurde als erste Dimension eine BN-PAGE zur Auftrennung von Proteinkomplexen durchgeführt. Die Proteinkomplexe wurden dann in der zweiten Dimension unter denaturierenden Bedingungen (SDS-PAGE) in ihre Bestandteile aufgetrennt.

Aus dem BN-Gel wurde die Spur von Interesse ausgeschnitten und anschließend waagrecht, etwa 3 cm unterhalb der Oberkante, zwischen zwei Glasplatten, welche der Herstellung von SDS-Gelen dienen, eingespannt. Danach wurde das SDS-Gel wie in 2.2.3.1. beschrieben gegossen, sodass die BN-Gelspur von auspolymerisiertem Sammelgel umgeben war. Gleichzeitig wurde während des Gießvorgangs ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt, um nach dem Auspolymerisieren eine für den Molekulargewichtsmarker notwendige Tasche zu erzeugen. Schließlich wurde die Elektrophorese bei 35 mA durchgeführt. Nachdem die Proben aus der BN-Gelspur in das Trenngel übergetreten sind wurde die Elektrophorese kurz unterbrochen, um die BN-Gelspur vorsichtig mit Hilfe eines dünnen Spatels aus dem Sammelgel zu entfernen. Dies war notwendig, um eine gleichmäßige Auftrennung der BN-Proben auf dem SDS-Gel zu erhalten.

2.2.3.6. *In vitro* Synthese radioaktiv markierter Proteine

Für die *in vitro* Synthese radioaktiv markierter Proteine wurden die *TNT[®] T7/Sp6 Coupled Reticulocyte Lysate System* Reagenzien der Firma Promega verwendet.

Folgender Reaktionsansatz wurde in einem Eppendorfgefäß zusammenpipettiert:

25 µl Retikulozytenlysat

2 µl *TNT[®]*-Reaktionspuffer

1 µl *TNT[®] T7* bzw. *Sp6* Polymerase

1 µl Aminosäuremix ohne Methionin

2 µl ³⁵S-Methionin

1 µl RNase-Inhibitor

x µl Plasmid-DNA (1 µg)

x µl Nuklease-freies Wasser (bis zu einem Endvolumen von 50 µl)

Der Reaktionsansatz wurde für 90 min bei 30 °C inkubiert und danach bei –80 °C gelagert.

2.2.3.7. Aufreinigung von Proteinen aus Einschlusskörperchen von *E. coli*

Zur Aufreinigung eines in *inclusion bodies* (Einschlusskörperchen) vorliegenden Proteins wurden zunächst die exprimierenden *E. coli* – Zellen durch Zentrifugation geerntet, in Lösung I (50 mM Tris/HCl pH8, 25% [w/v] Saccharose, 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert und für 75 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 25 mM EDTA und 2% [v/v] Triton X-100 wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (*duty cycle* 50%, *output limit* 3, 2x15 Pulse) aufgeschlossen. Die *inclusion bodies* wurde dann durch Zentrifugation bei 39200 g für 30 min aus dem Zellaufschluss abgetrennt. Anschließend wurden die *inclusion bodies* zunächst in Lösung II (100 mM Tris/HCl pH8, 6% [w/v] Harnstoff, 1% [v/v] Triton X-100, 0.1% [v/v] Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) aufgenommen und erneut wie zuvor mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Die *inclusion bodies* wurden nun in Lösung III (100 mM Tris/HCl pH8, 6% [w/v] Harnstoff, 0.1% [v/v] Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) resuspendiert und wie in den vorherigen Schritten mit Ultraschall behandelt und zentrifugiert. Letzterer Schritt in Lösung III wurde zweimal wiederholt. Schließlich wurden die *inclusion bodies* in Lösung IV (100 mM Tris/HCl pH8, 42% [w/v] Harnstoff) resuspendiert. Proben wurden zu jeder Stufe der Aufreinigung entnommen, um anschließend durch SDS-PAGE und Antikörpernachweis den Aufreinigungsgrad des exprimierten Proteins aus *inclusion bodies* zu überprüfen.

2.2.3.8. Chemisches Quervernetzen von mitochondrialen Proteinen

Mit einem chemischen Quervernetzer können zwei miteinander interagierende Proteine kovalent verbunden (quervernetzt) werden. In dieser Arbeit wurde der Quervernetzer MBS (m-Maleimidobenzyl-N-hydroxysuccinimidester) für die Quervernetzung zweier mitochondrialer Proteine verwendet. MBS kann durch biologische Membranen hindurch diffundieren und bewirkt als bifunktionaler Quervernetzer die Verknüpfung von Cysteinseitenketten mit Lysinseitenketten.

Um ein importiertes Vorstufenprotein mit einem endogenen, mitochondrialen Protein durch chemische Quervernetzung zu verknüpfen, wurden nach der Importreaktion (mit 100 µg Mitochondrien und 15 % [v/v] Retikulozytenlysat) die Mitochondrien abzentrifugiert (16000 g, 10 min 4°C) und in 150 µl HS – Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH7,4) resuspendiert. Nach Zugabe von 1 mM MBS (in DMSO) wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert und anschließend durch Zugabe von 0,1 M Glycin und 15-minütiger Inkubation auf Eis die Quervernetzungsreaktion gestoppt. Die Mitochondrien wurden schließlich abzentrifugiert (16000 g, 10 min , 4°C) und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die kovalent miteinander verbundenen Proteine konnten durch SDS-PAGE und Autoradiographie identifiziert werden.

2.2.3.9. Degradation mitochondrialer Oberflächenproteine mit Trypsin

Isolierte Mitochondrien aus Hefe oder Rattenleber können vor dem Importexperiment mit Trypsin vorbehandelt werden, um alle Oberflächenproteine proteolytisch abzubauen. Dies ist dann notwendig, wenn gezeigt werden soll, dass Rezeptoren der Außenmembran an der Erkennung und Translokation eines Vorstufenproteins beteiligt sind. Die Trypsin-Moleküle werden vor der Durchführung des Importexperimentes mit Trypsin-Inhibitor inaktiviert, damit die im nachfolgenden Schritt hinzugegebenen Vorstufenproteine nicht vor dem Import in Mitochondrien frühzeitig abgebaut werden. Die nachfolgenden Angaben beziehen sich auf die Trypsin-Vorbehandlung von Mitochondrien für die Aufteilung auf vier Importansätze. Isolierte Mitochondrien (120 µg) wurden insgesamt in 90 µl eiskaltem SEM-Puffer aufgenommen und 10 µl Trypsin/SEM – Lösung (1 mg/ml) hinzugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis wurde 15 µl Trypsin-Inhibitor (20 mg/ml) hinzupipettiert und für weitere 5 min auf Eis inkubiert. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation bei 16000 rpm für 10 min und 4°C reisoliert, in 196 µl Importpuffer inklusive 0,5 mg/ml Trypsin-Inhibitor resuspendiert und 5 min bei 25°C inkubiert. Schließlich wurde die Mitochondrien-Suspension auf vier Importansätze à 49 µl aufgeteilt. Durch Zugabe von 1 µl Retikulozytenlysat wurde der Import der Vorstufenproteine in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien begonnen.

2.2.3.10. Degradation von Vorstufenproteinen mit Proteinase K

Für Importexperimente ist es wichtig, die Mindestkonzentration an Proteinase K zu bestimmen, welche zur vollständigen Degradation eines in Retikulozytenlysat hergestellten Vorstufenproteins innerhalb einer definierten Zeit und Temperatur ausreicht. Aus diesem Grund werden identische Mengen an Retikulozytenlysat mit ansteigenden Konzentrationen an Proteinase K inkubiert und anschließend, nach SDS-PAGE und Autoradiographie, die Proteinase – Konzentration bestimmt, in der das Vorstufenprotein vollständig abgebaut worden ist.

Retikulozytenlysat (5 µl) wurde mit 120 µl SEM – Puffer vermischt und auf 5 Ansätze à 25 µl verteilt. Dann wurden aus einer Proteinase K/SEM – Lösung (100 µg/ml) in die jeweiligen Ansätze 0.5 µl (f.c. 2 µg/ml), 1.25 µl (f.c. 5 µg/ml), 2.5 µl (f.c. 10 µg/ml) bzw. 5 µl (f.c. 20 µg/ml) hinzupipettiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde durch Zugabe von 2 mM PMSF und 5-minütiger Inkubation auf Eis die Proteinase K inhibiert. Die Ansätze wurden schließlich mit 20 µl SDS-Probenpuffer vermischt, 5 min bei 95°C gekocht und anschließend eine SDS-PAGE durchgeführt. Mittels Autoradiographie konnte die Degradation der Vorstufenproteine ausgewertet werden.

2.2.3.11. Alkalische Extraktion mitochondrialer Membranproteine

Membranproteine sind resistent gegenüber einer Extraktion mit Salzen. Peripher mit Membranen assoziierte Proteine hingegen, werden durch eine Behandlung mit Natriumcarbonat von den Membranen abgetrennt. Durch Zentrifugation können somit die in der Membran verankerten Proteine aufgereinigt werden, indem die löslichen und die durch Natriumcarbonat extrahierten Proteine mit dem Überstand abgenommen werden.

Nach dem Import eines Vorstufenproteins in isolierte Mitochondrien wurden die Mitochondrien in eiskalter Natriumcarbonat-Lösung (100 mM Na₂CO₃) aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 245000 g für 20 min und 4°C, um die Membranproteine abzutrennen. Der Überstand wurde abgenommen und die Proteine nach TCA-Fällung in 20 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen. Der Niederschlag wurde ebenfalls in 20 µl SDS-Probenpuffer. Nach SDS-PAGE der beiden Proben konnte durch Autoradiographie ausfindig gemacht werden, ob es sich

beim untersuchten Vorstufenprotein um ein integrales Membranprotein oder ein lösliches bzw. peripher mit der Membran assoziiertes Protein handelt.

2.2.3.12. Immunfällung von Proteinen mit Protein A Microbeads

Immunfällungen wurden mit einer Methode der Firma Miltenyi Biotec durchgeführt, welche eine Aufreinigung von IgG-Antikörpern über Protein A – überzogene Magnetkügelchen (*μMACS™ Protein A MicroBeads*) und einen starken Magneten (*μMACS™ separator*) mit speziellen Filtern (*μColumns™*) ermöglicht. In dieser Arbeit wurden Immunfällungen unter anderem zum immunologischen Nachweis von chemischen Quervernetzungsprodukten nach dem Import eines Vorstufenproteins in Mitochondrien durchgeführt.

Die Mitochondrien wurden nach der Quervernetzungsreaktion (siehe 2.2.3.8.) in 60 μl Lysepuffer (1% [w/v] SDS, 2 mM PMSF, 100 mM Tris/HCl pH7,4) resuspendiert und durch 15-minütige Inkubation auf Eis zur Lyse gebracht. Anschließend erfolgte 5-minütiges Erhitzen des Ansatzes bei 95°C. Der Ansatz wurde anschließend auf das 20-fache Volumen mit Waschpuffer (0,5% [v/v] Triton X-100 in TBS-Puffer) verdünnt und mit 1 mM EDTA und 1 mM PMSF ergänzt. Unlösliche Aggregate wurden durch Zentrifugation (21000 g, 10 min 4°C) abgetrennt und die Überstände für die Immunfällung verwendet. Die Überstände wurden mit jeweils 100 μl Protein A MicroBeads und 8 μl Antigen-spezifisches IgG-Antiserum ergänzt und für 45 min auf Eis inkubiert. Die *μColumns*-Filter wurden dann in hierfür vorgesehene Einsätze des Magneten platziert und zunächst mit 200 μl Waschpuffer equilibriert. Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend die Ansätze der Immunfällung auf die *μColumns*-Filter gegeben. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und im Filter unspezifisch gebundene Proteine mit 800 μl Waschpuffer herausgewaschen. Schließlich wurden die im Filter über die magnetischen Eigenschaften der Protein A MicroBeads gebundenen Antikörper durch Zugabe von 20 μl heißem SDS-Probenpuffer und Inkubation für 5 min eluiert und das Eluat in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Es folgte eine zweite Elution mit 50 μl heißem SDS-Probenpuffer. Beide Elutionen wurden vereinigt und anschließend eine SDS-PAGE zur Auftrennung der gebundenen Proteine durchgeführt, welche durch Autoradiographie identifiziert werden konnten.

2.2.4. Proteinanalytische Methoden

2.2.4.1. Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Proteine lassen sich nach der Methode von Bradford *et al.* (1976) quantitativ bestimmen. Die quantitative Bestimmung beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G250 an Proteine. Durch die Bindung verschiebt sich das Absorptionsmaximum von 465 nm nach 595 nm. Der Anstieg der Absorption bei 595 nm wird gemessen.

Entsprechende BSA-Standardlösungen (0, 3, 5, 10 und 15 µl) wurden in Halbmikroküvetten pipettiert und mit jeweils 1 ml Bradford-Reagenz (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) vermischt. Das Bradford-Reagenz wurde zuvor aus einer Stammlösung im Verhältnis 1:5 mit Wasser vermischt. Die Absorption bei 595 nm wurde bestimmt und aus den erhaltenen Messwerten eine Eichgerade erstellt. Abhängig von der Proteinmenge wurde ein entsprechendes Volumen der zu bestimmenden Proteinlösung mit 1 ml Bradford-Reagenz in einer Küvette vermischt. Durch den erhaltenen Messwert einer Absorptionsmessung bei 595 nm wurde mit Hilfe der Werte der Eichgeraden die Proteinkonzentration der Proteinlösung bestimmt.

2.2.4.2. Färben von Proteinen in Polyacrylamidgelen mit Coomassie

Proteine lassen sich durch eine Coomassie-Färbung im Gel sichtbar machen. Die Färbung der Gele mit Coomassie-Brilliant-Blue findet in saurem Milieu statt. Dabei bindet der negativ geladene Farbstoffkomplex an die positiv geladene Aminosäuren von Proteinen.

Die Gele wurden in eine mit Färbelösung (0.025% [w/v] Coomassie Brilliant Blue, 40% [v/v] Methanol, 7% [v/v] Essigsäure) befüllte Schale gelegt, kurz in der Mikrowelle aufgekocht und für 10 – 30 min behutsam geschüttelt. Anschließend wurde die Färbelösung abdekantiert und durch Entfärbelösung (40% [v/v] Methanol, 7% [v/v] Essigsäure) ersetzt. Nach kurzem Aufkochen in der Mikrowelle wurde erneut behutsam geschüttelt, bis die Proteinbanden auf dem Gel erkennbar waren.

2.2.4.3. Färben von Proteinen auf Nitrozellulose mit Ponceau S

Wurden Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert (Western Blot) konnten die Proteine mit Ponceau S sichtbar gemacht werden. Hierbei wurde die Membran für etwa 1 min in Ponceau S – Lösung (3% [v/v] Trichloressigsäure, 0.3% [w/v] Ponceau S) getaucht und anschließend mehrmals mit destilliertem Wasser abgespült, bis die Banden der Proteine zu sehen waren.

2.2.4.4. Detektion radioaktiv markierter Proteine durch Autoradiographie

Wurden radioaktiv markierte Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt, wurde das Gel vor der autoradiographischen Detektion getrocknet. Das Gel wurde hierbei auf Chromatographie-Papier gelegt, mit Klarsichtfolie abgedeckt und in einem Geltrockner (65°C, 90 min) unter Vakuum getrocknet. Das getrocknete Gel wurde schließlich auf einen strahlungsempfindlichen Nachweisschirm gelegt und für 1 - 2 Tage darin exponiert. Die absorbierte Strahlung des Nachweisschirms konnte in einem *PhosphorImager*TM über laserinduzierte Phosphoreszenz gemessen und am Computerbildschirm dargestellt werden.

2.2.4.5. Detektion von Proteinen durch Antikörpernachweis

Auf eine Nitrozellulosemembran transferierte Proteine können spezifisch mit Hilfe von Antikörpern nachgewiesen werden. Zunächst wird die Membran für mindestens 1 h in Magermilch-Lösung (5% [w/v] Magermilchpulver, 10 mM Tris, 0.9% [w/v] NaCl, pH7.4) inkubiert, um die Nitrozellulose vollständig mit Proteinen zu sättigen (Blocken). Dies soll verhindern, dass die im nächsten Schritt hinzugegebenen Antikörper unspezifisch an die Nitrozellulosemembran gebunden werden. Nach sorgfältigem Waschen der Membran in TBS (0.9% [w/v] NaCl, 10 mM Tris, pH7.4) wurde die primäre Antikörperlösung hinzugegeben. In der Regel wurde der primäre Antikörper ü.N. mit der Membran inkubiert und am nächsten Tag durch mehrmaliges Waschen in TBS wieder entfernt. Anschließend wurde die sekundäre Antikörperlösung hinzugegeben und nach 1-stündiger Inkubation die Membran mehrmals in TBS wieder gewaschen. Bei dem sekundären Antikörpern handelte es sich in dieser Arbeit hauptsächlich um einen anti-rabbit-IgG-Antikörper (Amersham,

Cleveland, USA). Er wurde als 1:50000 Verdünnung in TBS eingesetzt. Darüber hinaus ist der sekundäre Antikörper mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Mit den ECL-Reagenzien (*enhanced chemilumineszenz*) der Firma Amersham (Cleveland, USA) konnte die Chemilumineszenz der Peroxidase angeregt werden. Dabei wurde die Membran für 1 – 2 min mit den ECL-Reagenzien inkubiert. Danach wurde die Membran auf einen lichtempfindlichen Film gelegt und gemeinsam in eine lichtundurchlässige Kassette gelegt. Nach etwa 10-minütiger Belichtung wurde der Film entwickelt und die Proteinbanden an denen der sekundäre Antikörper den Primärantikörper gebunden hat durch das emittierte Licht der Peroxidase sichtbar gemacht.

2.2.5. Mikroskopische Methoden

2.2.5.1. *In vivo* Färbung von Hefemitochondrien mit MitoTracker

Mitochondrien können unter *in vivo* Bedingungen spezifisch mit dem Farbstoff MitoTracker Orange CMTMRos angefärbt und anschließend mittels Fluoreszenzmikroskopie betrachtet werden. Der MitoTracker – Farbstoff akkumuliert in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential und weist eine Absorption bei 551 nm und eine Emission bei 576 nm auf.

Der Mitotracker – Farbstoff wurde in einer Endkonzentration von 50 nM direkt in eine Schüttelkultur von Hefezellen pipettiert. Alternativ wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert (1500 g, 5 min) und in PBS – Puffer (150 mM NaCl, 20 mM Natriumphosphat, pH7.4) resuspendiert. Die Zellen wurden nach der Zugabe des Mitotracker – Farbstoffes für 30 min bei 30°C geschüttelt. Anschließend wurden die Zellen direkt fluoreszenzmikroskopisch untersucht oder zunächst in PBS – Puffer gewaschen.

2.2.5.2. Konfokale Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen

Hefezellen wurden direkt aus einer Schüttelkultur auf Polylysin-beschichtete Objektträger aufgetropft (5 – 10 µl) und ein Deckglas aufgesetzt. Eine 15-minütige Inkubation des Präparates war für das Immobilisieren der Hefezellen auf dem Objektträger notwendig. In dieser Arbeit sollten die Mitochondrien von Hefezellen

mikroskopisch untersucht werden. Für eine genauere Darstellung der Mitochondrienmorphologie und für die Detektion von Fusionsproteinen aus mitochondrialen Vorstufenproteinen und GFP (*Green Fluorescent Protein*) wurde die konfokale Fluoreszenzmikroskopie (CLSM, *Confocal Laser Scanning Microscopy*) angewendet. Bilder aus Hefezellen wurden mit einem 100er Objektiv und in der Regel mit einem 4-fachen Zoomfaktor aufgenommen. GFP-Fusionsproteine wurden mit einem Argon-Ionen-Laser (488 nm) und MitoTracker-gefärbte Mitochondrien mit einem Helium-Neon-Laser (543 nm) angeregt. Die Fluoreszenz von GFP wurde von 559 bis 686 detektiert. Die Fluoreszenz von MitoTracker wurde von 500 bis 600 nm detektiert. Störender Hintergrund bei Fluoreszenzaufnahmen wurde mit einem Median-Filter (Radius 1 Pixel) entfernt und Kontrast mit Photoshop-Software optimiert.

2.2.6. Immunologische Methoden

2.2.6.1. Immunisieren von Kaninchen

Aufgereinigtes Protein wurde im Verhältnis 1:1 mit Adjuvans (Biogenes GmbH) vermischt und mit einer Spritze subkutan im Bereich des Rückens injiziert. Diese Prozedur wurde über einen Zeitraum von bis zu 9 Monaten im Abstand von 6 – 8 Wochen wiederholt. Die Immunisierung wurde in regelmäßigen Abständen durch Blutentnahme aus der *Vena saphena* und Test des Serums gegen Erkennung des injizierten Proteins mittels Immunoblot überprüft.

2.2.6.2. Ausbluten von Kaninchen zur Antikörpergewinnung

Das Kaninchen wurde narkotisiert mit 0,4 ml Ketamin (10%; 30 mg/kg) und 0,2 ml Xylazin (2%; 4 mg/kg) pro Kilogramm Körpergewicht. Die Wirkung ist nach ca. 15min eingetreten. Das Kaninchen wurde auf den Rücken gelegt, und zur örtlichen Betäubung des Halsbereiches subkutan Lidocainhydrochlorid (2%) injiziert. Es wurde der Halsbereich geöffnet, die *Arteria carotis* freigelegt und an der Kopfseite abgebunden. Mit einem *Venofix-Butterfly* wurde in die Arterie eingestochen, und das abfließende Blut in Falcon-Gefäße aufgefangen. Es konnten ungefähr 60ml Blut aus der Arterie gewonnen werden. Anschließend wurde der Bauchraum geöffnet und mit

einer Kanüle direkt aus dem Herzen mit einer Spritze weitere 10 ml Blut entnommen. Die Gewinnung des Antikörper-enthaltenden Serums aus dem entnommenen Blut wurde von Dipl.-Biol. Elke Dian (Inst. f. Mikrobiologie, Universität Hohenheim) durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Mitochondriale Zielerkennung des Map-Toxins enteropathogener *E. coli*

In den letzten Jahren sind vermehrt bakterielle Proteine entdeckt worden, welche über unterschiedliche Sekretionssysteme in die jeweiligen Wirtszellen gelangen und anschließend in Mitochondrien ihre Funktion ausüben. Dazu gehören das VacA-Toxin von *Helicobacter pylori* (Galmiche, 2000), die beiden Toxine Map und EspF von enteropathogenen *E. coli* (Kenny & Jepson, 2000; Nougayrede & Donnenberg, 2004), PorB von *Neisseria meningitidis* bzw. *Neisseria gonorrhoeae* (Massari, 2000; Müller, 2000), das PVL-Toxin von *Staphylococcus aureus* (Genestier, 2005) und das Protein Omp38 von *Acinetobacter baumannii* (Choi, 2005). Über die mitochondriale Zielerkennung solcher nicht-endogener Proteine ist bisher wenig bekannt. Es stellt sich dadurch die Frage, ob die an Mitochondrien gerichteten bakteriellen Toxine, mitochondriale Zielerkennungsmechanismen des Wirtes nachahmen und wirtsspezifische, mitochondriale Translokationssysteme für die intramitochondriale Lokalisation verwenden oder diese durch neu erfundene Strategien umgangen werden.

3.1.1. Das Map-Toxin ist zur Translokation in isolierte Mitochondrien befähigt

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte zunächst die Frage beantwortet werden, ob das Map-Toxin in der Lage ist in Mitochondrien zu translozieren. Das Map-Toxin wurde zu diesem Zweck unter Verwendung von ³⁵S-markiertem Methionin in Retikulozytenlysat hergestellt und dann unter definierten *in vitro* Bedingungen mit isolierten Mitochondrien unterschiedlicher Herkunft inkubiert. Nach einer definierten Inkubationsperiode wurde Proteinase K zugegeben, um den nicht in Mitochondrien importierten Anteil an Map-Proteinen abzubauen. Der Anteil der vor Abbau geschützten und somit in Mitochondrien translozierten Map-Proteine wurde dann mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) und Autoradiographie bestimmt.

Wird ein bestimmtes Protein zum ersten Mal *in vitro* in Retikulozytenlysat hergestellt, sollte zunächst durch SDS-PAGE die Größe des Proteins überprüft werden. Darüber hinaus muss vor der Durchführung von *in vitro* Importexperimenten zunächst die

Konzentration an Proteinase K bestimmt werden, die in einer definierten Zeit ausreicht, um die eingesetzte Menge des zu untersuchenden Proteins abzubauen. Ein Map-codierendes Plasmid (pGEM4/Map) wurde freundlicherweise von Prof. Brendan Kenny (University of Newcastle, UK) zur Verfügung gestellt. Unter Verwendung dieses Plasmids wurde in Retikulozytenlysat unter Einsatz von ^{35}S -Methionin durch *in vitro* Transkription und Translation radioaktiv markiertes Map-Protein hergestellt. Zusätzlich wurde ^{35}S -markiertes Map-Protein mit ansteigenden Konzentrationen an Proteinase K in jeweils separaten Ansätzen für 10 min auf Eis inkubiert. Die Proteinase K wurde dann durch Zugabe von PMSF inaktiviert. Durch SDS-PAGE und Autoradiographie wurden die im Lysat entstandenen Proteine und das Ergebnis der Proteinase K – Degradation ausgewertet.

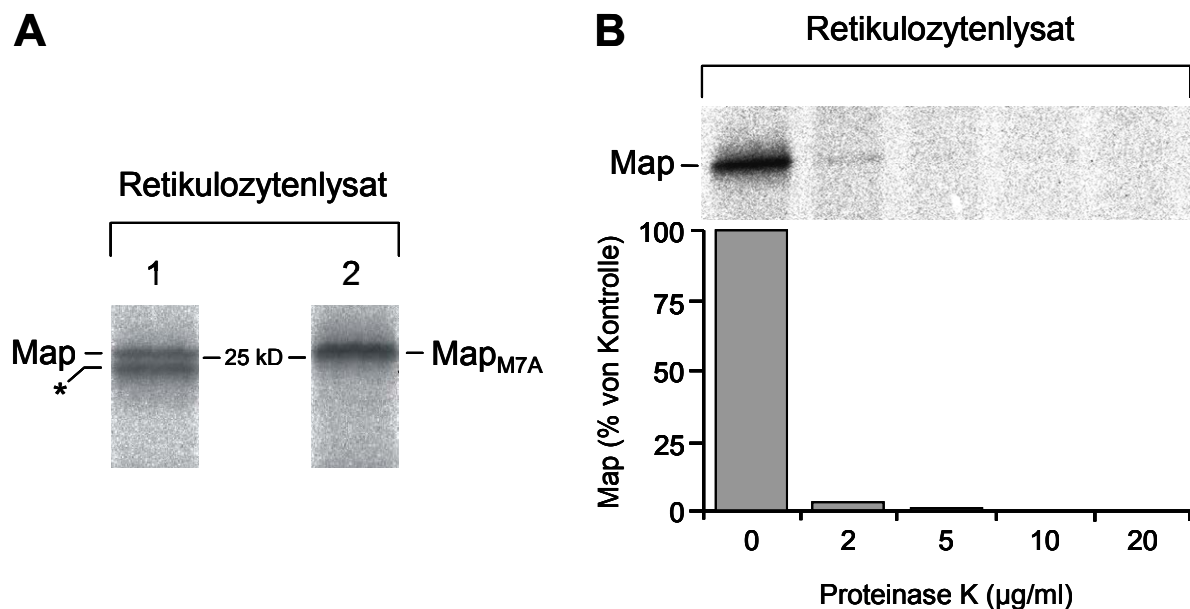


Abb. 3.1.1.1.: *In vitro* Synthese und Proteinase K – Abbau von ^{35}S -markiertem Map-Protein. (A) 1 µg Plasmid-DNA pGEM4/Map (Spur 1) bzw. pGEM4/Map_{M7A} (Spur 2) wurde zur Herstellung von ^{35}S -markiertem Map- bzw. Map_{M7A}-Protein in Retikulozytenlysat eingesetzt. (B) Jeweils 1 µl Map-Lysat wurde mit Proteinase K in ansteigenden Konzentrationen auf Eis inkubiert und nach 10 min die Proteinase K mit 2 mM PMSF inaktiviert. Die Menge an nicht proteolytisch abgebautem Map-Protein wurde in Relation zur eingesetzten Ausgangsmenge (0 µg/ml Proteinase K, 100%) gesetzt und das Ergebnis der unterschiedlichen Ansätze in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Auswertung von (A) und (B) erfolgte mittels SDS-PAGE und Autoradiographie.

Das Map-Toxin konnte erfolgreich in Retikulozytenlysat hergestellt werden. Auf dem SDS-Gel migriert das Map-Protein auf einer Höhe, die einem ungefähren Molekulargewicht von 25 kD entspricht und in Einklang mit der vorausgesagten Größe von 22,6 kD ist (Abb. 3.1.1.1., A, Spur 1). Unterhalb der Map-Bande erscheint eine weitere Proteinbande, die durch eine am zweiten, internen ATG-Codon der Map-Sequenz begonnene Translation entstanden ist (siehe Abb. 3.1.1.1., A, Spur 1, Stern). Das zweite, interne ATG-Codon der Map-DNA-Sequenz (kodiert für Methionin an Aminosäureposition 7) wurde durch zielgerichtete Mutagenese in ein GCT-Codon (Alanin) umgewandelt (Klonierungsstrategie siehe 2.2.1.13.). Das hieraus resultierte Plasmid pGEM4/Map_{M7A} wurde zur ebenfalls zur *in vitro* Synthese von radioaktiv markiertem Map_{M7A}-Protein verwendet (siehe Abb. 3.1.1.1., A, Spur 2). Unter Anwendung dieser leicht modifizierten Map-Sequenz konnte die Entstehung einer weiteren Proteinbande bei der *in vitro* Synthese vermieden werden. Nachfolgende *in vitro* Importexperimente wurden einheitlich mit Map_{M7A}, fortlaufend im Text aus Gründen der Übersichtlichkeit mit Map bezeichnet, durchgeführt.

Durch die limitierte Proteolyse (siehe Abb. 3.1.1.1., B) konnte die Konzentration an Proteinase K bestimmt werden, welche innerhalb von 10 min und Inkubation auf Eis ausreicht, um die Menge an Map-Protein, welche in 1 µl Retikulozytenlysat enthalten ist, vollständig abzubauen. Sie beträgt 10 µg/ml. Bemerkenswerterweise reicht schon ein Fünftel dieser Konzentration aus, um 98% des Map-Proteins unter den gleichen experimentellen Bedingungen abzubauen. Offensichtlich ist das Map-Protein sehr empfindlich gegenüber Protease-Abbau und nimmt eine für Proteasen leicht zugängliche Tertiärstruktur ein. Für die folgenden Importexperimente wurde in den Ansätzen stets eine Proteinase K – Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt.

Die Translokation des Map-Toxins in Mitochondrien sollte zunächst unter Verwendung von isolierten Mitochondrien aus einer menschlichen Zellkultur in einem *in vitro* Importexperiment nachgewiesen werden. Am Institut für Zoologie der Universität Hohenheim wurde freundlicherweise die Kultivierung und Anzüchtung von humanen Jurkat-Zellen (zur Verfügung gestellt von AG Prof. Pfitzenmeier, Inst. f. Immunologie, Uni Stuttgart) gestattet und durchgeführt. Mitochondrien hieraus wurden mit freundlicher Unterstützung von Dipl.-Biol. Elke Dian (Inst. f. Mikrobiologie, Universität Hohenheim) isoliert. Aufgrund der sehr geringen Ausbeute an Mitochondrien, welche bei einer Isolierung aus humanen Zellkulturen typisch ist,

konnte zunächst nur ein einfaches Importexperiment durchgeführt werden. In zwei separaten Ansätzen wurde ein identischer *in vitro* Import durch Inkubation von ^{35}S -markiertem Map mit isolierten Jurkat-Mitochondrien unter geeigneten Pufferbedingungen durchgeführt. In einem der beiden Ansätze wurde anschließend Proteinase K zugegeben, um den nicht in Mitochondrien importierten Map-Anteil abzubauen. Mittels SDS-PAGE und Autoradiographie wurde das Experiment ausgewertet.

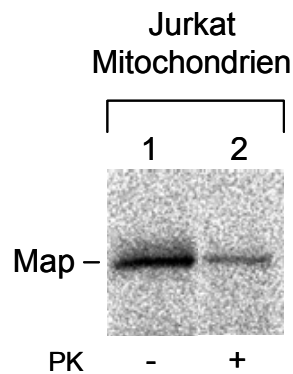


Abb. 3.1.1.3.: Import von Map in isolierte Mitochondrien aus humanen Jurkat-Zellen. In zwei identische Importansätze wurde jeweils 1 μl Map-Lysat mit 40 μg isolierte Jurkat-Mitochondrien für 10 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde ein Ansatz (Spur 2) für 10 min auf Eis mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (PK) behandelt. Zur Inaktivierung der Proteinase K wurde PMSF zugegeben, und die Mitochondrien wurden reisoliert und in SDS-Probenpuffer resuspendiert. Importiertes Map-Protein konnte durch SDS-PAGE und Autoradiographie nachgewiesen werden.

Das ^{35}S -markierte Map-Protein war innerhalb der Inkubationszeit in der Lage, mit den isolierten Jurkat-Mitochondrien zu assoziieren und wurde gemeinsam mit den Organellen abzentrifugiert (siehe Abb. 3.1.1.3, Spur 1). Etwa 27% des mit Jurkat-Mitochondrien assoziierten Map-Anteils wurde in die Mitochondrien importiert und konnte durch Proteinase K nicht abgebaut werden (siehe Abb. 3.1.1.3, Spur 2). Damit konnte unter Verwendung von isolierten Jurkat-Mitochondrien bestätigt werden, dass das Map-Toxin ein Protein darstellt, welches zur Translokation in Mitochondrien befähigt ist. Es muss erwähnt werden, dass keine Prozessierung des Map-Toxins in Mitochondrien aus humanen Jurkat-Zellen beobachtet werden konnte. Offensichtlich besitzt das Map-Toxin mitochondriale Zielerkennungsmotive, welche von den Rezeptoren der Translokase der mitochondrialen Außenmembran erkannt werden und den Durchtritt des Proteins über die generelle Importpore des TOM-Komplexes ermöglichen.

3.1.2. Das Map-Toxin verwendet den TOM-Komplex für den Eintritt in Mitochondrien

Kerncodierte, mitochondriale Proteine werden im Cytosol hergestellt und posttranslational in Mitochondrien importiert. Rezeptoren des TOM-Komplexes der mitochondrialen Außenmembran erkennen spezifische mitochondriale Zielerkennungsmotive und erlauben den Eintritt über die generelle Importpore. Es sollte nun festgestellt werden, ob an der Translokation des Map-Toxins in Mitochondrien, Komponenten des TOM-Komplexes beteiligt sind.

Zunächst sollte überprüft werden, ob für die Translokation von Map in Mitochondrien die Erkennung durch Rezeptoren der mitochondrialen Außenmembran notwendig ist. Das Experiment sollte unter Verwendung von isolierten Mitochondrien aus Rattenleber durchgeführt werden. Die gewöhnlich höhere Ausbeute an Mitochondrien erlaubt die Durchführung von mehreren Experimenten mit einer größeren Anzahl von unterschiedlichen Ansätzen. Die Mitochondrien wurden vor der Zugabe des ³⁵S-markierten Map-Proteins mit Trypsin vorbehandelt oder blieben im Kontrollansatz unbehandelt. Durch die Trypsin-Einwirkung sollten Zielerkennungsdomänen von TOM-Rezeptoren vor der Durchführung des *in vitro* Importexperiments abgebaut werden. Eine stark herabgesetzte Importeffizienz eines importierten Vorläuferproteins in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien deutet stark auf eine Beteiligung von Rezeptoren des TOM-Komplexes während dessen Translokation in Mitochondrien hin. ³⁵S-markiertes Map-Protein wurde zu Importansätzen zugegeben, welche Trypsin-vorbehandelte oder unbehandelte Rattenlebermitochondrien enthielten. Die Inkubationszeit des Map-Toxins mit den Mitochondrien wurde nach 3, 6 und 12 min durch Überführung der Ansätze auf Eis gestoppt und durch 10-minütige Inkubation mit 20 µg/ml Proteinase K nicht-importierte Proteine abgebaut. Nach Durchführung einer SDS-PAGE wurde das Gel autoradiographisch am Phosphorimager ausgewertet.

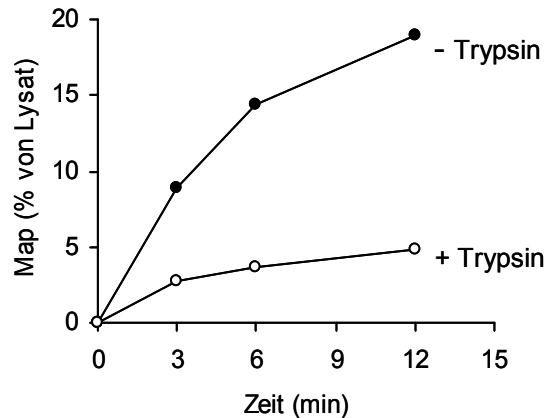


Abb. 3.1.2.1.: Import von Map in Trypsin-vorbehandelte bzw. unbehandelte Rattenleber-Mitochondrien. Frisch isolierte Rattenlebermitochondrien (15 mg/ml) wurden in SEM-Puffer resuspendiert und auf zwei Ansätze (+Trypsin, -Trypsin) aufgeteilt. Einem Ansatz wurde Trypsin zugegeben, während der zweite Ansatz unbehandelt blieb. Durch Zugabe von Trypsin-Inhibitor in beide Ansätze wurde das Trypsin inaktiviert. Die Mitochondrien wurden reisoliert, in Importpuffer aufgenommen, auf mehrere Ansätze aufgeteilt und der Import durch Zugabe von Map-Lysat begonnen. Zu entsprechenden Zeiten wurde die Importreaktion durch Überführung der Ansätze auf Eis gestoppt. Nicht-importierte Proteine wurden durch Inkubation mit Proteinase K abgebaut. Der importierte Map-Anteil wurde durch SDS-PAGE und Autoradiographie bestimmt und die Kinetik der Importeffizienz, ausgehend vom eingesetzten Lysat (100%), in einem Kurvendiagramm dargestellt.

Die Importkinetik von ^{35}S -markiertem Map in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien (siehe Abb. 3.1.2.1., +Trypsin) weist im Vergleich zur Importkinetik in unbehandelte Mitochondrien (siehe Abb. 3.1.2.1., -Trypsin) eine erheblich verminderte Importeffizienz auf. Dies deutet darauf hin, dass an der Außenmembran der Mitochondrien sich befindende Rezeptoren des TOM-Komplexes an der Erkennung und Translokation des Map-Toxins in Mitochondrien beteiligt sind.

Um direkt zeigen zu können, dass das Map-Toxin den TOM-Komplex zum Eintritt in Mitochondrien verwendet, werden Mitochondrien benötigt, bei denen der TOM-Komplex Defekte oder Deletionen einzelner Komponenten aufweist. Solche Mitochondrien lassen sich aus der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* isolieren, da für diesen Modellorganismus sämtliche Mutanten für Komponenten der mitochondrialen Translokationsmaschinerien vorhanden und charakterisiert worden sind. Die Mechanismen des mitochondrialen Proteinimports sind innerhalb von eukaryontischen Organismen stark konserviert. Es ist somit möglich, auch mitochondriale Proteine anderen Ursprungs in isolierte Hefemitochondrien zu importieren.

Zunächst sollte die Importeffizienz des Map-Toxins bei Inkubation mit isolierten Mitochondrien aus Wildtyphefzellen bzw. mit Mitochondrien aus Hefemutanten mit Defekten der generellen Importpore (Tom40) bestimmt werden. Hierfür wurde ^{35}S -markiertes Map-Protein für 1, 2 und 5 min mit isolierten Mitochondrien aus dem Wildtypstamm KKY3.7 (Tom40) und der Mutante KKY3.4 (*tom40-4*) bei 25°C inkubiert und anschließend durch Überführung der Ansätze auf Eis der Import gestoppt. Es folgte eine 10-minütige Inkubation der Ansätze mit Proteinase K auf Eis, um den nicht-importierten Proteinanteil abzubauen. Die mitochondrialen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das radioaktiv markierte Map-Protein mittels Phosphorimager und AIDA Software detektiert und quantifiziert. Die Importkinetik des Map-Proteins in Mitochondrien aus Wildtyp versus Mutante wurde graphisch als Kurvendiagramm dargestellt. Zuvor wurde ^{35}S -markiertes Hefeporin für 5 min bei 25°C mit Mitochondrien aus dem Wildtyp bzw. der *tom40-4* Mutante inkubiert, um den Phänotyp der Mitochondrienpräparation zu kontrollieren.

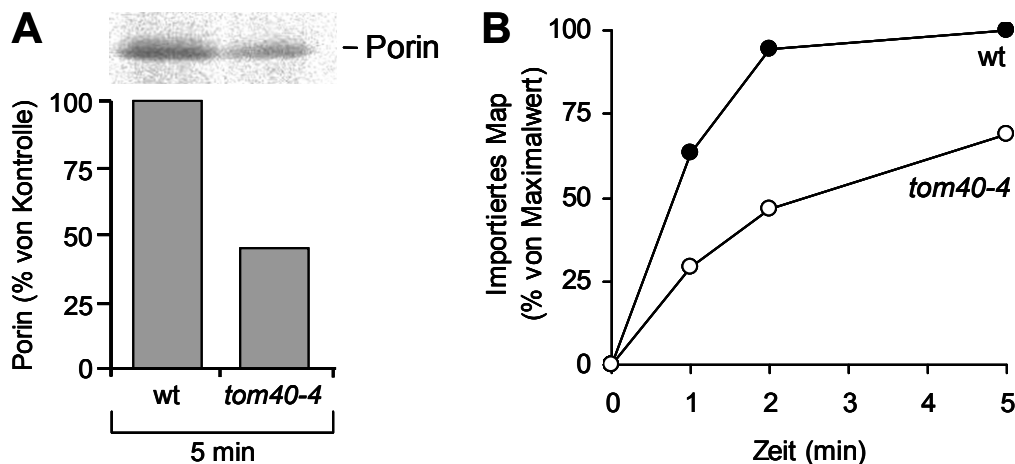


Abb. 3.1.2.2.: Import von Hefeporin und Map in isolierte Mitochondrien aus dem Wildtyp-Hefestamm (KKY3.7) und der *tom40-4* Mutante (KKY3.4). ^{35}S -markiertes Hefeporin (A) bzw. Map-Protein (B) wurde für 5 min bzw. 1, 2 und 5 min mit isolierten Mitochondrien aus Wildtyp bzw. Mutante unter Standardbedingungen inkubiert. Nicht-importierte Proteine wurden durch Inkubation mit Proteinase K abgebaut. Mittels SDS-PAGE und Autoradiographie wurde der importierte Proteinanteil detektiert und quantifiziert. Die Importeffizienz von Hefeporin in Mitochondrien der *tom40-4* Mutante wurde in Relation zur Importeffizienz in Mitochondrien des Wildtyps gesetzt und als Balkendiagramm dargestellt (A). Die Kinetik der Importeffizienz von Map wurde in Relation zum höchsten Importwert (wt, 12 min) gesetzt und als Kurvendiagramm dargestellt (B).

Die Importeffizienz von TOM-abhängigen Proteinen in Mitochondrien der *tom40-4* Mutante ist nur mäßig herabgesetzt (Krimmer, 2001). Das Hefeporin ist im Vergleich zu Wildtyp-Mitochondrien, in Mitochondrien der *tom40-4* Mutante noch etwa halb so gut importiert worden und bestätigt den erwarteten Phänotyp (siehe Abb. 3.1.2.2., A). Das Map-Toxin weist innerhalb des untersuchten Zeitraumes, im Vergleich zur Effizienz des Importes in die entsprechenden wildtypischen Mitochondrien, ebenfalls eine mäßig, aber deutlich herabgesetzte Importeffizienz in Mitochondrien mit Defekten in der generellen Importpore (Tom40) auf (siehe Abb. 3.1.2.2., B). Map verhält sich demnach wie das endogene, mitochondriale Hefeporin, welches über die generelle Importpore des TOM-Komplexes in Mitochondrien importiert wird.

Die herabgesetzte Importeffizienz des Map-Toxins in Trypsin-vorbehandelte Rattenlebermitochondrien, sowie in Mitochondrien aus einer Hefemutante mit Defekten in der generellen Importpore des TOM-Komplexes deutet darauf hin, dass das Map-Toxin unter Beteiligung der mitochondrialen Translokationsmaschinerie der Außenmembran in Mitochondrien importiert wird. In einem weiteren, unabhängigen Experiment sollte dieses Ergebnis bestätigt werden. Der Importrezeptor Tom22 stabilisiert den TOM-Komplex und folglich weisen Mitochondrien einer Tom22-defizienten Hefemutante einen unvollständig assemblierten TOM-Komplex auf. Der Proteinimport in diesen Mitochondrien ist dramatisch gestört (van Wilpe, 1999). Die $\Delta tom22$ Mutante ist dennoch überlebensfähig, da mitochondriale Proteine in geringem Maße auch direkt über die generelle Importpore in Mitochondrien gelangen können (*bypass import*). Um die Beteiligung des TOM-Komplexes am Import von Map in Mitochondrien zu bestätigen, sollte die Importeffizienz von Map in isolierte Mitochondrien der $\Delta tom22$ Mutante mit der Effizienz in Mitochondrien des entsprechenden Wildtyps verglichen werden. ^{35}S -markiertes Map-Protein wurde für 3, 6 und 12 min in Mitochondrien aus der $\Delta tom22$ Deletionsmutante (OL201) bzw. aus dem entsprechendem Wildtypstamm (OL223) bei 25°C importiert. Nicht-importierte Proteine wurden mit Proteinase K abgebaut. Der importierte Map-Anteil wurde nach SDS-PAGE und Autoradiographie quantifiziert und die Importkinetik in Wildtyp versus Mutante als Kurvendiagramm dargestellt. Zuvor wurde unter Anleitung von Herrn Dr. Christian Motz (Inst. f. Mikrobiologie, Universität Hohenheim) der dissoziierte Zustand des TOM-Komplexes in Mitochondrien der $\Delta tom22$ Deletionsmutante durch blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE) verifiziert.

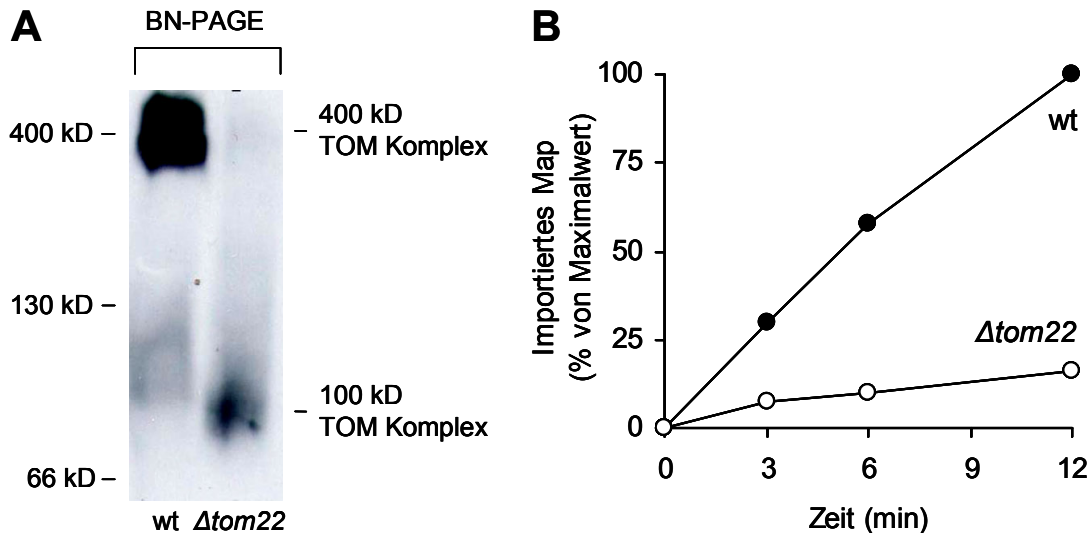


Abb. 3.1.2.4.: Import von Map in isolierte Mitochondrien des Wildtyps (OL223) und der $\Delta tom22$ Deletionsmutante (OL201). (A) Native Auftrennung des TOM-Komplexes aus isolierten Mitochondrien des Wildtyps (OL223) und der $\Delta tom22$ Deletionsmutante (OL201). Mitochondriale Proteinkomplexe wurden elektrophoretisch auf einem 4-16%igem blauen Nativgel aufgetrennt und anschließend das Tom40-Protein mit einem primären, polyklonalen Antikörper detektiert. (B) ^{35}S -markiertes Map-Protein wurde für 3, 6 und 12 min in isolierte Mitochondrien der Mutante und des entsprechenden Wildtyps importiert und nicht-importierte Proteine nach der Importreaktion mittels Proteinase K abgebaut. PK-geschütztes Map-Protein wurde quantifiziert und die Kinetik der Importeffizienz in Wildtyp versus Mutante als Kurvendiagramm dargestellt. Die Werte wurden in Relation zur höchsten Importeffizienz (wt, 12min) gesetzt.

Der dissoziierte TOM-Komplex konnte in Mitochondrien der verwendeten Präparation erfolgreich nachgewiesen werden. Während in Mitochondrien des Wildtyps der TOM-Komplex eine Gesamtgröße von 400 kD aufweist, migriert der TOM-Komplex aus Mitochondrien der $\Delta tom22$ Deletionsmutante im blauen Nativgel bei etwa 100 kD (siehe Abb. 3.1.2.3., A). Damit ist sichergestellt, dass die für das Importexperiment verwendete Mitochondrienpräparationen aus Wildtyp und Mutante tatsächlich einen unterschiedlich assemblierten TOM-Komplex aufweisen. Im Vergleich zur Importeffizienz in Wildtyp-Mitochondrien, ist der Import des Map-Toxins in Mitochondrien der $\Delta tom22$ Mutante sehr stark herabgesetzt. Offensichtlich ist für den Import des Map-Proteins in Mitochondrien ein vollständig assemblierter TOM-Komplex notwendig. Ein effizienter Import des Map-Toxins auf direktem Wege über die generelle Importpore ist äußerst ineffektiv (siehe Abb. 3.1.2.3., B).

Das Map-Toxin der enteropathogenen *E. coli* ist in der Lage, in Mitochondrien zu translozieren und verwendet hierbei die Translokationsmaschinerie der mitochondrialen Außenmembran (TOM-Komplex). Für die mitochondriale

Die Darstellung des N-Terminus in einem *Helical Wheel* visualisiert die räumliche Orientierung der Aminosäuren innerhalb der Alpha-Helix und lässt erkennen, dass drei der vier positiven Ladungen innerhalb des Aminosäureabschnittes 10 – 39, auf der gleichen Seite anzutreffen sind (siehe Abb. 3.1.3.1., A). Der N-Terminus des Map-Proteins weist somit Eigenschaften mitochondrialer Zielerkennungssequenzen von Matrix-Proteinen auf. Der Vergleich der N-terminalen Aminosäuresequenz des Map-Toxins aus drei nahe verwandten EPEC-Stämmen (Mensch, Maus, Kaninchen) offenbart nur wenige nicht-konservierte Aminosäuren. Die positiven Ladungen in den Positionen 10, 21, 26 und 39 sind konserviert und Aminosäuresubstitutionen in den Aminosäuren 26 und 39 beschränken sich wiederum auf positiv geladene Aminosäuren (siehe Abb. 3.1.3.1., B). Dieser Befund deutet darauf hin, dass die basischen Aminosäuren von Bedeutung für die mitochondriale Zielerkennung sein könnten und aus diesem Grund in der Evolution nicht durch neutrale oder saure Aminosäuren substituiert werden konnten.

Die *in silico* Analyse des Aminoterminus von Map weist auf Gemeinsamkeiten mit mitochondrialen Präsequenzen von Proteinen hin, welche in die Matrix der Mitochondrien importiert werden. Es ist daher anzunehmen, dass das intramitochondriale Kompartiment, welches vom Map-Toxin angesteuert wird, ebenfalls die mitochondriale Matrix ist. Im nächsten Abschnitt soll die intramitochondriale Lokalisation des Map-Proteins untersucht werden.

3.1.4. Das Map-Toxin wird über den TIM23-Komplex in die Matrix der Mitochondrien importiert

Aufgrund der auffälligen Ähnlichkeit des N-Terminus von Map mit mitochondrialen Präsequenzen von Matrix-Proteinen ist anzunehmen, dass das Map-Toxin ebenfalls in die mitochondriale Matrix importiert wird. Für den Import in die Matrix ist neben der Überquerung der mitochondrialen Außenmembran auch die Translokation über die innere, mitochondriale Membran notwendig. Ein auf Matrix-Proteine spezialisierter Translokationskomplex der Innenmembran ist der TIM23-Komplex, welcher als Eintrittspforte für sämtliche Matrix-Proteine dient (Pfanner, 1994).

Matrix-Proteine können in einem *in vitro* durchgeführten Importexperiment nicht mit Proteinase K abgebaut werden. Dies gilt auch nach Destabilisierung der

mitochondrialen Außenmembran durch osmotischen Schock (Schwellen). Im folgenden Experiment wurde in drei Parallelansätzen ³⁵S-markiertes Map-Protein in isolierte Rattenlebermitochondrien importiert. Um die intramitochondriale Lokalisation des Map-Toxins zu überprüfen, wurden die Mitochondrien aus zwei Ansätzen nach der Importreaktion in hypotonischem Puffer inkubiert und dadurch geschwollen. Einer der beiden Ansätze wurde vor der Importreaktion mit Valinomycin behandelt, um das mitochondriale Membranpotential zu zerstören. Mitochondrien des Kontrollansatzes wurden nicht mit Valinomycin vorbehandelt oder geschwollen. Nach der Importreaktion wurden alle Ansätze mit Proteinase K behandelt, um nicht-importierte und nach dem Schwellen zugängliche Proteine abzubauen. Der vor der Protease geschützte Anteil des Map-Proteins innerhalb der unterschiedlichen Ansätze wurde durch SDS-PAGE und Autoradiographie bestimmt und quantitativ in einem Balkendiagramm in Relation zum importierten Map-Anteil dargestellt.

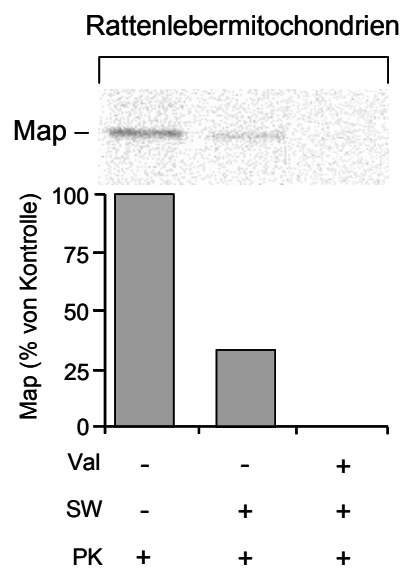


Abb. 3.1.4.1.: Rolle des mitochondrialen Membranpotentials beim Import von Map in isolierte Rattenlebermitochondrien und Überprüfung der intramitochondrialen Lokalisation des Map-Proteins durch Schwellen der Mitochondrien. ³⁵S-markiertes Map-Protein wurde mit isolierten Rattenlebermitochondrien inkubiert und zuvor eventuell das Membranpotential mit Valinomycin zerstört (+Val) oder anschließend durch Aufnahme der Mitochondrien in hypotonischem EM-Puffer das Schwellen der Mitochondrien eingeleitet (+SW). Proteinase K diente zum Abbau zugänglicher Proteine (PK). Der PK-geschützte Map-Anteil wurde mit SDS-PAGE und Autoradiographie bestimmt und der in Mitoplasten und in Abwesenheit des Membranpotentials importierte Map-Anteil in Relation zum Gesamtimport von Map (- Val/-SW/+PK) in einem Balkendiagramm dargestellt.

Etwa 30% des in Mitochondrien importierten Map-Proteins (siehe Abb. 3.1.4.1., -Val/-SW/+PK) ist nach Schwellen der Mitochondrien noch vor der Proteinase K geschützt und somit in die Matrix importiert worden (siehe Abb. 3.1.4.2., -Val/+SW/+PK). In Mitochondrien, in denen zuvor das Membranpotential durch Valinomycin-Zugabe zerstört worden ist, konnte nach Schwellen kein Map-Protein mehr nachgewiesen werden (siehe Abb. 3.1.4.2., +Val/+SW/+PK). Das Map-Toxin ist demnach ein Protein, welches in der Lage ist, in die mitochondriale Matrix zu gelangen. Dieser Vorgang ist abhängig vom mitochondrialen Membranpotential ($\Delta\Psi$). Auch unter Verwendung von Rattenlebermitochondrien konnte keine Prozessierung des Map-Toxins beobachtet werden.

Das in Abb. 3.1.4.1. gezeigte Ergebnis konnte von Frau Grazyna Domanska (Inst. f. Mikrobiologie, Uni Hohenheim) in einem identisch durchgeführten Experiment mit isolierten Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* bestätigt werden. Weiterhin konnte sie mit weiteren Methoden (selektive Permeabilisierung der Außenmembran mit Digitonin nach Import von radioaktiv markiertem Map-Protein in isolierte Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*; Mitochondrienfraktionierung nach *in vivo* Expression von Map in *Saccharomyces cerevisiae*) ebenfalls belegen, dass das Map-Toxin in der mitochondrialen Matrix lokalisiert ist.

Endogene, mitochondriale Proteine, welche für die Matrix der Mitochondrien bestimmt sind, nutzen für die Translokation über die mitochondriale Innenmembran den TIM23-Komplex. Im nächsten Experiment sollte untersucht werden, ob das Map-Toxin ebenfalls den TIM23-Komplex zur Überquerung der Innenmembran verwendet oder eine andere Strategie zu diesem Zweck entwickelt worden ist. Vorläuferproteine, welche über die Pore des TIM23-Komplexes in die mitochondriale Matrix transloziert werden, müssen während des Translokationsprozesses vom Matrixprotein mtHsp70 unter Verbrauch von ATP aus der Tim23-Pore gezogen werden. Ein nicht funktionelles mtHsp70 Protein führt demnach zum Arrest von Vorläuferproteinen im TOM-TIM23-Superkomplex. Dieser Zustand hat fatale Folgen für die Zelle, aus diesem Grund handelt es sich bei mtHsp70 um ein essentielles Protein. Um zeigen zu können, dass das Map-Toxin ebenfalls über den TIM23-Komplex in die Matrix importiert wird, sollte die Abhängigkeit der Translokation von funktionellem mtHsp70 nachgewiesen werden. Zu diesem Zweck wurde radioaktiv

markiertes Map-Protein für 2, 5 und 10 min mit Mitochondrien aus einer temperatursensitiven mtHsp70 Hefemutante (PK83; *ssc1-3*) und dem entsprechenden Wildtyp (PK82) inkubiert. Die Ansätze wurden vor der Importreaktion bei nicht-permissiver Temperatur (37°C) inkubiert, um eine destabilisierende Konformationsänderung des mutierten mtHsp70-Proteins und somit den Phänotyp der Hefemutante zu induzieren. Die Importreaktionen wurden durch Inkubation der Ansätze auf Eis und Zugabe von Proteinase K zum Abbau nicht-importierter Proteine beendet. Mittels SDS-PAGE und Autoradiographie wurde die Kinetik der Importeffizienz des Map-Toxins in Wildtyp versus Mutante ermittelt und als Kurvendiagramm dargestellt. Der Phänotyp der mtHsp70 Mutante wurde zuvor durch einen 10-minütigen Import von Su9-DHFR in Mitochondrien des Wildtyps und der Mutante überprüft. Bei Su9-DHFR handelt es sich um ein Fusionsprotein bestehend aus der mitochondrialen Zielerkennungssequenz der Untereinheit 9 der ATP-Synthase und muriner Dihydrofolatreduktase (DHFR), das über den TOM- und TIM23-Komplex in die mitochondriale Matrix importiert wird. Die Vorstufe wird äußerst effizient unter *in vitro* Bedingungen in Mitochondrien importiert, dabei entsteht durch spezifische Proteasen im Intermembranraum der Mitochondrien ein N-terminal verkürztes Intermediat und schließlich durch Abspaltung der Präsequenz in der Matrix, das reife Protein.

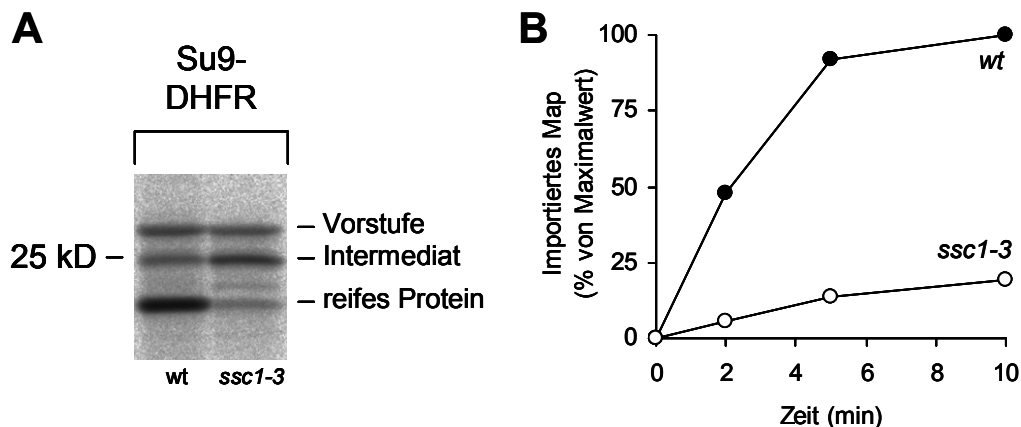


Abb. 3.1.4.2.: Import von Su9-DHFR und Map in isolierte Mitochondrien des Wildtyp-Hefestammes PK82 bzw. der temperatursensitiven Mutante *ssc1-3* (PK83). ³⁵S-markiertes Su9-DHFR (A) bzw. Map-Protein (B) wurde für 10 min bzw. 2, 5 und 10 min mit isolierten Mitochondrien des Wildtyp-Hefestammes PK82 bzw. der *ssc1-3* Mutante (PK83) inkubiert. Zuvor wurde der Phänotyp der temperatursensitiven Mutante durch Inkubation der Mitochondrien bei 37°C induziert. Nicht-importierte Proteine wurden mit Proteinase K abgebaut. Die Kinetik der Importeffizienz des Map-Toxins in Wildtyp versus Mutante wurde in einem Kurvendiagramm in Relation zum höchsten Importwert dargestellt (B).

Der größte Teil des radioaktiv markierten Su9-DHFR Proteins akkumuliert innerhalb des untersuchten Zeitraums in Mitochondrien der mtHsp70 Mutante als intermediäre Form im Intermembranraum (siehe Abb. 3.1.4.2., A, rechte Spur). In Wildtypmitochondrien wird stattdessen in der selben Zeit der größte Teil in die Matrix importiert und zum reifen Protein prozessiert (siehe Abb. 3.1.4.2., A, linke Spur). Die Mitochondrienpräparation der Mutante *ssc1-3* zeigt somit den zu erwartenden Defekt in der Translokation von Matrix-Proteinen über die mitochondriale Innenmembran. Die Importeffizienz des Map-Toxins in isolierte Mitochondrien der temperatursensitiven Mutante *ssc1-3* ist im Vergleich zur Importkinetik in Mitochondrien des korrespondierenden Wildtyps erheblich herabgesetzt (siehe Abb. 3.1.4.2., B). Für eine effiziente Translokation wird offensichtlich funktionsfähiges mtHsp70 benötigt. Die Abhängigkeit des Map-Imports vom mitochondrialen Chaperonprotein mtHsp70 weist auf eine Beteiligung des TIM23-Komplexes während der Translokation in die Matrix hin und bestätigt erneut, dass das Map-Toxin in die mitochondriale Matrix importiert wird.

Da experimentell bestätigt werden konnte, dass das Map-Toxin über den TIM23-Komplex in die Matrix von Mitochondrien importiert wird, ist anzunehmen, dass der für die Zielerkennung und intramitochondriale Lokalisation verantwortliche Teil des Map-Proteins tatsächlich der N-Terminus ist. Im nächsten Abschnitt sollte der Beleg hierfür erbracht werden und der Frage nachgegangen werden, ob zusätzliche Abschnitte innerhalb des Map-Proteins am Import des Map-Toxins in Mitochondrien beteiligt sind.

3.1.5. Der N-Terminus des Map-Toxins ist für die mitochondriale Zielerkennung notwendig und hinreichend

Um zu zeigen, dass der N-Terminus des Map-Toxins eine mitochondriale Zielerkennungssequenz darstellt, wurde ein Fusionsprotein bestehend aus dem Map-Aminoterminus und einem grün fluoreszierenden Protein (GFP) hergestellt (Klonierungsstrategie siehe 2.2.1.13.) und *in vivo* in *Saccharomyces cerevisiae* zur Expression gebracht. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie konnte dann die Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb der Zellen überprüft werden.

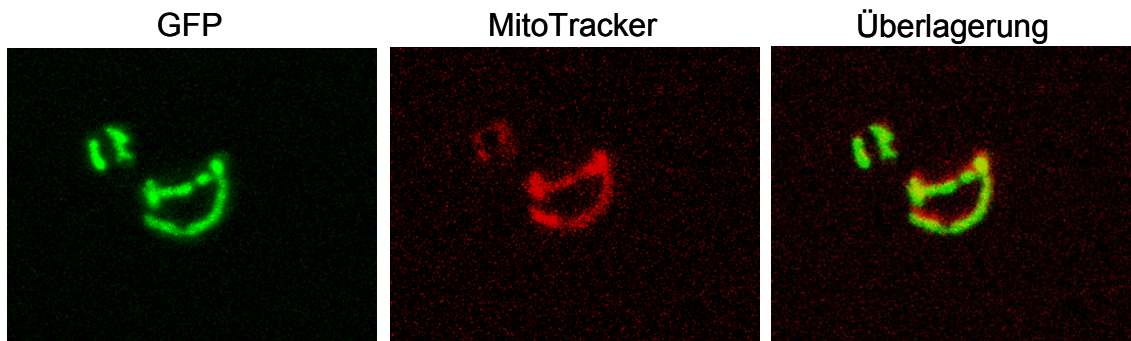


Abb. 3.1.5.1.: Expression von Map(1-44)-GFP in *Saccharomyces cerevisiae*. Kompetente Hefezellen des Wildtyp-Stammes BY4742 wurden mit pYES2/Map(1-44)-GFP transformiert und ü.N. bei 30°C in Raffinose-haltigem, synthetischem Minimalmedium ohne Uracil (SM/-ura) angezüchtet. Durch Überführung der Zellen in Galactose-haltigem SM/-ura wurde die Expression des Fusionsproteins induziert. Nach 4-stündiger Induktion wurden die Mitochondrien durch Zugabe von 50 nm MitoTracker Orange und weitere Inkubation für 30 min gefärbt. Mittels konfokaler Laserscanmikroskopie wurden die Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb der Hefezellen überprüft.

Das Fusionsprotein bestehend aus den aminoterminalen 44 Aminosäuren des Map-Toxins und GFP lokalisiert eindeutig an Mitochondrien, welche als schläuchige Strukturen zu erkennen sind (siehe Abb. 3.1.5.1., links). Die grüne Fluoreszenz des Fusionsproteins korreliert mit dem Fluoreszenzsignal des in Mitochondrien akkumulierten Farbstoffes MitoTracker Orange (siehe Abb. 3.1.5.2., mitte und rechts). Damit konnte gezeigt werden, dass der Aminoterminus des Map-Toxins eine mitochondriale Zielerkennungssequenz darstellt und hinreichend für die Lokalisation an Mitochondrien ist.

Um nachzuweisen, dass der Aminoterminus von Map für die Lokalisation des Toxins an Mitochondrien nicht nur hinreichend, sondern auch notwendig ist, wurde ein Fusionsprotein bestehend aus N-terminal um 44 Aminosäuren verkürztem Map-Protein und GFP hergestellt (Klonierungsstrategie siehe 2.2.1.1.3.). Das Fusionsprotein wurde unter identischen Versuchsbedingungen in *Saccharomyces cerevisiae* zur Expression gebracht und anschließend durch konfokale Mikroskopie die intrazelluläre Lokalisation bestimmt.

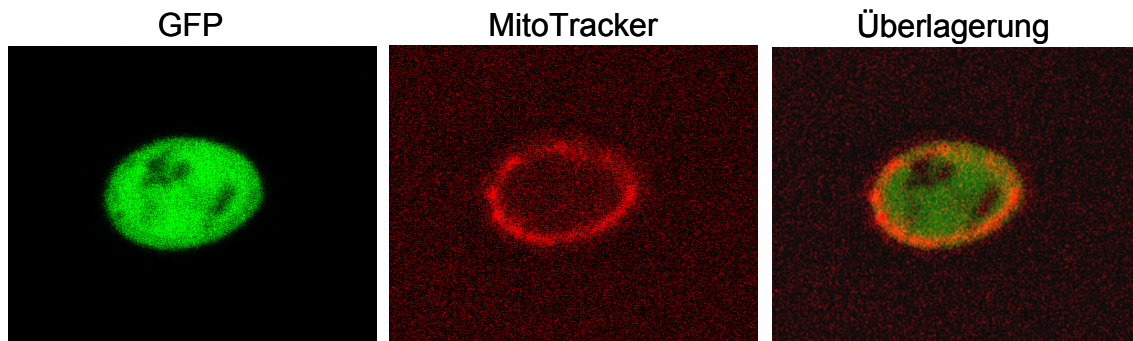


Abb. 3.1.5.2.: Expression von Map(45-203)-GFP in *Saccharomyces cerevisiae*. Kompetente Hefezellen des Wildtypstammes BY4742 wurden mit dem Plasmid pYES2/Map(45-203)-GFP transformiert und das Fusionsprotein durch Zugabe von Galactose zur Expression gebracht. Nach 4-stündiger Induktion wurden die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins mit konfokaler Mikroskopie analysiert. MitoTracker Orange wurde zur Gegenfärbung der Mitochondrien verwendet.

Das aminoterminal um 44 Aminosäuren verkürzte Map Protein ist nicht mehr in der Lage an Mitochondrien zu lokalisieren und akkumuliert im Cytosol (siehe Abb. 3.1.5.2., links). Der Aminoterminus des Map-Toxins ist demnach nicht nur hinreichend, sondern auch notwendig für die Lokalisation des Map-Toxins an Mitochondrien. Die Morphologie der Mitochondrien ist nach Akkumulation von Map im Cytosol ebenfalls tubulär, doch auffälligerweise an der Zellperipherie lokalisiert (siehe Abb. 3.1.5.2., mitte). Vermutlich hat der Einfluss des Map-Toxins im Cytosol Veränderungen im Zellgeschehen zur Folge, die mit der intrazellulären Verteilung des mitochondrialen Netzwerks zusammenhängen.

In einem unabhängigen *in vitro* Importexperiment sollte die Notwendigkeit des N-Terminus von Map als Zielerkennungssequenz bestätigt werden. Es wurde in Retikulozytenlysat hergestelltes Map(1-203)-GFP bzw. Map(45-203)-GFP für 2, 5 und 10 min in isolierte Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae* (PK82) importiert und anschließend die Kinetik der Importeffizienz beider Fusionsproteine verglichen.

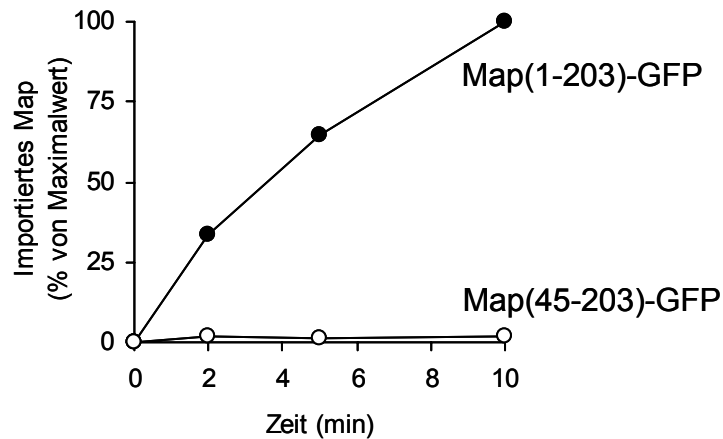


Abb. 3.1.5.3.: Import von Map(1-203)-GFP bzw. Map(45-203)-GFP in isolierte Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*. ³⁵S-markiertes Map(1-203)-GFP bzw. Map(45-203)-GFP wurde für 2, 5 und 10 min mit isolierten Mitochondrien aus dem Wildtyp-Hefestamm PK82 inkubiert und anschließend Proteinase K zum Abbau nicht-importierter Proteine zugegeben. Nach SDS-PAGE und Autoradiographie wurde der importierte Anteil der Fusionsproteine ermittelt, quantifiziert und als Kurvendiagramm die Kinetik der Importeffizienz in Relation zum höchsten Importwert dargestellt.

Auch unter *in vitro* Bedingungen konnte bestätigt werden, dass der Aminoterminus des Map-Toxins notwendig für die mitochondriale Zielerkennung ist. Die Importkinetik des Fusionsproteins Map(45-203)-GFP in isolierte Hefemitochondrien ist im Vergleich zur Importkinetik des Fusionsproteins Map(1-203)-GFP dramatisch herabgesetzt. Der N-Terminus des Map-Toxins verhält sich demnach nicht nur strukturell, sondern auch funktionell wie eine typische mitochondriale Präsequenz von endogenen, mitochondrialen Proteinen der Matrix. Der einzige Unterschied besteht darin, dass unter *in vitro* Bedingungen die mitochondriale Zielerkennungssequenz des Map-Toxins nach Vollendung des Translokationsprozesses nicht abgespalten wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass unter realen Bedingungen, das in Mitochondrien von Darmepithelzellen eingedrungene Map-Toxin doch prozessiert wird.

Enteropathogene *E. coli* besitzen demnach mit Map ein Toxin, welches durch die Verwendung von wirtsspezifischen, mitochondrialen Translokationsmechanismen in der Lage ist, in die Matrix der Mitochondrien importiert zu werden. Für die mitochondriale Zielerkennung hat offensichtlich eine konvergente Entwicklung des Map N-Terminus zu mitochondrialen Präsequenzen endogener Matrix-Proteine hin stattgefunden.

3.1.6. Die mitochondriale Lokalisation des Map-Toxins hat morphologische Veränderungen der Mitochondrien zur Folge

Im nächsten Abschnitt sollte untersucht werden, ob die mitochondriale Lokalisation des Map-Toxins morphologische Veränderungen der Mitochondrien mit sich führt. Zu diesem Zweck wurde ein Fusionsprotein bestehend aus Map und C-terminal fusioniertem GFP in *Saccharomyces cerevisiae* zur Expression gebracht und anschließend die Morphologie der Mitochondrien durch Färben der Mitochondrien mit MitoTracker fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

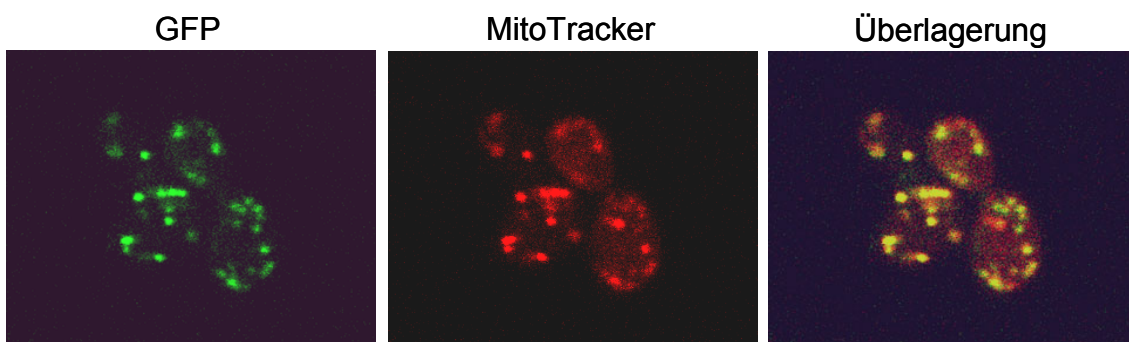


Abb. 3.1.6.1.: Expression von Map(1-203)-GFP in *Saccharomyces cerevisiae*. Kompetente Hefezellen des Wildtyp-Stammes BY4742 wurden mit pYES2/Map(1-203)-GFP (Klonierungsstrategie siehe 2.2.1.13.) transformiert und ü.N. bei 30°C in Raffinose-haltigem SM/-ura angezüchtet. Durch Überführung der Zellen in Galactose-haltigem SM/-ura wurde die Expression des Fusionsproteins induziert. Nach 4-stündiger Induktion wurden die Mitochondrien durch Zugabe von 50 nm MitoTracker Orange und weitere Inkubation für 30 min gefärbt. Mittels konfokaler Laserscanmikroskopie wurde die Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb der Hefezellen überprüft.

Das Fusionsprotein Map-GFP lokalisiert erwartungsgemäß an Mitochondrien. Im Gegensatz zur der schlauchförmigen Morphologie der Mitochondrien nach Expression von Map(1-44)-GFP (siehe Abb. 3.1.5.1., mitte), erscheinen die Mitochondrien bei Expression von Map(1-203)-GFP in fragmentiertem Zustand (siehe Abb. 3.1.6.1., mitte). Die beobachtete morphologische Veränderung muss mit der Lokalisation des Toxins an Mitochondrien zusammenhängen, da im Cytosol akkumuliertes Map(45-203)-GFP keine Fragmentierung der Mitochondrien zur Folge hat (siehe Abb. 3.1.5.2., mitte).

Jedoch kann die Fragmentierung der Mitochondrien auch unter ungünstigen Wachstumsbedingungen unabhängig von der Expression des Map(1-203)-GFP Fusionsproteins erfolgt sein. Um zu zeigen, dass die morphologische Veränderung

der Mitochondrien spezifisch vom Map-Toxin ausgelöst worden ist, wurde ein weiteres EPEC-Toxin, EspF, in *Saccharomyces cerevisiae* zur Expression gebracht, von dem ebenfalls bekannt ist, dass es in Mitochondrien importiert wird. EspF wurde mit GFP als Fusionsprotein unter den selben Bedingungen exprimiert und anschließend die Morphologie der Mitochondrien nach Färbung mit MitoTracker untersucht.

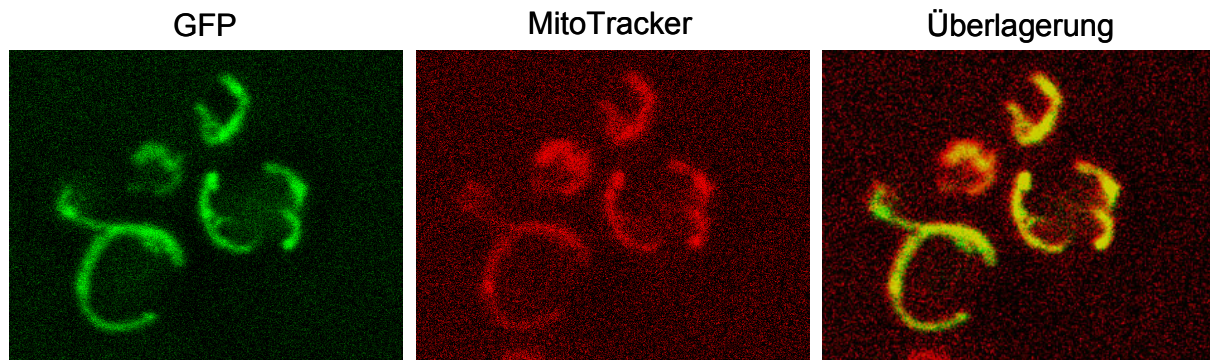


Abb. 3.1.6.2.: Expression von EspF-GFP in *Saccharomyces cerevisiae*. Kompetente Hefezellen des Wildtyp-Stammes BY4742 wurden mit pYES2/EspF-GFP (Klonierungsstrategie siehe 2.2.1.13.) transformiert und ü.N. bei 30°C in Raffinose-haltigem SM/-ura angezchtet. Die Genexpression wurde durch Überführung der Zellen in Galactose-haltigem SM/-ura induziert. Nach 4-stündiger Induktion wurden die Mitochondrien mit MitoTracker Orange gefärbt und die Lokalisation des Fusionsproteins mit konfokaler Laserscanmikroskopie untersucht.

Die Lokalisation des Fusionsproteins EspF-GFP an Mitochondrien hat im Vergleich zu Map(1-203)-GFP keine morphologischen Veränderungen des mitochondrialen Netzwerks zur Folge (siehe Abb. 3.1.6.2., links und mitte). Somit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass das Map-Toxin in der Lage ist, die Mitochondrien morphologisch zu verändern.

Vereinzelt wurden jedoch nach Expression von Map(1-203)-GFP auch Zellen beobachtet, welche nicht mehr mit dem MitoTracker-Farbstoff gefärbt werden konnten. Da der MitoTracker-Farbstoff nur in intakten Mitochondrien akkumulieren kann, welche ein Membranpotential aufweisen, besteht Grund zur Annahme, dass die Map-vermittelte Fragmentierung der Mitochondrien allmählich zu einem Verlust des Membranpotentials führt. Im nächsten Abschnitt sollte nun diese Frage beantwortet werden.

3.1.7. Die Map-vermittelte Fragmentierung der Mitochondrien führt zum Verlust des mitochondrialen Membranpotentials

Im letzten Abschnitt wurde darauf hingewiesen, dass nach 4-stündigen Expression des Fusionsproteins Map(1-203)-GFP eine Minderheit an Zellen beobachtet werden konnte, deren Mitochondrien kein Membranpotential mehr aufwiesen. Dieser Effekt ist vermutlich auf die von Map ausgelöste Spaltung des mitochondrialen Netzwerks zurückzuführen. Im nächsten Experiment sollte die Expression von Map(1-203)-GFP im *S. cerevisiae* Wildtypstamm BY4742 nach 16-stündiger Induktion untersucht werden, um zu überprüfen, ob die verlängerte Exposition der Hefezellen mit dem Map-Toxin einen deutlicheren Verlust des Membranpotentials ihrer Mitochondrien zur Folge hat.

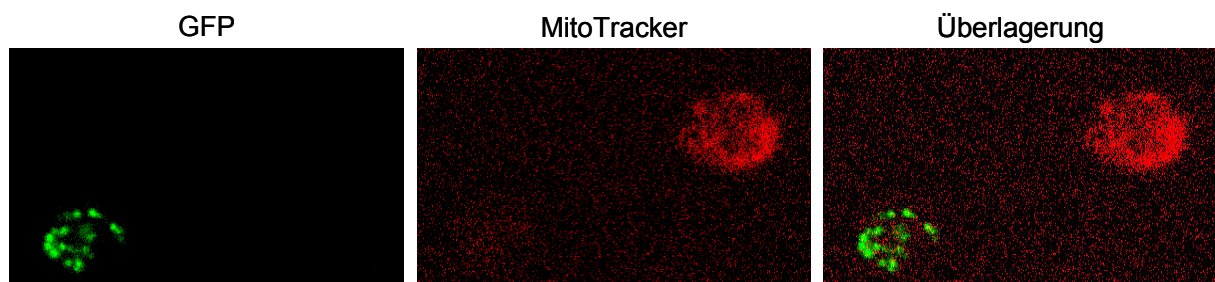


Abb. 3.1.7.1.: Verlängerte Expression von Map(1-203)-GFP in *Saccharomyces cerevisiae*. Nach 16-stündiger Induktion durch Galactose wurden die Zellen mit MitoTracker Orange behandelt, um die Mitochondrien zu färben.

Mitochondrien aus Map(1-203)-GFP exprimierenden Hefezellen können nach 16-stündiger Expression im Gegensatz zu nicht-exprimierenden Zellen nicht mehr mit dem Farbstoff MitoTracker Orange gefärbt werden und besitzen demnach kein Membranpotential mehr. Der Verlust des Membranpotentials beschränkt sich somit nur auf Zellen deren mitochondriales Netzwerk zuvor durch die Expression von Map fragmentiert worden ist. Es besteht dennoch die Gefahr, dass der Verlust des Membranpotentials ein indirekter Effekt aufgrund der Überexpression eines nicht-endogenen Proteins ist und nicht erst als Folge der Map-induzierten mitochondrialen Fragmentierung eintritt. Aus diesem Grund sollte das Fusionsprotein Map(1-44)-GFP ebenfalls unter den gleichen Versuchsbedingungen für 16 h in identische Hefezellen exprimiert werden, um anschließend den Effekt auf das Membranpotential der Mitochondrien zu beobachten.

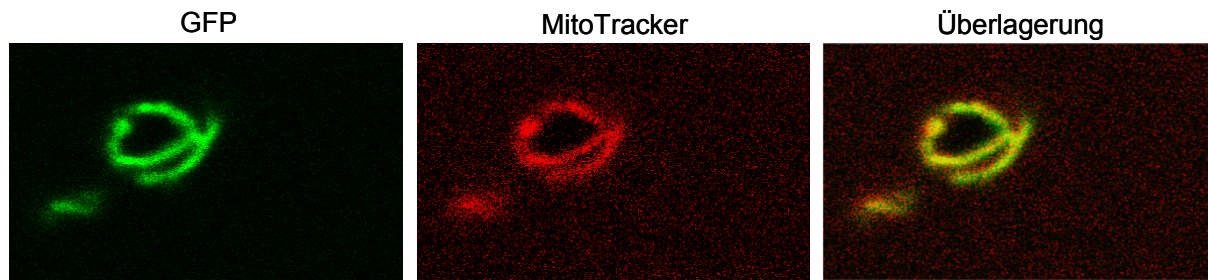


Abb. 3.1.7.2.: Verlängerte Expression von Map(1-44)-GFP in *Saccharomyces cerevisiae*. Nach 16-stündiger Induktion der Genexpression von Map(1-44)-GFP durch Galactose wurden die Mitochondrien mit MitoTracker Orange gefärbt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Die 16-stündige Expression des Fusionsproteins Map(1-44)-GFP führt nicht zum Verlust des Membranpotentials der Mitochondrien. Der MitoTracker-Farbstoff akkumuliert deutlich in Mitochondrien exprimierender Hefezellen (siehe Abb. 3.1.7.2., mitte). Somit ist gezeigt, dass die gewählten Expressionsbedingungen nicht verantwortlich für den Verlust des Membranpotentials sind, sondern dass dieser Effekt allein auf das Einwirken des Map-Toxins auf die Mitochondrien zurückzuführen ist. Im nächsten Abschnitt soll der für die Fragmentierung der Mitochondrien verantwortliche Proteinabschnitt des Map-Toxins ausfindig gemacht werden.

3.1.8. Der Aminosäureabschnitt 101-152 des Map-Toxins ist essentiell für die Fragmentierung der Mitochondrien

Durch das Entfernen beliebig langer Proteinabschnitte kann eine für die Funktion eines Proteins wichtige Domäne ausfindig gemacht werden. Diese Strategie sollte mit dem Map-Toxin angewendet werden, um die für die Fragmentierung der Mitochondrien verantwortliche Domäne zu identifizieren. Da der Aminoterminus des Map-Toxins für die mitochondriale Lokalisation notwendig ist, wurden lediglich carboxyterminal verkürzte Map Fusionsproteine mit GFP hergestellt, um die Lokalisation der Fusionsproteine an Mitochondrien sicherzustellen. An vorheriger Stelle wurde gezeigt, dass ein Fusionsprotein bestehend aus der mitochondrialen Präsequenz des Map-Toxins und GFP, an Mitochondrien lokalisiert und keine morphologischen Änderungen der Mitochondrien mit sich führt (siehe 3.1.5.). Nun sollte untersucht werden, ob und welche Proteinabschnitte des Carboxyterminus des Map-Toxins an der mitochondrialen Funktion des Map-Toxins beteiligt sind. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Konstrukte Map(1-100)-GFP und Map(1-152)-

GFP hergestellt, denen vom C-Terminus aus, 103 bzw. 51 Aminosäuren fehlen. Die Fusionsproteine wurden für 4 h in Wildtyphefezellen (BY4742) zur Expression gebracht und anschließend die Morphologie der Mitochondrien fluoreszenzmikroskopisch untersucht.

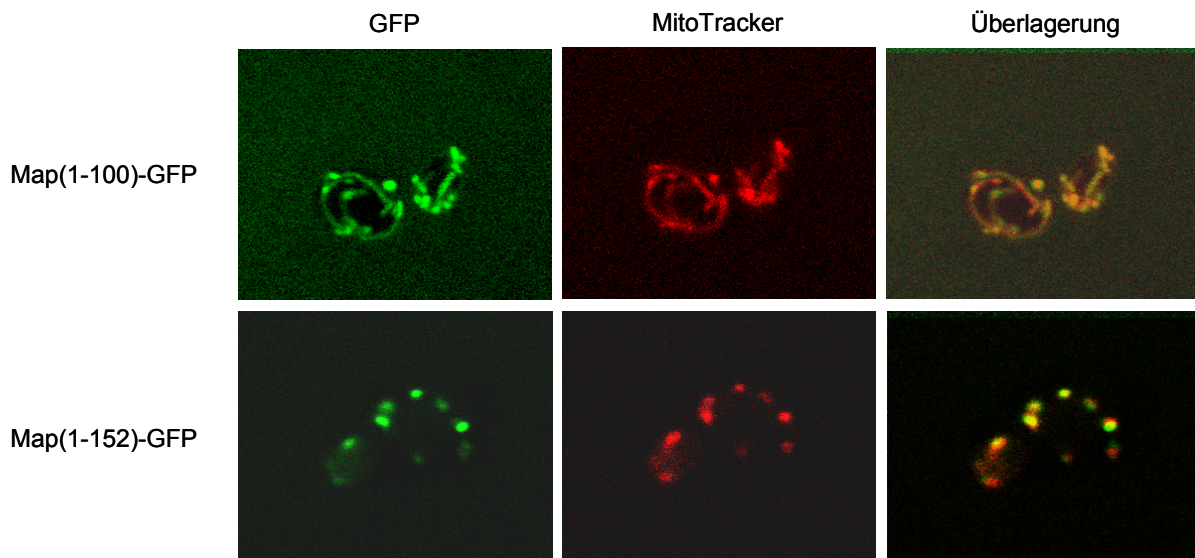


Abb. 3.1.8.1.: Expression von Map(1-100)-GFP und Map(1-152)-GFP in *Saccharomyces cerevisiae*. Wildtyphefezellen (BY4742) wurden mit pYES2/Map(1-100)-GFP bzw. pYES2/Map(1-152)-GFP (Klonierungsstrategien siehe 2.2.1.13.) transformiert und die Genexpression der Fusionsproteine mit Galactose für 4 h induziert. Anschließend wurden die Mitochondrien mit MitoTracker gefärbt und die Zellen fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

Die Deletion von 51 carboxyterminalen Aminosäuren hat keinerlei Auswirkungen auf die Fähigkeit des Map-Toxins zur Fragmentierung der Mitochondrien (siehe Abb. 3.1.8.1., Map(1-152)-GFP). Das Fusionsprotein Map(1-152)-GFP lokalisiert an Mitochondrien und führt ebenfalls zur Spaltung der Mitochondrien. Offensichtlich spielt der Map-Carboxyterminus in der mitochondrialen Funktion des Map-Toxins eine untergeordnete Rolle. Die Deletion von 103 C-terminalen Aminosäuren führt zu einem Fusionsprotein, welches erwartungsgemäß an Mitochondrien lokalisiert, jedoch keine Veränderungen der Mitochondrienmorphologie mit sich führt (siehe Abb. 3.1.8.1., Map(1-100)-GFP). Die Mitochondrien weisen nach Expression von Map(1-100)-GFP weiterhin eine schlauchförmige Struktur auf. Damit konnte der für die Fragmentierung der Mitochondrien verantwortliche Teil des Map-Toxins auf den mittleren Proteinabschnitt zwischen den Aminosäuren 101-152 eingegrenzt werden.

Im nächsten Abschnitt sollte nun untersucht werden, ob die Map-induzierte Spaltung der Mitochondrien durch Interaktion mit Komponenten der mitochondrialen Spaltungsmaschinerie oder unabhängig hiervon ausgelöst wird.

3.1.9. Die Map-vermittelte Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks geschieht unabhängig von Komponenten der mitochondrialen Spaltungsmaschinerie

Die Morphologie und intrazelluläre Verteilung von Mitochondrien ist äußerst variabel und hängt von der zellulären Aktivität, dem Nährstoffangebot und Entwicklungszustand der Zelle ab (Yaffe, 2003). Typischerweise als tubuläres Netzwerk auftretende Mitochondrien, können unter bestimmten Bedingungen (Zellteilung, Differenzierung, Apoptose) in mehrere, kleine und in der Zelle verteilte Mitochondrien gespalten werden. Die Teilung der Mitochondrien wird hierbei durch einen an der mitochondrialen Außenmembran lokalisierten Komplex, bestehend aus den Proteinen Dnm1, Fis1 und Gag3 (in *S. cerevisiae*), vermittelt (van der Bliek, 2000). Das Map-Toxin ist ebenfalls zur Teilung der Mitochondrien befähigt und es ist wahrscheinlich, dass Map mit Komponenten der mitochondrialen Teilungsmaschinerie wechselwirkt und dadurch die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks beschleunigt oder verstärkt. Um diese Annahme zu überprüfen, wurde Map(1-203)-GFP in Hefedeletionsstämme exprimiert, in denen jeweils eine der drei Komponenten der mitochondrialen Spaltungsmaschinerie fehlt. Mitochondrien aus den Deletionsstämmen $\Delta dnm1$, $\Delta fis1$ und $\Delta gag3$ weisen keinen funktionellen Spaltungsapparat in der mitochondrialen Außenmembran mehr auf und lokalisieren tubulär an der Zellperipherie. Nach einer 4-stündigen Induktion wurde der Einfluss des Map-Toxins auf die Morphologie der Mitochondrien in den Deletionsmutanten fluoreszenzmikroskopisch überprüft. Parallel hierzu wurden Mitochondrien von nicht-induzierten Zellen mit MitoTracker gefärbt, um die typische Morphologie der Mitochondrien der Deletionsmutanten erfassen zu können.

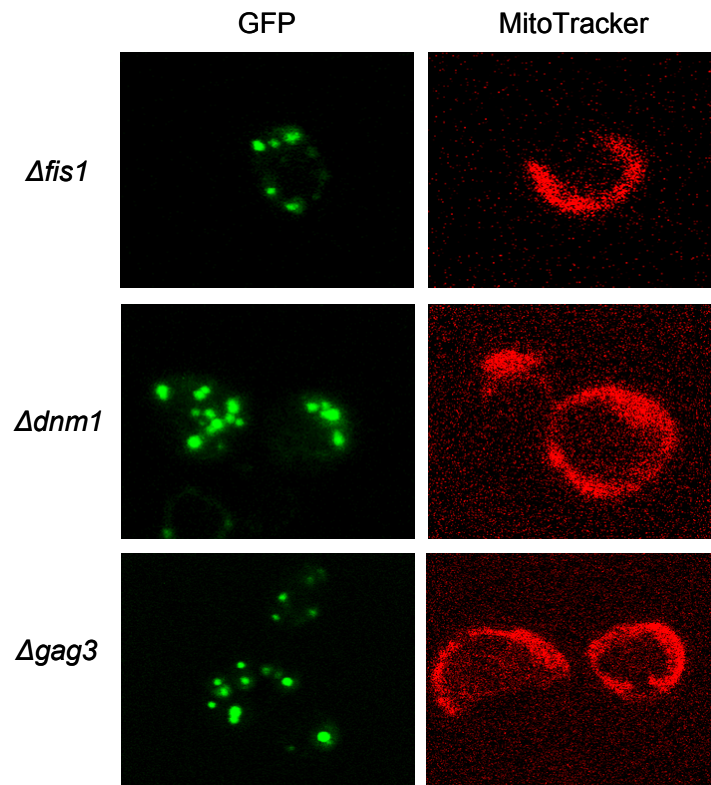


Abb. 3.1.9.1.: Expression von Map(1-203)-GFP in den Hefedeletionsmutanten $\Delta fis1$, $\Delta dnm1$ und $\Delta gag3$. Expression von Map(1-203)-GFP wurde für 4 h mit Galactose induziert und die Zellen anschließend fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Nicht-induzierte Zellen wurden mit MitoTracker behandelt, um die Mitochondrien zu färben.

Das Map-Toxin ist auch in Deletionsmutanten, denen Komponenten der mitochondrialen Spaltungsapparates fehlen, in der Lage, die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes auszulösen (siehe Abb. 3.1.9.1., GFP). Die Mitochondrien sind aufgrund des Verlustes des Membranpotentials nicht in der Lage, den Mitochondrien-spezifischen Farbstoff MitoTracker zu akkumulieren (nicht gezeigt). Nicht-induzierte Zellen hingegen weisen tubuläre und an der Zellperipherie lokalisierte Mitochondrien auf (siehe Abb. 3.1.9.1., MitoTracker) und bestätigen hiermit, dass die Mitochondrien in den Deletionsmutanten nicht schon vor der Expression von Map(1-203)-GFP in fragmentiertem Zustand vorgelegen haben. Die mitochondriale Funktion des Map-Toxins geschieht demnach unabhängig vom endogenen Dnm1/Fis1/Gag3-Komplex.

Das Map-Protein ist demnach in der Lage in Mitochondrien zu translozieren und anschließend unabhängig von endogenen Proteinen der mitochondrialen Teilungsmaschinerie eine Fragmentierung der Mitochondrien auszulösen. Dies

geschieht vermutlich ausgehend vom mittleren Proteinabschnitt des Map-Proteins und führt letztendlich zur allmählichen Zerstörung des mitochondrialen Membranpotentials. Es ist nahe liegend zu vermuten, dass die Effekte des Map-Toxins auf Mitochondrien toxisch oder hemmend auf das Wachstum der Hefezellen sind. Die Map-spezifische Zytotoxizität sollte im nächsten Abschnitt experimentell im Modell der Hefe untersucht werden.

3.1.10. Die Auswirkungen des Map-Toxins auf die Morphologie der Mitochondrien erhöhen nicht die Zytotoxizität

Nun sollte überprüft werden, in welchem Masse das an Mitochondrien lokalisierte Map-Toxin toxisch ist, nachdem es in Hefezellen exprimiert worden ist. Eine von Rodriguez-Escudero *et al.* (2005) beschriebene Zytotoxizität von Map in Hefezellen beschränkte sich auf ein im Cytosol akkumuliertes Map-Protein, welches als Fusionsprotein mit N-terminal gekoppelter Glutathion-S-Transferase (GST) vorlag. Die mitochondriale Zielerkennungssequenz des Map-Toxins war in diesem Fusionsprotein nicht mehr funktionell. Die Lokalisation des Map-Proteins an Mitochondrien war dadurch verhindert. Somit konnte über die Toxizität des an Mitochondrien lokalisierten Map-Proteins keine Aussage getroffen werden. Im nächsten Experiment sollte nun das Wachstum von Hefezellen verglichen werden, die entweder im Cytosol oder in Mitochondrien akkumulierendes Map-Protein exprimieren. Es kamen hierfür die zwei Fusionsproteine Map(45-203)-GFP bzw. Map(1-203)-GFP zum Einsatz. Ersteres besitzt keine mitochondriale Zielerkennungssequenz mehr und weist nach Expression in Hefezellen ein cytosolisches Verteilungsmuster auf (siehe Abb. 3.1.5.2.). Um das Wachstum von Map(45-203)-GFP oder Map(1-203)-GFP exprimierenden Hefezellen vergleichen zu können, wurden ausgehend von nicht-induzierten Startkulturen identischer Zelldichte, definierte Tropfen einer Verdünnungsreihe auf Galactose-haltige Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium aufgetragen. Um zu kontrollieren, ob die Startkulturen die gleiche optische Dichte aufweisen wurden identische Volumen aus den entsprechenden Verdünnungsreihen unter nicht-induzierenden Bedingungen auf Glucose-haltigen Agarplatten aufgetropft.

Ergebnisse

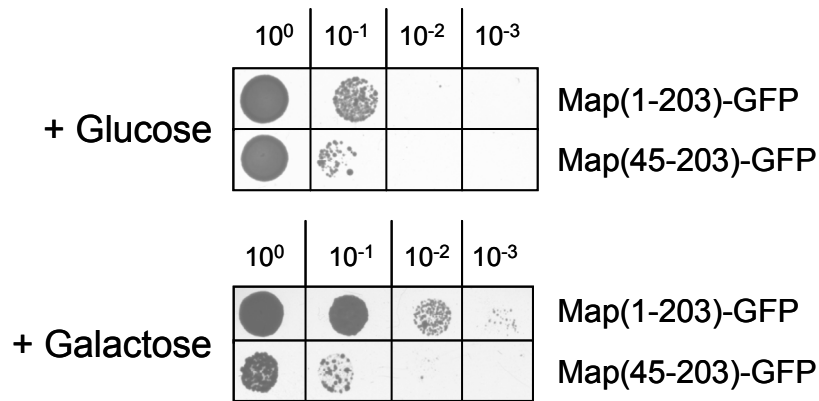


Abb. 3.1.10.1.: Letalitätstest von Map(1-203)-GFP bzw. Map(45-203)-GFP im Wildtyphefestamm BY4742. Die beiden Plasmide pYES2/Map(1-203)-GFP und pYES2/Map(45-203)-GFP wurden in den Wildtyphefestamm BY4742 transformiert und Transformanten zur Herstellung von Ü.N.-Kulturen (30°C) in Raffinose-haltigem SM/-ura – Medium verwendet. Ausgehend von Startkulturen (10^0) mit einer OD_{605nm} von 0,5 wurden Verdünnungen 10^{-1} , 10^{-2} und 10^{-3} in SM/-ura – Medium hergestellt und daraus jeweils 5 μ l auf SM/-ura – Platten mit Glucose bzw. Galactose als Kohlenstoffquelle aufgetropft. Die Platten wurden anschließend für 2 – 3 Tage bei 30°C inkubiert.

Mit den Plasmiden pYES2/Map(1-203)-GFP bzw. pYES2/Map(45-203)-GFP transformierte Hefezellen des Wildtypstammes BY4742 zeigen unter nicht-induzierenden Bedingungen ein nahezu identisches Wachstumsverhalten (siehe Abb. 3.1.10.1., +Glucose). Auf Galactose-haltigen SM/-ura – Platten, wird die Expression der beiden Fusionsproteine Map(1-203)-GFP und Map(45-203)-GFP induziert. Hier zeigt sich ein deutlicher Unterschied im Wachstumsverhalten. Während bei Map(1-203)-GFP exprimierenden Hefezellen ein Wachstum selbst bei einer Verdünnungsstufe von 10^{-3} beobachtet werden kann, ist bei Map(45-203)-GFP exprimierenden Hefezellen schon bei der Verdünnungsstufe 10^{-1} ein sehr eingeschränktes Wachstum zu sehen (siehe Abb. 3.1.10.1., +Galactose).

Hiermit konnte das Ergebnis von Rodriguez-Escudero *et al.* (2005) bestätigt werden. Im Cytosol akkumuliertes Map-Protein wirkt sich stark hemmend auf das Wachstum der Hefezellen aus. Doch überraschenderweise ist diese Toxizität aufgehoben, wenn das Map-Protein in der Lage ist in Mitochondrien zu akkumulieren. Offensichtlich wirkt sich die Fragmentierung der Mitochondrien, sowie der nachträgliche Verlust des mitochondrialen Membranpotentials weit weniger toxisch aus, als die cytosolischen Effekte, welche vom Map-Toxin ausgelöst werden. Die Akkumulation des Map-Proteins in Mitochondrien könnte diesen Daten zufolge eine regulierende und dabei protektive Rolle spielen, um das Einwirken des Map-Toxins in im Cytosol stattfindenden Prozessen einzudämmen.

Im nächsten Abschnitt sollte die Rolle eines konservierten Motivs innerhalb der Map-Aminosäuresequenz im Hinblick auf die Zytotoxizität des Map-Toxins untersucht werden.

3.1.11. Das in Map-Homologen konservierte WXXXE-Motiv ist essentiell für die cytosolische Toxizität des Map-Toxins

In der Publikation von Alto *et al.* (2006) wird zum ersten Mal ein Sequenzmotiv beschrieben, welches alle Mitglieder einer Familie bakterieller Typ-III-sekretierter Effektorproteine aufweisen. Dieser Proteinfamilie gehört auch das Map-Toxin an. Das konservierte Motiv besteht aus der Aminosäure Tryptophan, gefolgt von drei beliebigen Aminosäuren und Glutamat (WXXXE). In der Map-Sequenz entspricht das WXXXE-Motiv den Aminosäuren 74-78. In der Evolution konservierte Sequenzmotive und Proteindomänen sind meist essentiell für eine bestimmte Funktion eines Proteins. Es ist daher anzunehmen, dass das WXXXE-Motiv für die von Map beschriebenen Effekte notwendig ist. Es sollte zunächst festgestellt werden, ob das WXXXE-Motiv Anteil an der Zytotoxizität des im Cytosol lokalisierten Map-Toxins nimmt. Zu diesem Zweck wurde ein Fusionsprotein bestehend aus Map(45-203) und C-terminalem GFP mit verändertem WXXXE-Motiv hergestellt. Die Aminosäure Tryptophan (W) wurde durch die neutrale Aminosäure Alanin (A) ersetzt. Die beiden Plasmide pYES2/Map(45-203)_{W74A}-GFP (Klonierungsstrategie siehe 2.2.1.13.) und pYES2/Map(45-203)-GFP wurden in Hefezellen des Wildtypstammes BY4742 transformiert und mit Transformanten Ü.N.-Kulturen in SM/-ura/+Raffinose – Medium angeimpft und bei 30°C inkubiert. Die Ü.N.-Kulturen wurden auf eine identische OD_{605nm} von 1,5 eingestellt und hiermit Verdünnungsreihen mit den Verdünnungsstufen 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ in SM/-ura – Medium hergestellt. Jeweils 10 µl aus den Startkulturen (10⁰) und den entsprechenden Verdünnungen wurden auf induzierende Galactose- und nicht-induzierende Glucose-Agarplatten mit synthetischem Minimalmedium ohne Uracil aufgetropft. Nach einer 2- bis 3-tägigen Inkubation der Platten bei 30°C wurden das Ergebnis durch direkten Vergleich des Wachstums der Hefezellen in den einzelnen Verdünnungsstufen ausgewertet.

Ergebnisse

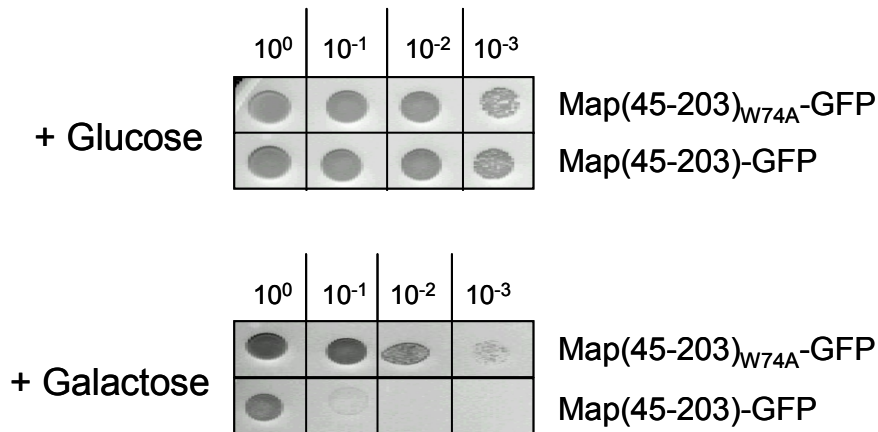


Abb. 3.1.11.1.: Letalitätstest von $\text{Map}(45-203)\text{-GFP}$ bzw. $\text{Map}(45-203)_{W74A}\text{-GFP}$ im Wildtyphefestamm BY4742. $\text{Map}(45-203)\text{-GFP}$ und $\text{Map}(45-203)_{W74A}\text{-GFP}$ wurde in Wildtyphefzellen transformiert und Ü.N.-Kulturen in Raffinose-haltigem SM/-ura – Medium hergestellt. Jeweils 10 μl aus den Startkulturen ($\text{OD}_{605\text{nm}}$ 1,5) und den entsprechenden Verdünnungsstufen 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} wurden auf Galactose- bzw. Glucose-haltige Agarplatten (SM/-ura) aufgetropft. Die Platten wurden bei 30°C für 2-3 Tage inkubiert.

Der Austausch der im WXXXE-Motiv konservierten Aminosäure Tryptophan-74 durch die Aminosäure Alanin hat zur Folge, dass das im Cytosol akkumulierte Map-Toxin nicht mehr seine zytotoxische Aktivität entfalten kann. Die Expression von $\text{Map}(45-203)\text{-GFP}$ hat erwartungsgemäß eine Hemmung des Wachstums der Hefezellen zur Folge, während das Zellwachstum von $\text{Map}(45-203)_{W74A}\text{-GFP}$ exprimierenden Hefezellen nicht mehr beeinträchtigt ist (siehe Abb. 3.1.11.1., +Galactose). Demnach konnte bestätigt werden, dass das WXXXE-Motiv eine funktionelle Rolle innerhalb der Map-Sequenz angenommen hat und aus diesem Grund innerhalb der Familie der Map-homologen Proteine konserviert worden ist. Das WXXXE-Motiv kann mehrere Eigenschaften aufweisen, die zur Funktion des Map-Toxins beitragen. Es kann sich einerseits um ein Interaktionsmotiv für die Anbindung an andere Protein handeln, andererseits aber auch als Struktur-determinierendes Motiv. Darüber hinaus besteht auch die Möglichkeit, dass das WXXXE-Motiv eine Erkennungssequenz für Enzyme darstellt, welche in der Lage sind, Proteine posttranslational zu modifizieren.

Die ebenfalls das WXXXE-Motiv aufweisenden, Map-homologen Proteine unterscheiden sich vom Map-Toxin in einem wesentlichen Punkt. Sie weisen keine N-terminale, mitochondriale Zielerkennungssequenz auf und sind dadurch nur im Cytosol lokalisiert. Das Map-Toxin weist als einziges Protein der konservierten Familie eine zusätzliche mitochondriale Zielerkennungssequenz auf.

Es soll nun im nächsten Abschnitt untersucht werden, ob das WXXXE-Motiv auch für die Mitochondrien-spezifischen Funktionen des Map-Toxins wichtig ist.

3.1.12. Das WXXXE-Motiv ist für die Map-vermittelte Spaltung der Mitochondrien erforderlich

Das Map-Toxin kann im Cytosol der Wirtszelle das kleine GTPase-Protein Cdc42 in aktivierter, GTP-gebundener Form nachahmen, ohne eine Sequenzhomologie zum Cdc42-Protein aufzuweisen (Alto, 2006). Es ist denkbar, dass das WXXXE-Motiv für die strukturelle Mimikry wirtseigener GTPasen essentiell ist. Unter den von Map nachgeahmten GTPasen können auch solche Proteine darunter sein, die an oder in Mitochondrien ihre Funktion ausüben. Sind die von Map an Mitochondrien ausgelösten Effekte ebenfalls auf die Nachahmung der Funktion eines mitochondrialen GTPase-Proteins zurückzuführen, ist auch eine mitochondriale Bedeutung des WXXXE-Motivs zu erwarten. Daher sollte untersucht werden, ob neben der cytosolischen, auch die mitochondriale Funktion des Map-Toxins durch den Verlust des WXXXE-Motivs beeinträchtigt ist. Hierzu wurde ein Fusionsprotein Map-GFP hergestellt, welches ein verändertes WXXXE-Motiv aufweist. Die Aminosäure Tryptophan-74 wurde erneut durch Alanin ersetzt. Das Fusionsprotein Map(1-203)_{W74A}-GFP (Klonierungsstrategie siehe 2.2.1.13.) wurde in Wildtyphefenzellen exprimiert und anschließend die intrazelluläre Lokalisation des Fusionsproteins sowie die Morphologie der Mitochondrien untersucht.

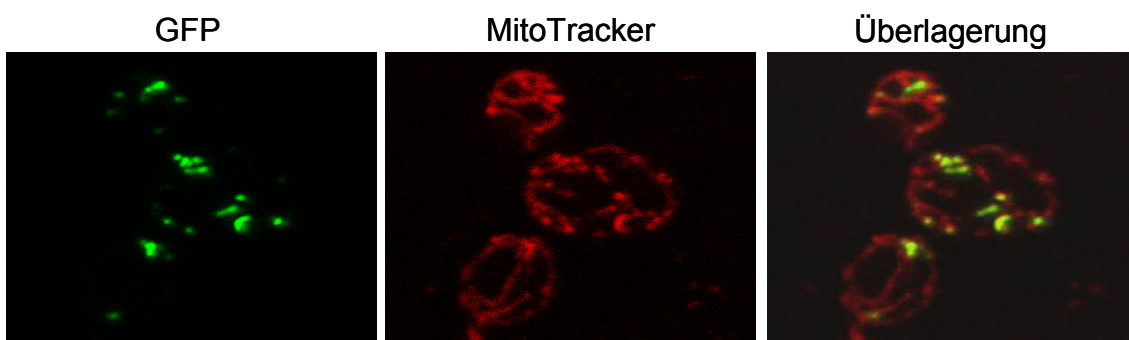


Abb. 3.1.12.1.: Expression von Map(1-203)_{W74A}-GFP in *Saccharomyces cerevisiae*. Hefezellen des Wildtyp-Stammes BY4742 wurden nach 4-stündiger Expression von Map(1-203)_{W74A}-GFP mit MitoTracker behandelt, um die Mitochondrien zu färben. Mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie wurde anschließend die Lokalisation des Fusionsproteins, sowie die Morphologie der Mitochondrien untersucht.

Das WXXXE-Motiv ist offensichtlich auch für die mitochondriale Funktion des Map-Toxins von fundamentaler Bedeutung. Die minimale Änderung von Tryptophan-74 in Alanin hat zur Folge, dass das mitochondriale Netzwerk von Wildtyphefzellen nicht mehr fragmentiert werden kann (siehe Abb. 3.1.12.1., MitoTracker). Die duale Rolle des WXXXE-Motivs für die Funktion des Map-Proteins im Cytosol und an Mitochondrien lässt stark vermuten, dass sich ein generelles Prinzip hinter der Wirkungsweise von Map in unterschiedlichen Zellkompartimenten verbirgt. Interessanterweise lokalisiert das veränderte Map-Protein dennoch an diskreten Punkten, die mit Mitochondrien kolokalisieren (siehe Abb. 3.1.12.1., GFP und Überlagerung). Vermutlich lokalisiert das Map-Toxin, unabhängig vom WXXXE-Motiv, zunächst an spezifischen submitochondrialen Strukturen und löst erst danach die Teilung der Mitochondrien aus. Die von Map beschriebene Mimikry einer cytosolischen GTPase (Cdc42), sowie die funktionelle Notwendigkeit des WXXXE-Motivs im Cytosol und an Mitochondrien, lässt vermuten, dass zumindest eine mitochondriale Funktion des Map-Toxins eventuell in der Nachahmung einer mitochondrialen GTPase besteht. Map verhält sich diesen Daten zufolge, wie das endogene, mitochondriale Protein Dnm1, welches der Hauptakteur bei der physiologischen Teilung von Mitochondrien in eukaryontischen Zellen ist. Auch bei Dnm1 ist vor der Spaltung des mitochondrialen Retikulums eine Anhäufung an diskreten Foci beobachtet worden (Otsuga, 1998; Bleazard, 1999). Interessanterweise handelt es sich bei Dnm1 ebenfalls um eine GTPase. In der Auslösung der mitochondrialen Fragmentierung durch das Map-Toxin könnte es sich in der Tat um eine strukturelle und dadurch funktionelle Nachahmung von Dnm1 handeln. Eine Diskrepanz besteht jedoch in der unterschiedlichen Lokalisation der beiden Proteine. Während Map in die mitochondriale Matrix importiert wird, handelt es sich bei Dnm1 um ein an der mitochondrialen Außenmembran assoziiertes Protein. Es besteht aber die Möglichkeit, dass ein gewisser Anteil des Map-Toxins an der Oberfläche von Mitochondrien verbleibt und erst dadurch die Fragmentierung der Mitochondrien zur Folge hat. Dies ist denkbar, wenn posttranslationale Modifikationen die Translokation des Map-Proteins in Mitochondrien verhindern. Eine gleichzeitige Lokalisation von unmodifizierten Map-Proteinen in der mitochondrialen Matrix könnte weitere Effekte auslösen, wie z.B. die Herabsetzung des mitochondrialen Membranpotentials. Tatsächlich verbirgt sich innerhalb des WXXXE-Motivs von Map eine Erkennungssequenz für so genannte SUMO-Ligasen. Die

posttranslationale Modifikation von Proteinen mit SUMO (small ubiquitin-related modifier) ist in eukaryontischen Zellen häufiger vorkommend, als bisher gedacht. Derartige posttranslationale Modifikationen scheinen von grundlegender Bedeutung für verschiedene Funktionen von Proteinen zu sein. Aufgrund der vorliegenden Daten ist zu vermuten, dass das Map-Toxin mit SUMO (small ubiquitin-related modifier) modifiziert wird. Sofern sich diese Vermutung bestätigen ließe, wäre Map das erste bakterielle Toxin, das als Substrat einer Sumoylierung identifiziert würde.

3.2. Zielerkennung endogener Metabolit-Translokatoren der mitochondrialen Innenmembran

Metabolit-Translokatoren der mitochondrialen Innenmembran vermitteln den Austausch von Stoffwechselprodukten zwischen der Matrix der Mitochondrien und dem Cytosol. Die an cytosolischen Ribosomen synthetisierten Vorstufenproteine von Metabolit-Translokatoren müssen über mitochondriale Translokationsmaschinerien zunächst in Mitochondrien importiert und schließlich in die Innenmembran inseriert werden. Die Vorstufen der mitochondrialen Translokatorproteine benötigen in der Regel keine N-terminale Zielerkennungssequenz für den Import in Mitochondrien. Stattdessen sind mehrere, interne Zielerkennungsmotive an der Erkennung durch Rezeptoren des TOM-Komplexes beteiligt. Jedoch weisen manche mitochondriale Metabolit-Translokatoren aus Säugetieren und Pflanzen eine N-terminale Präsequenz mit Charakteristika mitochondrialer Zielerkennungssequenzen von Matrix-Proteinen auf. Im Abschnitt 3.1. wurde der N-Terminus des Map-Toxins als ein derartiges mitochondriales Zielerkennungselement beschrieben. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Vincenzo Zara (Universität Lecce, Italien) wurde nun die mitochondriale Zielerkennung des Präsequenz-tragenden Citrat-Translokators (CIC, *citrate carrier*) aus *Rattus norvegicus* im Detail untersucht, um die Funktion einer Translokatorpräsequenz zu bestimmen.

3.2.1. Die N-terminale Präsequenz des Citrat-Translokators ist nicht an der mitochondrialen Zielerkennung beteiligt

Zunächst sollte überprüft werden, ob die CIC-Präsequenz von den Mechanismen zur Zielerkennung und Translokation von Präsequenzen mitochondrialer Matrix-Proteine erfasst wird. Hierfür wurde die Vorstufe des CIC-Proteins (*precursor*, pCIC) in Retikulozytenlysat unter Inkorporation von ³⁵S-markiertem Methionin synthetisiert und in isolierte Mitochondrien aus Hefemutanten mit Deletionen oder Defekten in Komponenten der mitochondrialen Translokationsmaschinerien importiert. Der Import von pCIC wurde mit dem Importverhalten von ³⁵S-markiertem Su9-DHFR verglichen. Hierbei handelt es sich um ein Hybridprotein, bestehend aus der Präsequenz der Untereinheit 9 der ATP-Synthase und dem cytosolischen Protein DHFR (Dihydrofolatreduktase). Su9-DHFR wird von den klassischen Zielerkennungs- und

Translokationsmechanismen der Mitochondrien erkannt, welche für mitochondriale Matrixproteine gelten.

Der Tom20-Rezeptor gilt als der Hauptrezeptor für die Erkennung von N-terminalen Präsequenzen mitochondrialer Matrix-Proteine (Moczko, 1994). Zunächst sollte untersucht werden, ob der Verlust des Tom20-Rezeptors Auswirkungen auf den Import von pCIC in Mitochondrien hat.

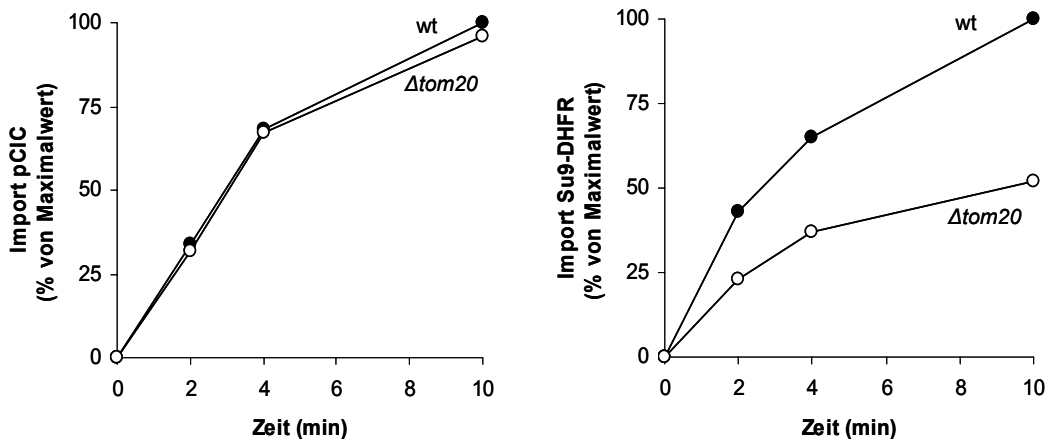


Abb. 3.1.2.1.: Import von pCIC und Su9-DHFR in isolierte Mitochondrien des Wildtyp-Hefestammes YPH500 bzw. der Tom20-Deletionsmutante (MM112-C). pCIC (links) und Su9-DHFR (rechts) wurden für 2, 4 und 10 min unter Standardbedingungen mit isolierten Mitochondrien des Wildtyphefestammes YPH500 bzw. der $\Delta tom20$ – Mutante inkubiert und anschließend nicht-importierte Proteine mit Proteinase K (250 $\mu\text{g/ml}$, 0°C, 20 min) abgebaut. Mittels Autoradiographie nach SDS-PAGE wurde die Importeffizienz in Wildtyp- und $\Delta tom20$ -Mitochondrien bestimmt und das Ergebnis der Importkinetik in Relation zum höchsten Importwert als Kurvendiagramm dargestellt.

Für den Import des Citrat-Translokators in isolierte Mitochondrien spielt der Tom20-Rezeptor keine Rolle. Während die Importeffizienz von Su9-DHFR in Mitochondrien der Tom20-Deletionsmutante deutlich herabgesetzt ist (~50%; Abb. 3.1.2.1., rechts), kann bei pCIC unter Verwendung identischer Mitochondrienpräparationen keine Herabsetzung der Importeffizienz beobachtet werden (Abb. 3.1.2.1., links). Es kann somit ausgeschlossen werden, dass die Präsequenz des CIC-Proteins als Erkennungsmerkmal für den Tom20-Rezeptor fungiert.

Präsequenzen mitochondrialer Matrix-Proteine werden nach Erkennung durch den Tom20-Rezeptor an den Tom22-Rezeptor weitergegeben. Der Tom22-Rezeptor ist ein integraler Bestandteil des TOM-Komplexes und für dessen korrekte Assemblierung essentiell (van Wilpe, 1999). Er weist eine aus der mitochondrialen

Außenmembran ins Cytosol ragende Domäne (*cis*) und eine in den Intermembranraum ragende Domäne (*trans*) auf. Die Effizienz der Translokation von mitochondrialen Proteinen mit N-terminaler, positiv geladener Präsequenz über die generelle Importpore des TOM-Komplexes ist bei fehlender *trans* Domäne erheblich herabgesetzt (Bolliger, 1995; Court, 1996; Moczeko, 1997; Schatz, 1997; Komiya, 1998). Es sollte nun überprüft werden, ob für eine effiziente Translokation von pCIC über die Außenmembran der Mitochondrien die *trans* Domäne des Tom22-Rezeptors benötigt wird. Es sollte aus diesem Grund ³⁵S-markiertes pCIC-Protein, sowie Su9-DHFR als Kontrollprotein, in Mitochondrien einer Hefemutante importiert werden, welche einen Tom22-Rezeptor ohne *trans* Domäne aufweisen. Zum Vergleich wurde der Import in Mitochondrien aus dem entsprechenden Wildtyphefestamm wiederholt, um die Importeffizienz von pCIC bzw. Su9-DHFR in Wildtyp vs. Mutante vergleichen zu können. Die Mitochondrien wurden vor dem Importexperiment mit Trypsin vorbehandelt, um die im Cytosol exponierten Domänen der Importrezeptoren des TOM-Komplexes proteolytisch abzubauen. Der Import von Vorläuferproteinen in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien ist somit nur noch von Rezeptor-Bindestellen auf der *trans* Seite der Außenmembran abhängig.

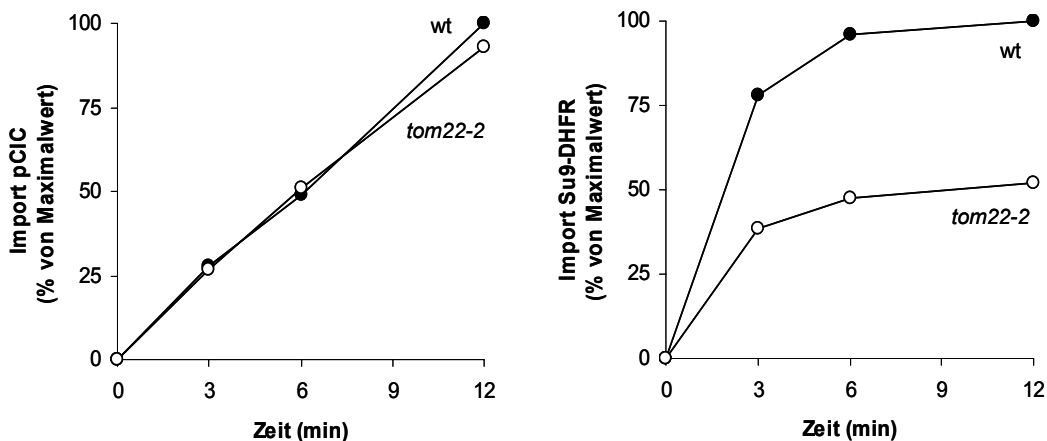


Abb. 3.1.2.2.: Import von pCIC und Su9-DHFR in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien des Wildtyp-Hefestammes OL223 bzw. der *tom22-2* Mutante (OL200-AH49). pCIC (links) und Su9-DHFR (rechts) wurden für 3, 6 und 12 min unter Standardbedingungen in Trypsin-vorbehandelte Mitochondrien des Wildtyphefestammes OL223 bzw. der *tom22* – Mutante OL200-AH49 importiert. Nicht-importierte Proteine wurden mit Proteinase K degradiert. Durch Autoradiographie nach SDS-PAGE wurde die Importeffizienz von pCIC und Su9-DHFR in Wildtyp- und *tom22*-Mitochondrien bestimmt und das Ergebnis der Importkinetik von Wildtyp vs. Mutante in Relation zum höchsten Importwert als Kurvendiagramm dargestellt.

Obwohl der Citrat-Translokator eine basische Präsequenz besitzt, ist die Importeffizienz nicht beeinträchtigt, wenn zusätzlich zu den Rezeptorbindestellen an der *cis*-Seite der Außenmembran auch die *trans* Domäne des Tom22-Rezeptors deletiert ist (Abb. 3.1.2.2., links). Der Import des Kontrollproteins Su9-DHFR zeigt unter identischen Versuchsbedingungen eine deutliche Abhängigkeit von der *trans* Domäne des Tom22-Rezeptors (~50% verringerte Importeffizienz; Abb. 3.1.2.2., rechts). Die N-terminale Präsequenz des CIC-Translokators dient somit nicht als Erkennungsmotiv für die *trans* – Bindestelle des Tom22-Rezeptors, wie es für Präsequenzen mitochondrialer Proteine der Matrix üblich ist.

Der Tom70-Rezeptor erkennt interne Zielerkennungsmerkmale von hydrophoben Proteinen der mitochondrialen Innenmembran und ermöglicht die effiziente Translokation über die generelle Importpore des TOM-Komplexes (Hines, 1990; Steger, 1990). Die Importeffizienz von ³⁵S-markiertem pCIC, sowie dem Kontrollprotein Su9-DHFR, in Mitochondrien aus einer Tom70-Hefedeletionsmutante (MM208) sollte mit der Importeffizienz in Mitochondrien des entsprechenden Wildtypstammes (YPH500) verglichen werden.

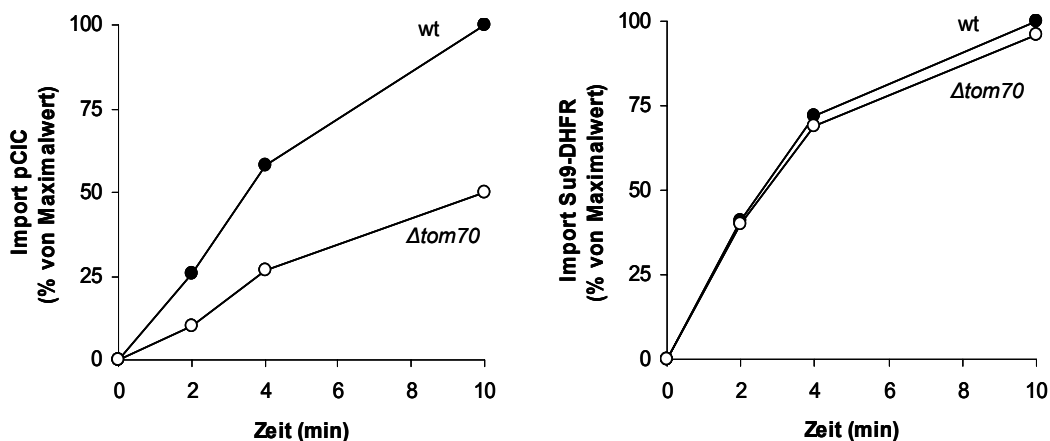


Abb. 3.1.2.3.: Import von pCIC und Su9-DHFR in isolierte Mitochondrien des Wildtyp-Hefestammes YPH500 bzw. der $\Delta tom70$ Mutante (MM208). pCIC (links) und Su9-DHFR (rechts) wurden für 2, 4 und 10 min unter Standardbedingungen in Mitochondrien des Wildtyphefestammes YPH500 bzw. der $\Delta tom70$ – Mutante (MM208) importiert. Nicht-importierte Proteine wurden durch Inkubation mit Proteinase K abgebaut. Nach Auftrennung der importierten Proteine mit SDS-PAGE wurde durch Autoradiographie die Importeffizienz von pCIC und Su9-DHFR in Wildtyp- und $\Delta tom70$ -Mitochondrien bestimmt. Das Ergebnis der Importkinetik von pCIC bzw. Su9-DHFR in Wildtyp vs. Mutante wurde in Relation zum höchsten Importwert in einem Kurvendiagramm dargestellt.

Der Citrat-Translokator weist eine um etwa 50% geringere Importeffizienz in Mitochondrien der Tom70-Deletionsmutante auf, verglichen mit der Importeffizienz in Mitochondrien des entsprechenden Wildtypstammes (Abb. 3.1.2.3., links). Das Kontrollprotein Su9-DHFR importiert in Mitochondrien des Wildtypstammes und der Tom70-Deletionsmutante mit annähernd identischer Effizienz und bestätigt, dass der für pCIC beobachtete Effekt nicht aufgrund einer ungeeigneten Präparation an Mitochondrien zustande gekommen ist.

Die basische Präsequenz des Citrat-Translokators bewirkt nicht, dass das Protein über die Zielerkennungsmechanismen der TOM-Maschinerie erkannt wird, welche für Präsequenz-tragende mitochondriale Proteine der Matrix gelten. Der Citrat-Translokator verwendet trotz basischer Präsequenz die für die Zielerkennung von Metabolit-Translokatoren üblichen Mechanismen zur Translokation in Mitochondrien. Die Präsequenz des Citrat-Translokators aus *Rattus norvegicus* dient somit nicht als zusätzliches mitochondriales Zielerkennungssignal.

3.2.2. Die *Carrier Signature* des Dicarboxylat-Translokators ist nicht für die mitochondriale Zielerkennung erforderlich

Die N-terminale Präsequenz des Citrat-Translokators dient nicht als mitochondriales Zielerkennungssignal. Es müssen daher interne Zielerkennungsmotive innerhalb von Vorstufenproteinen der mitochondrialen Metabolit-Translokatoren existieren. Die in allen Metabolit-Translokatoren hochkonservierte *Carrier Signature* könnte in der Tat ein solches internes Zielerkennungsmotiv für TOM-Rezeptoren darstellen. Um dieser Vermutung nachzugehen ist es nahe liegend, zunächst durch ortsspezifische Mutagenese die CS-typischen Aminosäuren eines Translokatorproteins in neutrale Aminosäuren, wie z.B. Alanin, umzuwandeln, um anschließend die Auswirkungen der Substitutionen auf die Translokation in Mitochondrien zu überprüfen. Als Modellprotein hierzu eignet sich der Dicarboxylat-Translokator (*dicarboxylate carrier*, DIC) von *Saccharomyces cerevisiae*. Er weist nur zwei vollständige CS im ersten und dritten Modul auf. Demnach sind Aminosäuresubstitutionen nur in diesen beiden CS notwendig, um die Rolle der CS bei der mitochondrialen Zielerkennung aufzufindig zu machen. Das Fehlen einer dritten CS im mittleren Modul des DIC-Proteins berechtigt zur Annahme, dass im Falle einer Bedeutung der CS bei der mitochondrialen

Zielerkennung, Biogenese oder Funktion, nicht alle konservierten Motive hierzu erforderlich sind.

Ausgehend von der wildtypischen DIC-Sequenz (pGEM-4z/DIC; bereitgestellt von Prof. Vincenzo Zara, Universität Lecce, Italien) wurden drei unterschiedliche Derivate hergestellt, in denen entweder die CS des ersten Moduls ($DIC_{\Delta CS1}$; P33A/D35A/K38A), die CS des dritten Moduls ($DIC_{\Delta CS2}$; P227A/D229A/K232A) oder die CS beider Module ($DIC_{\Delta CS1/2}$; P33,227A/D35,229A/K38,232A) mutagenisiert worden ist (Klonierungsstrategien siehe 2.2.1.13.). Nach Herstellung in Retikulozytenlysat sollte unter Verwendung von ^{35}S -Methionin die Importeffizienz der DIC-Derivate und des wildtypischen DIC-Proteins in isolierte Hefemitochondrien des Wildtypstammes YPH499 miteinander verglichen werden. Die ^{35}S -markierten Proteine wurden für 2, 4, 8 und 16 min unter Standardbedingungen mit den isolierten Mitochondrien inkubiert, anschließend Proteinase K in einer Endkonzentration von 250 $\mu\text{g/ml}$ zur Degradation nicht-importierter Proteine zugegeben und 20 min auf Eis inkubiert (Zara, 2001). Nach SDS-PAGE wurde durch Autoradiographie mit einem Phosphorimager der zu den jeweiligen Importzeiten importierte Proteinanteil quantifiziert und das Ergebnis der Importkinetiken in einem Kurvendiagramm dargestellt.

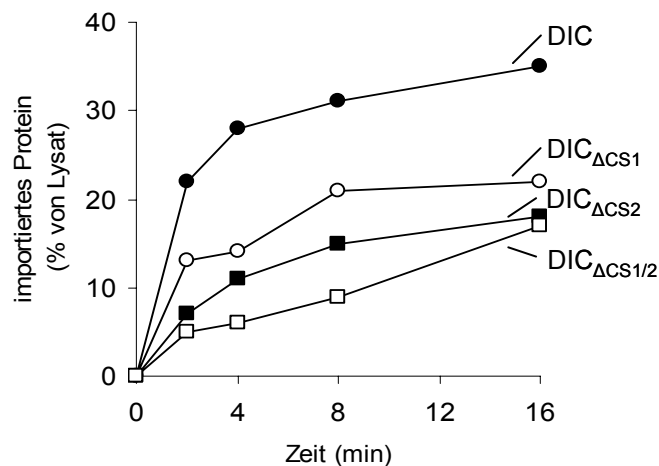


Abb. 3.2.2.1.: Import von DIC und dessen Derivate in isolierte Mitochondrien aus *Saccharomyces cerevisiae*. Die Proteine DIC, $DIC_{\Delta CS1}$, $DIC_{\Delta CS2}$ und $DIC_{\Delta CS1/2}$ wurden in Retikulozytenlysat hergestellt und anschließend unter Standardbedingungen mit isolierten Mitochondrien des Wildtypstammes YPH499 für unterschiedliche Zeiten (2, 4, 8 und 16 min) inkubiert. Der Importvorgang wurde durch Überführung der Ansätze auf Eis und Zugabe von Proteinase K gestoppt. Mittels SDS-PAGE und Autoradiographie wurde der in Mitochondrien importierte Proteinanteil bestimmt, anschließend quantifiziert und die Importkinetik für jedes Protein in Relation zur Intensität des eingesetzten Lysats in einem Kurvendiagramm dargestellt.

Wie in Abb. 3.2.2.1. erkennbar, ist die *Carrier Signature* offensichtlich nicht maßgeblich an der mitochondrialen Zielerkennung des Dicarboxylat-Translokators beteiligt. DIC-Derivate ohne funktioneller CS im ersten und/oder dritten Modul werden weiterhin zeitabhängig mit hoher Effizienz in isolierte Mitochondrien importiert. Die Importeffizienz der drei Derivate DIC Δ CS1, DIC Δ CS2 und DIC Δ CS1/2 ist im Vergleich zum wildtypischen DIC-Protein nur etwa zur Hälfte herabgesetzt. Die unterschiedliche Importeffizienz lässt sich vermutlich auch damit erklären, dass die Lysate der jeweiligen DIC-Derivate keine identische Qualität und Quantität an Chaperonproteinen aufweisen. Chaperone vermeiden die Aggregation von Proteinen und ermöglichen dadurch eine für den Import günstige Konformation von hydrophoben Membranproteinen. Ein weiterer Grund könnte sein, dass die CS an der Stabilisierung einer nicht zur Aggregation des DIC-Proteins neigenden Konformation beiträgt. Der Verlust von mindestens einer CS kann demnach eine erhöhte Aggregation zur Folge haben. Es besteht aber dennoch die Möglichkeit, dass die CS zusätzlich als Erkennungsmotiv für den Tom70-Rezeptor fungiert, welcher am Import der mitochondrialen Metabolit-Translokatoren beteiligt ist. Dies sollte im nächsten Experiment überprüft werden.

Der Tom70-Rezeptor erkennt hydrophobe Vorläuferproteine der mitochondrialen Innenmembran, welche keine mitochondriale Zielerkennungssequenz aufweisen und beschleunigt deren Translokation über die Außenmembran der Mitochondrien (Hines, 1990; Steger, 1990). Die Importkinetik von wildtypischem DIC-Protein, sowie dem Derivat DIC Δ CS1/2 und dem AAC als Kontrollprotein, in Mitochondrien aus einer Tom70-Hefedeletionsmutante (MM208) sollte mit der Importkinetik in Mitochondrien des entsprechenden Wildtypstammes YPH500 verglichen werden. Bei einer Beteiligung der beiden CS des DIC-Proteins an der Tom70-Rezeptorerkennung sollte die Importkinetik von DIC Δ CS1/2 in Mitochondrien des Wildtypstammes und der Δ tom70 Deletionsmutante identisch sein.

Ergebnisse

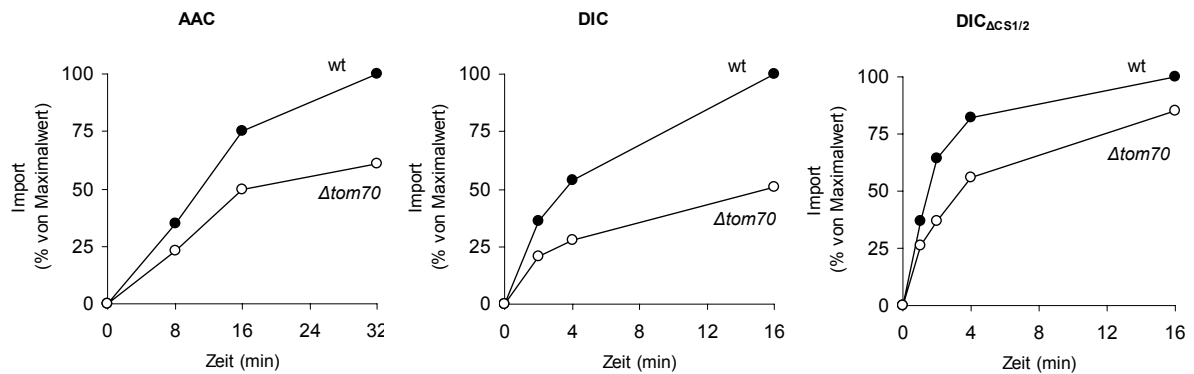


Abb. 3.2.2.2.: Import von AAC, DIC und DIC $\Delta CS1/2$ in isolierte Mitochondrien aus dem Hefewildtypstamm YPH500 und der Tom70-Deletionsmutante. Die Proteine AAC, DIC und DIC $\Delta CS1/2$ wurden in Retikulozytenlysat hergestellt und unter Standardbedingungen mit isolierten Mitochondrien des Wildtypstammes YPH500 und der Deletionsmutante $\Delta tom70$ für unterschiedliche Zeiten inkubiert. Nicht-importierte Proteine wurden mit Proteinase K abgebaut. Nach SDS-PAGE wurde der importierte Proteinanteil autoradiographisch bestimmt, quantifiziert und die Importkinetik von AAC, DIC und DIC $\Delta CS1/2$ in Wildtyp versus Mutante in Relation zum höchsten Importwert (100%) in einem Kurvendiagramm dargestellt.

Die beiden Metabolit-Translokatoren AAC und DIC werden in Mitochondrien der Hefedeletionsmutante $\Delta tom70$ mit deutlich herabgesetzter Effizienz (~40-50%) importiert (siehe Abb. 3.2.2.2.; AAC, links und DIC, mitte). Dies ist in Einklang mit den Ergebnissen von Hines *et al.* (1990), welche dem Tom70-Rezeptor eine dem Importprozess stimulierende Wirkung zuschreiben. Das Derivat DIC $\Delta CS1/2$, welches keine funktionelle CS mehr besitzt, weist in Mitochondrien der Tom70-Deletionsmutante ebenfalls eine signifikant herabgesetzte Importeffizienz im Vergleich zu den Mitochondrien des entsprechenden Wildtyps auf (siehe Abb. 3.2.2.2., rechts). Dies deutet darauf hin, dass andere Zielerkennungsmerkmale für die Erkennung des DIC $\Delta CS1/2$ durch den Tom70-Rezeptor zuständig sind, welche in Wildtypmitochondrien erkannt werden und zu einer erhöhten Importrate führen.

Die *Carrier Signature* spielt diesen Daten zufolge keine bedeutende Rolle in der mitochondrialen Zielerkennung. Es konnte demonstriert werden, dass der für den Import von hydrophoben Proteinen der Innenmembran erforderliche Tom70-Rezeptor nicht die CS als Erkennungsmotiv verwendet. Im nächsten Abschnitt sollte nun untersucht werden, ob die beiden *Carrier Signature* – Motive des Dicarboxylat-Translokators an der Überquerung des Intermembranraumes durch Anbindung an die kleinen Tim-Proteine, Tim9 und Tim10, beteiligt sind.

3.2.3. Die *Carrier Signature* ist nicht an der Anbindung des Dicarboxylat-Translokators an den Tim9/Tim-10-Komplex beteiligt

Voraussetzung für die Insertion von Vorläuferproteinen der Metabolit-Translokatoren in die mitochondriale Innenmembran ist die vorherige Überquerung des Intermembranraumes der Mitochondrien. Da die Vorläuferproteine äußerst hydrophobe Abschnitte aufweisen, ist die Überquerung des wässrigen Milieus zwischen Außen- und Innenmembran nur mit Hilfe des Tim9/Tim10-Komplexes möglich. Dieser Komplex, bestehend aus drei Tim9- und drei Tim10-Monomeren, schirmt gewisserweise die hydrophoben Abschnitte der über die TOM-Pore gelangenden Module der Vorstufenproteine ab und verhindert deren Aggregation im Intermembranraum (Curran, 2002; Webb, 2006). Durch entkoppeln des mitochondrialen Membranpotentials kann das Vorstufenprotein eines Metabolit-Translokators an der Insertion in die Innenmembran gehindert werden. Es akkumuliert, wie im Falle des AAC, als Stufe-III-Intermediat in der TOM-Pore, gebunden an den Tim9/Tim10-Komplex oder, wie im Falle des DIC-Proteins gezeigt werden konnte, als lösliches Stufe-III-Intermediat im Komplex mit Tim9 und Tim10 im Intermembranraum (Endres, 1999; Zara, 2001). Die Interaktion des AAC mit Tim9 bzw. Tim10 konnte von Endres *et al.* (1999) in einem Importexperiment direkt nachgewiesen werden, indem zunächst durch Zerstörung des Membranpotentials das Stufe-III-Intermediat erzeugt wurde. Anschließend wurden mit einem chemischen Quervernetzer (MBS) beide Proteine kovalent miteinander verbunden. Das Quervernetzungsprodukt, welches nur bei direkter Interaktion von zwei Proteinen entstehen kann, konnte schließlich mittels Immunfällung unter Verwendung eines Tim9- bzw. Tim10-Antikörpers verifiziert werden. Die gleiche Prozedur sollte nun auch zum Nachweis der Interaktion des DIC mit den kleinen Tim-Proteinen angewandt werden. Durch Wiederholung des Experiments mit dem DIC-Derivat DIC_{ΔCS1/2} sollte überprüft werden, ob die beiden *Carrier Signature* – Motive für die Interaktion mit den kleinen Tim-Proteinen wichtig sind.

Die Vorstufen des ATP/ADP-Translokators, des Dicarboxylat-Translokators und des Derivates DIC_{ΔCS1/2} wurden unter Inkorporation von ³⁵S-Methionin in Retikulozytenlysat hergestellt. Anschließend wurde ein 20-minütiger Import mit jeweils zwei parallelen Ansätzen (mit und ohne anschließender Quervernetzung) in isolierte Mitochondrien des Wildtypstammes PK82 durchgeführt. Das Volumen der

Ansätze betrug 100 μ l, mit jeweils 100 μ g isolierte Mitochondrien, 15% [v/v] Retikulozytenlysat und 20 mM Kaliumphosphat in P80-Puffer. Zuvor wurde das Membranpotential ($\Delta\Psi$) der Mitochondrien durch Inkubation mit 1 μ M Valinomycin zerstört, um die importierten Vorstufenproteine auf Stufe-III des Translokationsvorganges zu akkumulieren. Nach dem Importvorgang wurden die Mitochondrien abzentrifugiert in 150 μ l HS-Puffer (0,6 M Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH pH7,4) resuspendiert und für 30 min mit 1 mM MBS (in DMSO) oder nur mit DMSO auf Eis inkubiert. Durch Zugabe von 0,1 M Glycin und Inkubation für weitere 15 min auf Eis wurde die Quervernetzungsreaktion gestoppt. Schliesslich wurden die Mitochondrien abzentrifugiert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Die Quervernetzungsprodukte wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und das Experiment mit Autoradiographie ausgewertet.

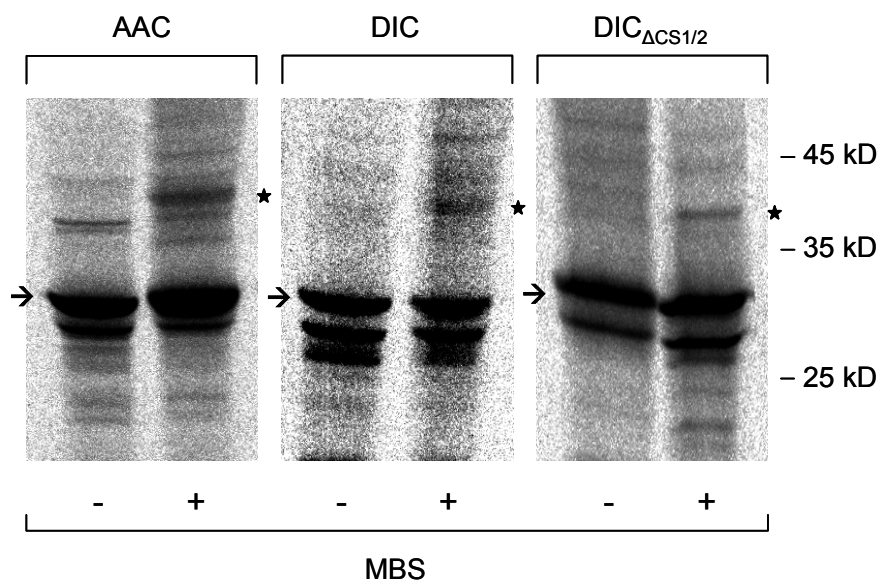


Abb. 3.2.3.1.: Import von AAC, DIC und DIC Δ CS1/2 in Abwesenheit des mitochondrialen Membranpotentials mit anschließender Quervernetzung. Die auf Stufe-III akkumulierten Vorstufenproteine des AAC, DIC und DIC Δ CS1/2 (siehe Pfeile) wurden mit dem Quervernetzungsreagenz MBS inkubiert (+MBS). Als Kontrolle wurden identische Ansätze ohne MBS mitgeführt (-MBS), um Translationsprodukte des Retikulozytenlysats von Quervernetzungsprodukten unterscheiden zu können. Durch die Einwirkung des Quervernetzers neu aufgetretene Proteinbanden, welche ein Quervernetzungsprodukt mit den kleinen Tim-Proteinen Tim9 oder Tim10 darstellen könnten, wurden mit einem Stern kenntlich gemacht.

Das hier angewandte Protokoll zur Quervernetzung des AAC an die kleinen Tim-Proteine entstammt der Publikation von Endres *et al.* (1999). Wie in Abb. 3.2.3.1. zu sehen, konnte auch in der vorliegenden Arbeit für den AAC ein deutliches

Quervernetzungsprodukt mit einer Größe von etwa 40 kD identifiziert werden (siehe AAC, +MBS, Stern), welches exakt der Größe von AAC (~30 kD) mit einem Tim9- oder Tim10-Monomer (~10 kD) entspricht. Sowohl bei DIC, als auch beim Derivat $DIC_{\Delta CS1/2}$, welches keine funktionelle CS mehr aufweist, konnte ein Quervernetzungsprodukt auf vergleichbarer Höhe mit dem Quervernetzungsprodukt des AAC identifiziert werden. Die Entstehung dieses Quervernetzungsprodukts scheint demnach unabhängig von dem Vorhandensein einer *Carrier Signature* zu geschehen.

Im nächsten Experiment sollte exemplarisch mit dem AAC nachgewiesen werden, dass es sich beim festgestellten Quervernetzungsprodukt tatsächlich um ein kovalent mit dem AAC verbundenes Tim9- bzw. Tim10-Monomer handelt. Hierfür wurde die Quervernetzungsprozedur nach dem bisherigen Protokoll wiederholt, doch diesmal zwei weitere Ansätze mitgeführt, welche nach der Quervernetzungsreaktion für eine Immunfällung gegen das Tim10-Protein verwendet worden sind. Die Mitochondrien wurden zu diesem Zweck nach der Importreaktion in 60 μ l Lysepuffer resuspendiert (1% [w/v] SDS, 2 mM PMSF, 100 mM Tris/HCl pH7,4) und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurden die Ansätze für 3 min bei 95°C erhitzt, um die Proteine zu denaturieren und nicht kovalent miteinander verbundene Proteine voneinander zu trennen. Anschließend wurden die Ansätze auf das 20-fache Volumen mit Waschpuffer (0,5% [v/v] Triton X-100 in TBS-Puffer) verdünnt und mit 1 mM EDTA und 1 mM PMSF ergänzt. Unlösliche Proteinaggregate wurden durch Zentrifugation abgetrennt und die Überstände für die Durchführung der Immunfällung verwendet. Die Immunfällung wurde mit einer Methode der Firma Miltenyi Biotech durchgeführt, welche eine Aufreinigung von IgG-Antikörpern über Protein A – überzogene Magnetkügelchen (μ MACS™ Protein A MicroBeads) und einen starken Magneten (μ MACS™ separator) mit speziellen Filtern (μ Columns™) ermöglicht. Ein α Tim10-Serum aus Kaninchen wurde von Prof. Dr. Pfanner (Uni Freiburg) zur Verfügung gestellt. Die Überstände wurden mit jeweils 100 μ l Protein A MicroBeads und 8 μ l α Tim10- bzw. Präimmunserum aus Kaninchen ergänzt und für 45 min auf Eis inkubiert. Hierbei werden mögliche AAC-Tim10-Quervernetzungsprodukte von den α Tim10-Antikörpern abgefangen und gemeinsam mit den Antikörpern an die Protein A MicroBeads gebunden. Da die beiden Proteine Tim9 und Tim9 eine hohe Homologie aufweisen, werden auch AAC-Tim9-Quervernetzungsprodukte von den

α Tim10-Antikörpern erkannt und an Protein A MicroBeads gebunden. Die μ Columns-Filter wurden in hierfür vorgesehene Einsätze des Magneten platziert und zunächst mit 200 μ l Waschpuffer equilibriert. Der Durchfluss wurde verworfen und anschließend die Ansätze der Immunfällung auf die μ Columns-Filter gegeben. Der Durchfluss wurde erneut verworfen und im Filter unspezifisch gebundene Proteine mit 800 μ l Waschpuffer herausgewaschen. Schließlich wurden die im Filter über die magnetischen Eigenschaften der Protein A MicroBeads gebundenen Antikörper durch Zugabe von 20 μ l heißem SDS-Probenpuffer und Inkubation für 5 min eluiert und das Eluat in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Es folgte eine zweite Elution mit 50 μ l heißem SDS-Probenpuffer. Beide Elutionen wurden vereinigt und anschließend eine SDS-PAGE zur Auftrennung der während der gesamten Prozedur an die α Tim10-Antikörper gebundenen Proteine durchgeführt. Das SDS-Gel wurde zur Detektion von möglichen AAC-Tim10-Quervernetzungsprodukten autoradiographisch ausgewertet.

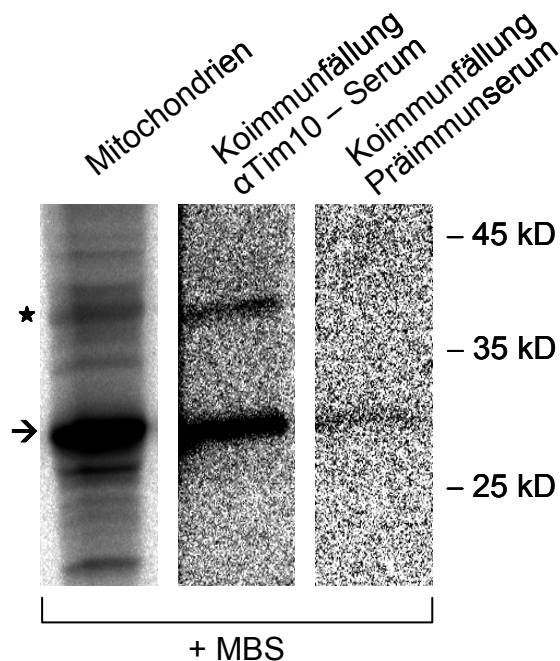


Abb. 3.2.3.2.: Immunfällung mit α Tim10-Antikörpern nach Import von AAC in isolierte Hefemitochondrien und anschließender Quervernetzung mit MBS. In drei Parallelansätzen wurde auf Stufe-III akkumuliertes AAC-Vorstufenprotein (siehe Pfeil) mit dem Quervernetzungsreagenz MBS inkubiert (+MBS). Durch die Einwirkung des Quervernetzers neu aufgetretene Proteinbanden, welche ein Quervernetzungsprodukt mit den kleinen Tim-Proteinen Tim9 oder Tim10 darstellen könnten, wurden mit einem Stern kenntlich gemacht.

In der Tat handelt es sich bei dem in Abb. 3.2.3.1. und 3.2.3.2. gezeigten Quervernetzungsprodukt des AAC (siehe Stern), um kovalent mit MBS miteinander verbundene Tim9- bzw. Tim10-AAC-Moleküle. Dies konnte mit einer Immunfällung unter Verwendung von α Tim10-Antikörpern, welche aufgrund der hohen Homologie sowohl Tim10 als auch Tim9 erkennen, nachgewiesen werden. Exakt auf der selben Höhe, bei der das Quervernetzungsprodukt des AAC zu sehen ist (Teilabbildung links, siehe Stern), migriert ein nur mit α Tim10-Serum und nicht mit Präimmunserum abgefangenes Protein (Teilabbildung mitte, siehe obere Bande bzw. Teilabbildung rechts). Zusätzlich kann auch eine unspezifische Immunfällung des nicht quervernetzten AAC (siehe Pfeil) sowohl mit α Tim10-Serum als auch mit Präimmunserum beobachtet werden (Teilabbildung mitte, siehe untere Bande bzw. Teilabbildung rechts).

Für das in Abb. 3.2.3.2. gezeigte Quervernetzungsprodukt des AAC konnte gezeigt werden, dass es sich um kovalent miteinander quervernetzte AAC-Tim9- bzw. Tim10-Moleküle handelt. Es kann mit hoher Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass die in Abb. 3.2.3.1. beobachtete Quervernetzungsbande des DIC und des Derivates DIC _{Δ CS1/2}, welche eine zur Quervernetzungsbande des AAC identische Größe aufweist, ebenfalls ein Quervernetzungsprodukt mit Tim9 bzw. Tim10 darstellt. Der direkte Beweis konnte bisher nicht erbracht werden. Die in diesem Abschnitt dargestellten Daten deuten stark darauf hin, dass selbst das DIC-Derivat, welches keine funktionelle *Carrier Signature* mehr aufweist, in der Lage ist, ein Stufe-III-Intermediat in der Intermembran zu bilden.

Im nächsten Abschnitt soll nun der Frage nachgegangen werden, ob die *Carrier Signature* an der Insertion des Dicarboxylat-Translokators in die Innenmembran der Mitochondrien beteiligt ist.

3.2.4. Die *Carrier Signature* stimuliert die Insertion des Dicarboxylat-Translokators in die mitochondriale Innenmembran

Die *Carrier Signature* des Dicarboxylat-Translokators wird nicht für die Erkennung von Importrezeptoren an der Außenmembran der Mitochondrien benötigt. Das DIC-Protein ist auch in Abwesenheit seiner beiden CS-Motive in der Lage, effizient über die äußere, mitochondriale Membran zu translozieren. Außerdem ist die *Carrier*

Signature nicht erforderlich zur Anbindung an den Tim9/Tim10-Komplex des Intermembranraums. Es ist jedoch denkbar, dass die *Carrier Signature* an der Insertion der Metabolit-Translokatoren in die mitochondriale Innenmembran beteiligt ist. Die konservierten Motive könnten als Erkennungsmerkmale für den TIM22-Komplex der Innenmembran dienen. Wird die Insertion des Dicarboxylat-Translokators in die mitochondriale Innenmembran durch die Zerstörung des Membranpotentials unterbunden, so akkumuliert das DIC-Protein im Intermembranraum, gebunden an die kleinen Chaperonproteine Tim9 und Tim10 (Zara, 2001). Ein identisches Verhalten wäre bei den DIC-Derivaten DIC Δ CS1, DIC Δ CS2 und DIC Δ CS1/2 zu erwarten, falls die Membraninsertion des DIC-Proteins von der *Carrier Signature* abhängig ist, da in den Abschnitten 3.2.2. und 3.2.3. gezeigt werden konnte, dass die *Carrier Signature* bis zur Stufe-III des Translokationsvorganges in Mitochondrien nicht notwendig ist.

Im nächsten Experiment sollte nun die Rolle der *Carrier Signature* bei der Insertion des DIC-Proteins in die mitochondriale Innenmembran untersucht werden. Die Insertion eines DIC-Derivates mit nur einer funktionellen CS im ersten Modul (DIC Δ CS2) und eines Derivates, welches keine CS mehr besitzt (DIC Δ CS1/2), sollte mit dem Insertionsverhalten von wildtypischem DIC verglichen werden. Hierzu wurden die drei Proteine zunächst unter Verwendung von 35 S-Methionin in Retikulozytenlysat hergestellt und anschließend in einem Sammelansatz für 10 min bei 25°C mit isolierten Mitochondrien des Hefewildtypstammes PK82 inkubiert. Der Sammelansatz wurde auf drei weitere Ansätze verteilt. Ein Ansatz wurde auf das 10-fache Volumen mit hypotonischem EM-Puffer verdünnt und für 10 min auf Eis inkubiert, um das Schwellen der Mitochondrien hervorzurufen. Die beiden anderen Ansätze wurden mit isotonischem SEM-Puffer verdünnt, um das Schwellen der Mitochondrien zu verhindern und ebenfalls auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz mit den geschwollenen Mitochondrien, sowie einer der beiden Ansätze mit nicht geschwollenen Mitochondrien für 20 min mit Proteinase K (250 µg/ml) auf Eis inkubiert. Der unbehandelte Ansatz wurde weiterhin auf Eis gehalten. Nach Hemmung der Proteinase K durch Zugabe von PMSF, wurden die Mitochondrien bzw. Mitoplasten durch Zentrifugation reisoliert, in SEM-Puffer gewaschen, erneut reisoliert und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert (Western Blot). Mit einem polyklonalen Antikörper gegen das endogene AAC-Protein wurde die Effizienz des

Schwellens und die Integrität der Außenmembran der verwendeten Mitochondrien überprüft. In geschwollenen Mitochondrien sind die im Intermembranraum exponierten Termini des AAC für Proteinase K zugänglich. Der mit Antikörpern detektierte AAC hat dadurch in Ansätzen, in denen zuvor Mitoplasten erzeugt worden sind, ein sichtbar kleineres Molekulargewicht. Nach dem Antikörpernachweis wurde die Membran auf einem Phosphorimager-Film exponiert und die radioaktiv markierten Proteine durch Autoradiographie detektiert.

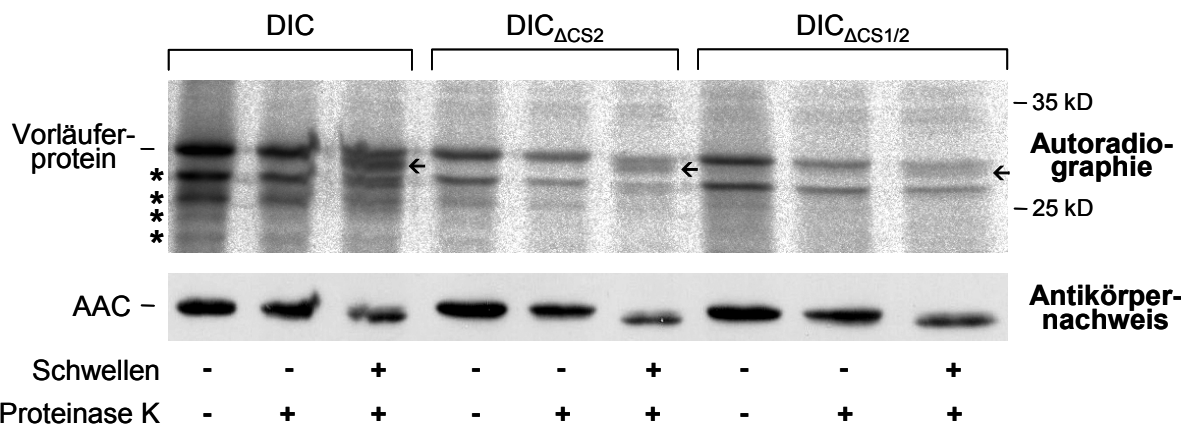


Abb. 3.2.4.1.: Import von DIC, DIC Δ CS2 und DIC Δ CS1/2 in isolierte Mitochondrien aus dem Hefewildtypstamm PK82 mit anschließendem Schwellen. Das Ergebnis der Autoradiographie ist im oberen Teil der Abbildung dargestellt. Der Antikörpernachweis wurde im unteren Abschnitt dargestellt. Proteolytische Fragmente von DIC und den beiden Derivaten DIC Δ CS2 und DIC Δ CS1/2 wurden durch Pfeile kenntlich gemacht. Unspezifische Translationsprodukte des Retikulozytenlysates wurden mit einem Stern angedeutet. Der AAC-Antikörpernachweis bestätigt, dass die verwendeten Mitochondrien eine intakte Außenmembran aufweisen (-Schwellen, +Proteinase K) und dass effizient Mitoplasten erzeugt werden konnten (+Schwellen, +Proteinase K).

Das in Abb. 3.2.4.1. gezeigte Experiment belegt, dass das DIC-Protein, trotz des Verlustes von einem oder beiden *Carrier Signature* – Motiven, in der Lage ist, in die mitochondriale Innenmembran zu inserieren. In den Ansätzen mit geschwollenen Mitochondrien (+Schwellen, +Proteinase K) konnte sowohl bei DIC Δ CS2 als auch bei DIC Δ CS1/2 ein signifikanter Anteil an Protease-geschütztem DIC-Protein identifiziert werden. Dies deutet auf eine erfolgreiche Insertion in die mitochondriale Innenmembran hin. Die Einwirkung der Proteinase K erzeugt bei Mitoplasten ein zusätzliches DIC-Fragment, welches nur geringfügig kleiner ist (siehe Pfeil). Die beiden Termini des DIC-Proteins, sowie der beiden Derivate DIC Δ CS2 und DIC Δ CS1/2, sind in nicht geschwollenen Mitochondrien vor Proteinase K geschützt (-Schwellen,

+Proteinase K) und erst nach dem Schwellen für die Protease zugänglich (+Schwellen, +Proteinase K). Doch nun sollte die Effizienz der Insertion von DIC und den beiden Derivaten $DIC_{\Delta CS2}$ und $DIC_{\Delta CS1/2}$ miteinander verglichen werden, um festzustellen, ob die *Carrier Signature* den Insertionsprozess des DIC-Proteins beschleunigt.

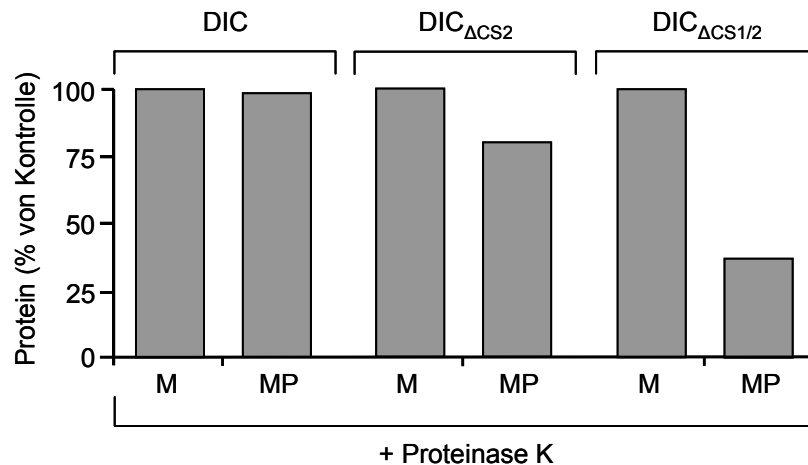


Abb. 3.2.4.2.: Vergleich der Insertionseffizienz von DIC, $DIC_{\Delta CS2}$ und $DIC_{\Delta CS1/2}$ nach Import mit anschließendem Schwellen der Mitochondrien. Der Gesamtimportanteil (M, Mitochondrien) wurde als Kontrolle (100%) definiert und der in der mitochondrialen Innenmembran inserierte DIC-Anteil (MP, Mitoplasten) hierzu in Relation gesetzt und in einem Balkendiagramm dargestellt. Die zur Quantifizierung herangezogenen Proteinbanden entstammen dem SDS-Gel, welches in Abb. 3.2.2.1. gezeigt ist.

Im Vergleich zum wildtypischen DIC-Protein, welches nach der Translokation über die mitochondriale Außenmembran (siehe Abb. 3.2.4.2., DIC, M) sehr effizient (~99%) in die Innenmembran inseriert wird (siehe Abb. 3.2.4.2., DIC, MP), ist die Insertionseffizienz bei $DIC_{\Delta CS2}$ mäßig (~20%) und bei $DIC_{\Delta CS1/2}$ deutlich (~70%) herabgesetzt. Bei noch vorhandener CS im ersten Modul des Dicarboxylat-Translokators verläuft die Insertion noch äußerst effizient. Sind beide CS-Motive nicht mehr vorhanden, kann DIC nicht mehr mit hoher Effizienz in die Innenmembran inseriert werden. Dies weist darauf hin, dass die *Carrier Signature* die Insertion von Metabolit-Translokatoren in die mitochondriale Innenmembran stimulieren kann. Da dennoch ein signifikanter Anteil an DIC-Protein auch in Abwesenheit beider CS in der Lage ist, in die Innenmembran der Mitochondrien zu inserieren, muss davon ausgegangen werden, dass die *Carrier Signature* nicht für die Erkennung des TIM22-Komplexes entwickelt worden ist.

Mit einer anderen Herangehensweise sollte bestätigt werden, dass die beiden Derivate $DIC_{\Delta CS2}$ und $DIC_{\Delta CS1/2}$ im untersuchten Zeitraum, verglichen zum wildtypischem DIC, in geringerem Maße in der Innenmembran anzutreffen sind. Es wurde erneut mit ^{35}S -markiertem DIC, $DIC_{\Delta CS2}$ und $DIC_{\Delta CS1/2}$ ein 10-minütiger Import in isolierte Mitochondrien des Hefestammes YPH499 unter Standardbedingungen durchgeführt. Nicht-importierte Proteine wurden durch Inkubation mit Proteinase K abgebaut. Die Mitochondrien wurden anschließend für 30 min mit Natriumcarbonat auf Eis inkubiert. Die Behandlung der Mitochondrien mit Natriumcarbonat bewirkt, dass lösliche und peripher an Membranen assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen abgetrennt werden. Membranproteine wurden durch Zentrifugation von den in Lösung sich befindenden Proteinen abgetrennt und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach Fällung mit Trichloressigsäure wurden die Proteine des Überstandes abzentrifugiert und ebenfalls in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Nach SDS-PAGE wurde das Experiment autoradiographisch ausgewertet.

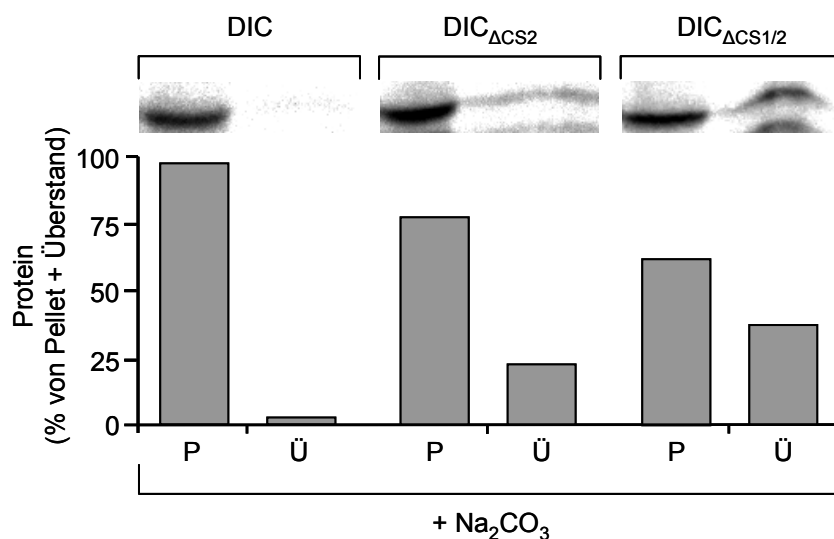


Abb. 3.2.4.3.: Vergleich der Insertionseffizienz von DIC, $DIC_{\Delta CS2}$ und $DIC_{\Delta CS1/2}$ nach Import mit anschließender Natriumcarbonat-Behandlung der Mitochondrien. Nach Import (10 min) von DIC, $DIC_{\Delta CS2}$ und $DIC_{\Delta CS1/2}$ in isolierte Mitochondrien des Wildtyp-Hefestammes YPH499 und Behandlung der Mitochondrien mit Proteinase K und anschließend mit Natriumcarbonat, wurde die durch Zentrifugation gewonnene Membranfraktion (P, Pellet) und die lösliche Fraktion (Ü, Überstand) auf einem SDS-Gel aufgetrennt. Die ^{35}S -markierten Proteine wurden mit einem Phosphorimager detektiert und anschließend die Intensität der Banden quantifiziert und in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Summe des im Pellet und Überstand nachgewiesenen Proteinanteils wurde als 100% definiert.

Auch das in Abb. 3.2.4.3. gezeigte Experiment hat zum Ergebnis, dass das Derivat $DIC_{\Delta CS1/2}$ in geringerem Maße in einer Membran inseriert wird. Während das wildtypische DIC-Protein nahezu ausschließlich in der Membranfraktion (P, Pellet) anzutreffen ist, kann bei $DIC_{\Delta CS1/2}$ ein signifikanter Anteil (~40%) noch im Überstand nachgewiesen werden. Das Derivat $DIC_{\Delta CS2}$ weist verglichen zu $DIC_{\Delta CS1/2}$ eine höhere Insertion in der Membran auf, mit einem geringeren Anteil, der sich in Lösung befindet (~20%). Die in diesem Abschnitt gewonnenen Erkenntnisse sind im Einklang mit den zuvor erzielten Daten des Importexperimentes mit anschließendem Schwellen der Mitochondrien. Der Verlust von einer *Carrier Signature* setzt die Insertionseffizienz des DIC-Proteins in die Innenmembran nur leicht herab, während der Verlust von beiden CS-Motiven eine deutlich verlangsamte Insertion des DIC-Proteins in die Innenmembran der Mitochondrien zur Folge hat.

Im nächsten Abschnitt sollte nun die Rolle der *Carrier Signature* an der Dimerisierung nach der Insertion in die mitochondriale Innenmembran aufgefunden werden.

3.2.5. Die Assemblierung des Dicarboxylat-Translokators zu einem Dimer geschieht unabhängig von der *Carrier Signature*

Die mitochondrialen Metabolit-Translokatoren werden nach Insertion in die mitochondriale Innenmembran zu einem funktionellen Dimer assembliert. Zugleich stellt dieser Zustand die letzte Translokationsstufe von mitochondrialen Metabolit-Translokatoren dar (Stufe V). In vorherigen Studien konnten die einzelnen Translokationsstufen des AAC durch die blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE) charakterisiert werden (Ryan, 1999). Die einzelnen Translokationsintermediate wiesen dabei ein unterschiedliches und klar definiertes Laufverhalten auf. Die dimere Form des AAC konnte im blauen Nativgel, nach Import in Mitochondrien mit intaktem Membranpotential, auf einer Höhe von etwa 100 kD identifiziert werden. Das Stufe V Intermediat des Dicarboxylat-Translokators konnte ebenfalls mit BN-PAGE eindeutig nachgewiesen werden und wies dabei ein dem AAC-Dimer entsprechendes Laufverhalten auf (Zara, 2001).

Da nun gezeigt werden konnte, dass die *Carrier Signature* nicht essentiell für die mitochondriale Zielerkennung und Insertion des Dicarboxylat-Translokators in die Innenmembran ist, sollte letztendlich festgestellt werden, ob eventuell die Bildung

eines DIC-Dimers durch das Fehlen einer oder mehrerer CS-Motive beeinträchtigt wird. Aus diesem Grund wurde ein 20-minütiger Import von ^{35}S -markiertem DIC, $\text{DIC}_{\Delta\text{CS1}}$ und $\text{DIC}_{\Delta\text{CS2}}$ in isolierte Mitochondrien des Wildtypstammes PK82 durchgeführt. Gleichzeitig wurden identische Importansätze mitgeführt, in denen vor der Importreaktion das Membranpotential der Mitochondrien durch Zugabe von Valinomycin zerstört worden ist. Nicht-importierte Proteine wurden durch Inkubation mit Proteinase K abgebaut. Anschließend wurden die Mitochondrien in Lysepuffer (1% [w/v] Digitonin, 20 mM Tris/HCl, 0.1 mM EDTA, 50 mM NaCl, 10 % [v/v] Glycerin, 1.5 mM PMSF, pH 7.0) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse wurden unlösliche Proteinaggregate durch Zentrifugation abgetrennt und die Überstände mit BN-Probenpuffer vermischt. Die Proben wurden schließlich auf einem 6 – 20%igem blauen Nativgel aufgetragen und die Protein-komplexe aufgetrennt. Das Ergebnis der BN-PAGE wurde durch Autoradiographie ausgewertet.

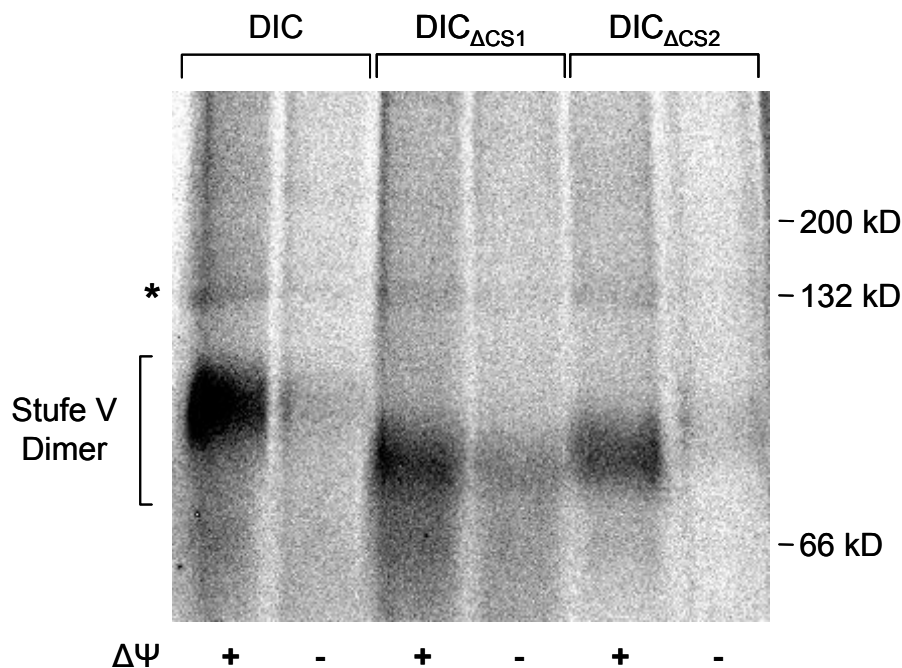


Abb. 3.2.5.1.: Import von DIC, $\text{DIC}_{\Delta\text{CS1}}$ und $\text{DIC}_{\Delta\text{CS2}}$ in isolierte Hefemitochondrien des Wildtyps PK82 mit anschließender BN-PAGE. Wildtypisches DIC-Protein, sowie die beiden Derivate $\text{DIC}_{\Delta\text{CS1}}$ und $\text{DIC}_{\Delta\text{CS2}}$, wurde in Gegenwart und in Abwesenheit des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) in isolierte Mitochondrien des Wildtypstammes PK82 importiert. Nicht-importierte Proteine wurden mit Proteinase K abgebaut. Die Mitochondrien wurden in Digitonin-haltigem Lysepuffer resuspendiert, um Membranproteine zu solubilisieren. Die Auftrennung der Proteinkomplexe erfolgte auf einem 6-20%igem blauen Nativgel. Durch Autoradiographie wurden die DIC-spezifischen Proteinkomplexe sichtbar gemacht. Unspezifische Proteinbanden wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Es konnte das Stufe V – Intermediat des Dicarboxylat-Translokators erfolgreich mit BN-PAGE nachgewiesen werden (DIC, $+\Delta\Psi$). Wie zu erwarten, wird in Abwesenheit des mitochondrialen Membranpotentials kein Dimer beobachtet (DIC, $-\Delta\Psi$). Für die beiden DIC-Derivate DIC $_{\Delta CS1}$ und DIC $_{\Delta CS2}$ konnte auf nahezu gleicher Höhe mit dem DIC-Dimer ebenfalls ein Proteinkomplex identifiziert werden, welches nur in Gegenwart des mitochondrialen Membranpotentials entsteht (DIC $_{\Delta CS1}$ und DIC $_{\Delta CS2}$, $+\Delta\Psi$ versus $-\Delta\Psi$). Offensichtlich hat der Verlust der *Carrier Signature* im ersten oder dritten Modul des Dicarboxylat-Translokators keine Auswirkung auf die Dimerisierung in der mitochondrialen Innenmembran. Der minimale Unterschied im Laufverhalten der beiden Dimere der Derivate DIC $_{\Delta CS1}$ und DIC $_{\Delta CS2}$ im Vergleich zum Dimer des wildtypischen DIC-Proteins lässt aber vermuten, dass die in der Innenmembran eingenommene Konformation der beiden DIC-Derivate durch den Verlust einer *Carrier Signature* beeinträchtigt wird.

Zunächst sollte am Beispiel des DIC-Derivats DIC $_{\Delta CS1}$ nachgewiesen werden, dass das vermutete Stufe V – Intermediat einen Proteinkomplex bestehend aus DIC-Monomeren darstellt. Hierfür wurde das Experiment, welches in Abb. 3.2.5.1. gezeigt ist, mit DIC $_{\Delta CS1}$ wiederholt und nach Durchführung der BN-PAGE die beiden Spuren $+\Delta\Psi$ bzw. $-\Delta\Psi$ für eine 2D-PAGE herangezogen. In der zweiten Dimension (SDS-PAGE) sollten dann die Proteine aufgetrennt und anschließend die ^{35}S -markierten DIC-Proteine autoradiographisch detektiert werden.

Das in Abb. 3.2.5.1. vermutete Stufe V – Intermediat des Derivates DIC $_{\Delta CS1}$ weist, verglichen mit dem Dimer des wildtypischen Dicarboxylat-Translokators, eine leicht unterschiedliche Laufeigenschaft auf dem blauen Nativgel auf. Es ist daher nicht auszuschließen, dass es sich hierbei um eine Artefakt-Bande, entstanden durch unspezifische Translationsprodukte des Lysats, handelt. Mittels 2D-PAGE (siehe Abb. 3.2.5.2.) konnte aber nun verifiziert werden, dass der Proteinkomplex tatsächlich das spezifische DIC $_{\Delta CS1}$ -Derivat enthält ($+\Delta\Psi$, mit Pfeil angedeuteter Bereich). In Abwesenheit des mitochondrialen Membranpotentials ist die Insertion und somit Dimerisierung in der Innenmembran unterbunden und somit auch auf der Höhe des Stufe V – Intermediates in der zweiten Dimension (SDS-PAGE) kaum DIC-Protein zu beobachten ($-\Delta\Psi$, mit Pfeil angedeuteter Bereich).

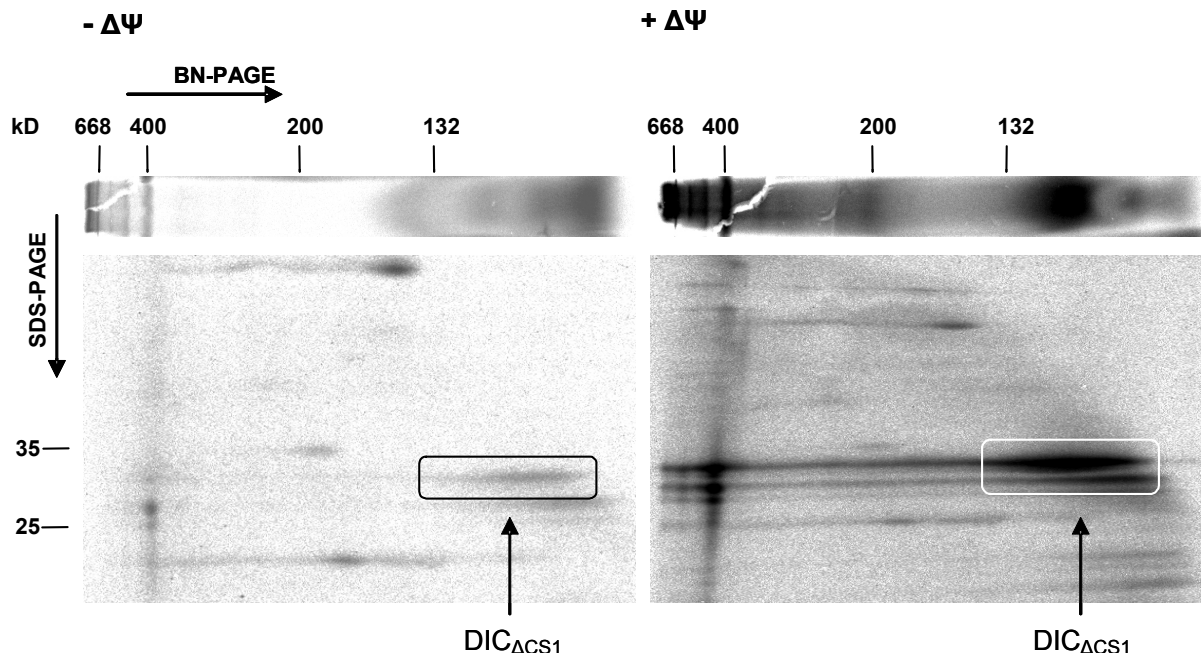


Abb. 3.2.5.2.: BN-PAGE von $DIC_{\Delta CS1}$ mit anschließender Auftrennung der Proteinkomplexe durch SDS-PAGE (2D-PAGE). Das Derivat $DIC_{\Delta CS1}$ wurde in Gegenwart und in Abwesenheit des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi$) in isolierte Hefemitochondrien importiert und anschließend die Mitochondrien mit Digitonin lysiert. Zunächst wurden die Proteinkomplexe durch BN-PAGE aufgetrennt. Im nächsten Schritt wurde ein die Spur von Interesse korrespondierender Gelstreifen des blauen Nativgels vertikal in ein SDS-Polyacrylamidgel eingespannt und durch SDS-PAGE die Proteinbestandteile der Proteinkomplexe nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Auswertung erfolgte durch Autoradiographie an einem Phosphorimager.

Offensichtlich hat der Verlust einer einzelnen *Carrier Signature* keine generelle Folgen für die Dimerisierung des Dicarboxylat-Translokators in der Innenmembran der Mitochondrien. Aus diesem Grund sollte nun die Dimerisierung des DIC-Derivates untersucht werden, welches keine *Carrier Signature* mehr aufweist. ^{35}S -markiertes $DIC_{\Delta CS1/2}$, sowie wildtypisches DIC-Protein, wurde wie zuvor in An- und Abwesenheit des mitochondrialen Membranpotentials in Hefemitochondrien (Wildtyp PK82) importiert und diesmal Parallelansätze mitgeführt, in denen anschließend, durch Inkubation der Mitochondrien in hypotonischem Puffer, Mitoplasten erzeugt worden sind. Alle Ansätze wurden schließlich mit Proteinase K behandelt, um nicht-importierte Proteine, sowie nach dem Schwellen zugängliche Proteine, abzubauen.

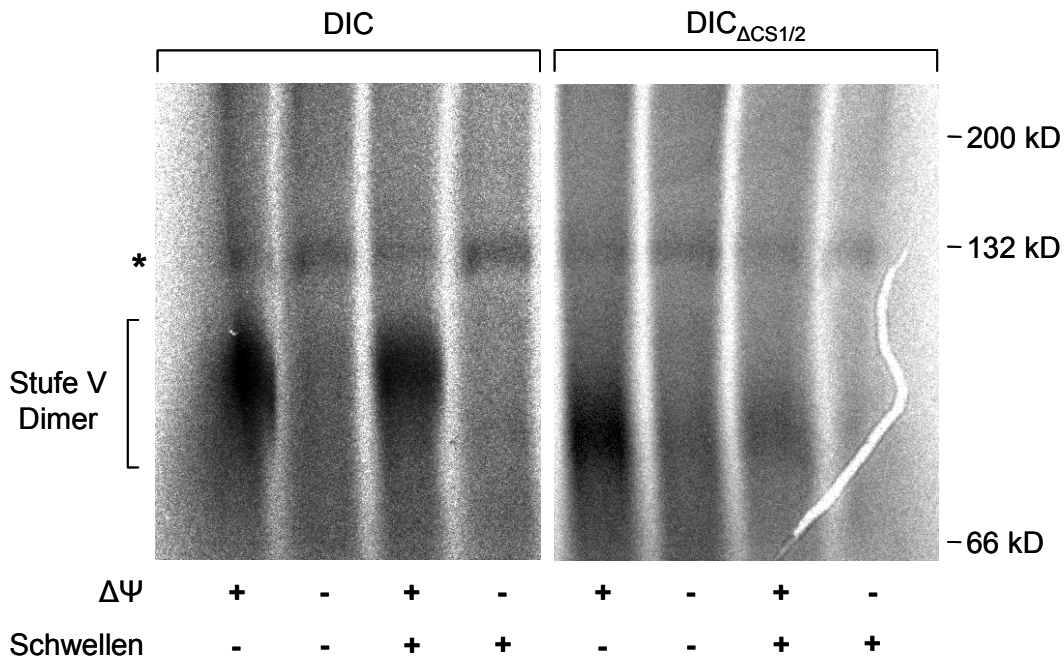


Abb. 3.2.5.3.: Import von DIC_{ΔCS1/2} in isolierte Hefemitochondrien mit anschließender BN-PAGE.

Die beiden Proteine DIC und DIC_{ΔCS1/2} wurden in Gegenwart (+ $\Delta\Psi$) und in Abwesenheit (- $\Delta\Psi$) des mitochondrialen Membranpotentials in isolierte Hefemitochondrien (PK82) importiert. Mitochondrien aus identischen Parallelansätzen wurden danach in Mitoplasten umgewandelt (+Schwellen). Nach Inkubation mit Proteinase K wurden die Mitochondrien bzw. Mitoplasten in Digitonin-haltigem Lysepuffer resuspendiert. Nach der Lyse wurden die solubilisierten Proteinkomplexe auf einem 6-20%igem blauen Nativgel aufgetrennt. Durch Autoradiographie wurden die DIC-spezifischen Proteinkomplexe sichtbar gemacht. Unspezifische Proteinbanden wurden mit einem Stern gekennzeichnet.

Das in Abbildung 3.2.5.3. gezeigte Experiment weist ebenfalls darauf hin, dass die *Carrier Signature* keinen Einfluss auf die Dimerisierung des Dicarboxylat-Translokators in der Innenmembran nimmt. Selbst wenn, wie im Falle des DIC-Derivates DIC_{ΔCS1/2}, beide CS-Motive abwesend sind, kann die Dimerisierung zur Endstufe V des Translokationsprozesses erfolgen (DIC_{ΔCS1/2}, + $\Delta\Psi$, -Schwellen). Auch hier weist die dimere Form des DIC-Derivates ein unterschiedliches Laufverhalten im Vergleich zum wildtypischen DIC-Dimer (DIC, + $\Delta\Psi$, -Schwellen) auf. Identische Versuchsansätze, bei denen die Außenmembran der Mitochondrien nach der Importreaktion durch Schwellen destabilisiert worden ist, sollten Hinweise auf die Protease-Stabilität des vermuteten Dimers des Derivates DIC_{ΔCS1/2} geben. Hier konnte ein eindeutiger Unterschied zwischen wildtypischem DIC und dem DIC-Derivat, dessen beide CS-Motive fehlen, festgestellt werden. Das wildtypische DIC-Dimer kann nach Schwellen der Mitochondrien weiterhin nicht durch Proteinase K

abgebaut werden und demonstriert somit eine weitgehend vollständige Insertion in der Innenmembran (DIC, $+\Delta\Psi$, +Schwellen). Das Dimer des Derivates $\text{DIC}_{\Delta\text{CS}1/2}$ hingegen wird nach Schwellen und Inkubation der Mitoplasten mit Proteinase K fast vollständig abgebaut ($\text{DIC}_{\Delta\text{CS}1/2}$, $+\Delta\Psi$, +Schwellen). Offensichtlich ist die in der mitochondrialen Innenmembran eingenommene Konformation des DIC-Derivates $\text{DIC}_{\Delta\text{CS}1/2}$ derart unvorteilhaft, sodass größere Aminosäurebereiche außerhalb der Membran exponiert und für Proteinase K zugänglich sind. Die beiden *Carrier Signature* – Motive des Dicarboxylat-Translokators werden demnach nicht für Insertion und Dimerisierung in der mitochondrialen Innenmembran benötigt, sind jedoch essentiell für die Aufrechterhaltung einer stabilen Konformation.

Abschließend sollte mit einem weiteren Experiment bestätigt werden, dass die *Carrier Signature* nicht an der Dimerisierung des Dicarboxylat-Translokators beteiligt ist. In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass nur die vollständig assemblierte, funktionelle Form des ATP/ADP-Translokators durch Hydroxyapatit-Säulchen wandern kann, während Assemblierungsvorstufen in der Säule verbleiben (Schleyer & Neupert, 1984). Mit einem identischen Protokoll sollte das DIC-Dimer aufgereinigt und zugleich das Experiment mit dem Derivat $\text{DIC}_{\Delta\text{CS}1/2}$ durchgeführt werden. ^{35}S -markiertes DIC- bzw. $\text{DIC}_{\Delta\text{CS}1/2}$ -Protein wurde für 15 min unter Standardbedingungen mit isolierten Mitochondrien des Hefewildtypstammes PK82 inkubiert. Das Membranpotential von Mitochondrien aus identischen Parallelansätzen wurde zuvor mit Valinomycin zerstört. Nach der Importreaktion wurden nicht-importierte Proteine mit Proteinase K abgebaut und die Mitochondrien nach einem Waschschrift in SEM – Puffer in High Triton – Puffer (2.5% [v/v] Triton X-100, 110 mM NaCl, 20 mM MOPS-KOH pH 7.2, 5 mg/ml Cardiolipin) lysiert. Nach der Lyse wurden unlösliche Proteinaggregate abzentrifugiert und der Überstand auf ein Hydroxyapatit-Säulchen gegeben, welches zuvor mit Low Triton – Puffer (0.5% [v/v] Triton X-100, 50 mM NaCl, 10 mM MOPS-KOH pH7.2) equilibriert worden ist. Durch Zugabe von Low Triton – Puffer wurden alle nicht-gebundenen Proteine aus der Säule eluiert. Die Proteine des Eluats wurden mit Trichloressigsäure gefällt und in SDS-Probenpuffer aufgenommen. Anschließend wurden die Proben auf einem SDS-Gel aufgetrennt und die eluierten DIC-Proteine durch Autoradiographie detektiert.

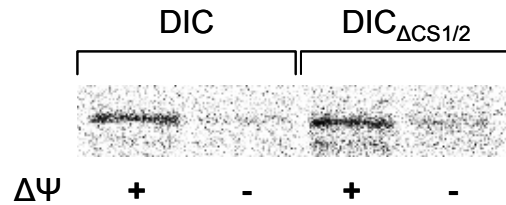


Abb. 3.2.5.4.: Import von DIC bzw. DIC_{ΔCS1/2} in isolierte Hefemitochondrien mit anschließender Aufreinigung des Stufe V – Intermediats über eine Hydroxyapatit-Säule. Die beiden Proteine DIC und DIC_{ΔCS1/2} wurden in Gegenwart (+ΔΨ) und in Abwesenheit (-ΔΨ) des mitochondrialen Membranpotentials in isolierte Mitochondrien des Wildtyps PK82 importiert. Nach Inkubation mit Proteinase K wurden die Mitochondrien in High Triton – Puffer lysiert. Lösliche und solubilisierete Proteine wurden auf eine Hydroxyapatit-Säule gegeben. Mittels Low Triton – Puffer wurden die ungebundenen Proteine eluiert und mit SDS-PAGE und Autoradiographie nachgewiesen.

Die Aufreinigung der dimeren Form des Dicarboxylat-Translokators konnte anhand eines Protokolls, welches für den ATP/ADP-Translokator entwickelt worden ist, erfolgreich durchgeführt werden. Das DIC-Protein konnte nach Lyse der Mitochondrien nur dann aus Hydroxyapatit-Säulchen eluiert werden, wenn während der Durchführung des vorangegangenen *in vitro* Importes das Membranpotential der Mitochondrien intakt war (DIC, +ΔΨ). In Mitochondrien ohne Membranpotential ist die Assemblierung des DIC-Proteins zu einem Dimer unterbunden. Die Translokations- und Assemblierungsintermediate verbleiben nach Lyse der Mitochondrien in der Hydroxyapatit-Säule und können nicht eluiert werden (DIC, -ΔΨ). Ein identisches Verhalten konnte auch bei dem Derivat DIC_{ΔCS1/2} beobachtet werden (DIC_{ΔCS1/2}, +ΔΨ bzw. -ΔΨ). Es ist somit erneut bestätigt worden, dass das DIC-Derivat, welches keine funktionelle *Carrier Signature* mehr aufweist, dennoch in der Lage ist, in die Innenmembran inseriert und zu einem funktionellen Dimer assembliert zu werden.

Die *Carrier Signature* des Dicarboxylat-Translokators erweist sich im Allgemeinen als nicht zwingend notwendig für die mitochondriale Zielerkennung und Biogenese. Es ist daher anzunehmen, dass die in Metabolit-Translokatoren mehrfach vorkommenden, hochkonservierten Motive für die Aufrechterhaltung der Transportaktivität von mitochondrialen Metabolit-Translokatoren von Bedeutung sein könnten.

3.2.6. Die *Carrier Signature* ist essentiell für die Aufrechterhaltung der Transportaktivität des Dicarboxylat-Translokators

Bisher konnte keine obligate Beteiligung der *Carrier Signature* an der mitochondrialen Zielerkennung, dem Translokationsprozess, sowie der Biogenese des Dicarboxylat-Translokators festgestellt werden. Es konnte jedoch beobachtet werden, dass die DIC-Derivate, in welche mindestens ein CS-Motiv durch neutrale Aminosäuren substituiert worden ist, dessen dimere Form innerhalb der Innenmembran vermutlich eine nicht-native Konformation annimmt. Dafür spricht das im Vergleich zum wildtypischem DIC-Dimer leicht unterschiedliche Laufverhalten der dimeren Form der DIC-Derivate nach BN-PAGE. Außerdem konnte für das Dimer des Derivates DIC_{ΔCS1/2} gezeigt werden, dass die in der Membran eingenommene Konformation nicht resistent gegenüber Protease-Degradation ist. Dies kann als weiteres Indiz bewertet werden, dass der Verlust der *Carrier Signature* – Motive eine andersartige Konformation des Dicarboxylat-Translokators in der Membran zur Folge hat. Es ist zu erwarten, dass die strukturellen Veränderungen einen Verlust der Transportfunktion der DIC-Derivate zur Folge haben. Dies sollte in diesem Abschnitt untersucht werden. Die DNA-Sequenz der drei Derivate DIC_{ΔCS1}, DIC_{ΔCS2}, DIC_{ΔCS1/2} und des wildtypischen DIC wurde zu diesem Zweck in den Vektor pET28a (Novagen) kloniert, um für nachfolgende Untersuchungen die Proteine in einem bakteriellen Expressionssystem in größeren Mengen herzustellen. In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Vincenzo Zara (Universität Lecce, Italien) sollte nach Rekonstitution der gereinigten Proteine in künstliche Membranvesikel die Transportaktivität der DIC-Derivate gemessen werden.

Zunächst sollte ein geeignetes System zur Expression des wildtypischen Dicarboxylat-Translokators gewählt werden. Das Protokoll sollte dann als Anleitung für die Expression weiterer DIC-Derivate verwendet werden. Auf der Basis von Angaben in den Publikationen von Miroux & Walker (1996), Palmieri *et al.* (1996) und Kakhniashvili *et al.* (1997), in denen unter anderem die bakterielle Expression des aus *Saccharomyces cerevisiae* isolierten DIC-Gens beschrieben wird, wurde in der vorliegenden Arbeit der *Escherichia coli* – Stamm C41 (DE3) für die Expression des DIC verwendet. Zunächst wurden Zellen des Expressionsstammes kompetent gemacht und das pET28a/DIC – Plasmid darin transformiert. Mit Transformanten wurde zunächst eine Vorkultur angeimpft und hiermit ein größeres Volumen LB –

Medium zur Anzucht der *E. coli* – Zellen überimpft. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer optischen Dichte (600nm) von 0,5 geschüttelt und anschließend durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 1 mM) und Inkubation für weitere 16 h bei 37°C die Genexpression induziert. Der Dicarboxylat-Translokator stellt ein Membranprotein dar und neigt durch dessen hydrophobe Aminosäureabschnitte bei Überexpression zur Aggregation und Bildung von so genannten *inclusion bodies* (Palmieri, 1996; Kakhniashvili, 1997). Zur Aufreinigung des DIC-Proteins wurden zunächst die DIC-exprimierenden Zellen durch Zentrifugation geerntet, in Lösung I (50 mM Tris/HCl pH8, 25% [w/v] Saccharose, 1 mg/ml Lysozym) resuspendiert und für 75 min bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach Zugabe von 25 mM EDTA und 2% [v/v] Triton X-100 wurden die Zellen durch Ultraschallbehandlung (duty cycle 50%, output limit 3, 2x15 Pulse) aufgeschlossen. Das DIC-Protein konnte durch Ansammlung der *inclusion bodies* durch Zentrifugation bei 39200 g für 30 min aus dem Zellaufschluss abgetrennt werden. Anschließend wurden zur Aufreinigung des DIC-Proteins die *inclusion bodies* zunächst in Lösung II (100 mM Tris/HCl pH8, 6% [w/v] Harnstoff, 1% [v/v] Triton X-100, 0.1% [v/v] Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) aufgenommen und erneut wie zuvor mit Ultraschall behandelt und danach zentrifugiert. Die *inclusion bodies* wurden nun mit dreimaliger Wiederholung dieser Prozedur in Lösung III (100 mM Tris/HCl pH8, 6% [w/v] Harnstoff, 0.1% [v/v] Mercaptoethanol, 1 mM PMSF) resuspendiert, danach wie in den vorherigen Schritten mit Ultraschall behandelt und anschließend abzentrifugiert. Schließlich wurden die *inclusion bodies* in Lösung IV (100 mM Tris/HCl pH8, 42% [w/v] Harnstoff) resuspendiert. Proben wurden zu jeder Stufe der Aufreinigung entnommen, um anschließend durch SDS-PAGE und Antikörpernachweis den Aufreinigungsgrad des DIC-Proteins aus *inclusion bodies* zu überprüfen. Das hier angewandte Protokoll zur Aufreinigung des DIC-Proteins basiert auf einer Anleitung zur Aufreinigung des ATP/ADP-Translokators aus *inclusion bodies*, die in der Arbeitsgruppe des Prof. Dr. Nikolaus Pfanner (Universität Freiburg) angewendet wird (persönliche Mitteilung von Dipl.-Biol. Elke Dian, Universität Hohenheim).

Ergebnisse

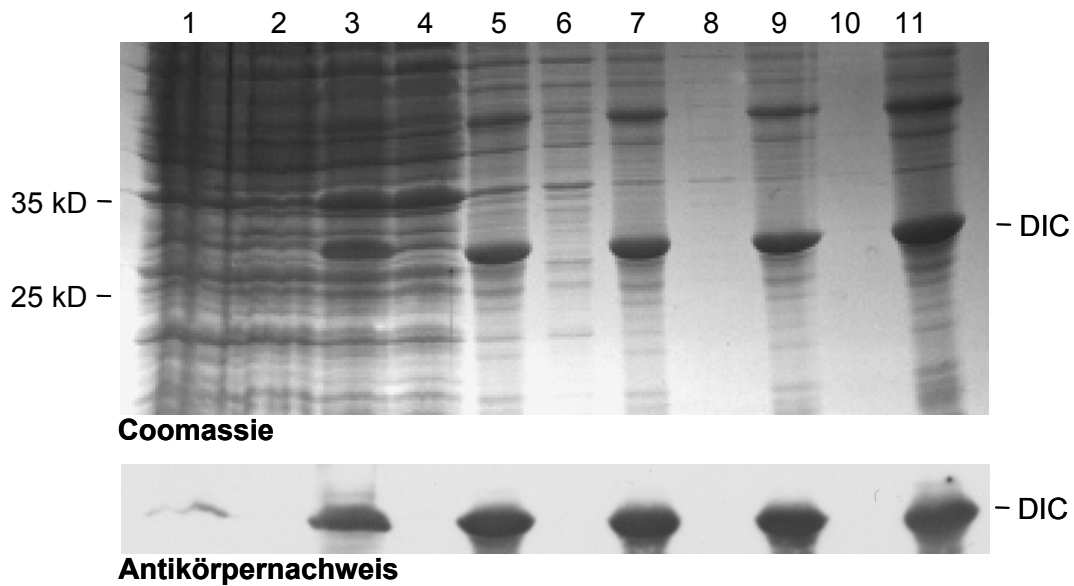


Abb. 3.2.6.1.: Aufreinigung von DIC aus *inclusion bodies* nach Expression in *E. coli* C41 (DE3). Mit pET28a/DIC transformierte *E. coli* C41 (DE3) – Zellen wurden in 500 ml LB-Medium (inkl. 30 mg/ml Kanamycin) bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD_{600nm} von 0,5 angezchtet und anschließend mit 1 mM IPTG und Inkubation für 16h bei 37°C die Expression des DIC-Proteins induziert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 min bei 4650 g geerntet, in 10ml Lösung I resuspendiert und mit Ultraschall lysiert (Spur 1). Der Zellaufschluss wurde für 30 min bei 39200 g zentrifugiert (Überstand, Spur 2). Der Niederschlag wurde in 10ml Lösung II resuspendiert, erneut mit Ultraschall behandelt (Spur 3) und dann erneut wie zuvor zentrifugiert (Überstand, Spur 4). Der Niederschlag wurde dann in 10ml Lösung III resuspendiert und mit Ultraschall behandelt (Spur 5). Nach einer weiteren Zentrifugation (Überstand, Spur 6) wurde der Niederschlag erneut in 10ml Lösung III aufgenommen und wie zuvor mit Ultraschall behandelt (Spur 7). Nach einer weiteren Zentrifugation (Überstand, Spur 8) wurde der Niederschlag ein drittes Mal in 10ml Lösung III resuspendiert, gefolgt von einer weiteren Behandlung mit Ultraschall (Spur 9). Die *inclusion bodies* wurden schließlich abzentrifugiert (Überstand, Spur 10) und in 2ml Lösung IV (Spur 11) aufgenommen. Nach SDS-PAGE (obere Teilabbildung, Coomassie) wurden die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und mit einem polyklonalen anti-DIC-Antikörper das DIC-Protein nachgewiesen (untere Teilabbildung, Antikörpernachweis).

Das DIC-Protein konnte erfolgreich in *E. coli* DH1 (DE3) zur Expression gebracht und anschließend zu einem hohen Reinheitsgrad aus *inclusion bodies* aufgereinigt werden (siehe Abb. 3.2.6.1., Coomassie, Spur 11). Mit einem DIC-spezifischen Antikörper (zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Vincenzo Zara, Universität Lecce, Italien) konnte nachgewiesen werden, dass es sich bei dem angereicherten Protein tatsächlich um das exprimierte DIC-Protein handelt (siehe Abb. 3.2.6.1., Antikörpernachweis).

Die Plasmide pET28a/DIC, pET28a/ DIC_{ΔCS1}, pET28a/DIC_{ΔCS2} und pET28a/DIC_{ΔCS1/2} wurden letztendlich an das Labor von Prof. Dr. Vincenzo Zara (Universität Lecce, Italien) geschickt. Dort wurden mit dem in dieser Arbeit verifizierten Protokoll zur bakteriellen Expression und Aufreinigung der DIC-Proteine, Untersuchungen zur Transportaktivität nach Rekonstitution in künstliche Membranvesikel durchgeführt. Es hat sich dabei herausgestellt, dass alle DIC-Derivate, unabhängig davon, welches *Carrier Signature* – Motiv nicht mehr vorhanden ist, keinerlei Transportaktivität mehr aufweisen. Zum Vergleich wurde wildtypisches DIC-Protein ebenfalls unter den gleichen Bedingungen untersucht und es konnte ein spezifischer Transport von Dicarboxylaten nachgewiesen werden. Damit konnte ausgeschlossen werden, dass der Verlust der Metabolit-Austauschfunktion mit der verwendeten Aufreinigungsprozedur zusammenhängt.

Die Untersuchungen an der *Carrier Signature* des Dicarboxylat-Translokators haben zusammenfassend ergeben, dass die in allen Vertretern der mitochondrialen Translokatorproteine vorkommenden Motive nicht für die mitochondriale Zielerkennung und Biogenese notwendig sind. Vielmehr werden die CS-Motive für die Aufrechterhaltung einer Konformation in der Innenmembran der Mitochondrien benötigt, welche essentiell für die Ausübung der spezifischen Austauschfunktion der Metabolit-Translokatoren ist. Ein Hinweis hierfür konnte auch von Pebay-Peyroula *et al.* (2003) beigesteuert werden, indem die dreidimensionale Struktur des ATP/ADP-Translokators (AAC) aufgeklärt werden konnte. Es zeigte sich, dass die geladenen Aminosäuren der drei *Carrier Signature* – Motive an der Matrixseite der Innenmembran über ionische Wechselwirkungen einen Ring bilden und dadurch die Öffnung der intramolekularen Pore des AAC stabilisieren. Da der Dicarboxylat-Translokator nur zwei CS-Motive aufweist (im ersten und dritten Modul), ist anzunehmen, dass die für die Ringbildung notwendigen geladenen Aminosäuren des zweiten Moduls in einem Aminosäureabschnitt zu finden sind, welches kein typisches *Carrier Signature* – Motiv darstellt.

Um zu bestätigen, dass die ionischen Wechselwirkungen von Bedeutung für die Aufrechterhaltung der Transportaktivität des Dicarboxylat-Translokators sind, wurden zwei weitere DIC-Derivate hergestellt, in denen lediglich jeweils eine geladene Aminosäure der *Carrier Signature* des ersten Moduls durch Alanin substituiert

worden ist (D35A bzw. K38A). Zusätzlich wurde ein DIC-Derivat hergestellt, bei dem das Prolin der *Carrier Signature* des ersten Moduls durch Alanin ausgetauscht worden ist (P33A). Es besteht nämlich der Verdacht, dass erst durch die Proline die geladenen Aminosäuren der wechselwirkenden *Carrier Signature* – Motive in räumliche Nähe zur Ausbildung von Salzbrücken kommen. Die Gene der zusätzlichen DIC-Derivate DIC_{P33A}, DIC_{D35A} und DIC_{K38A} wurden ebenfalls in den Expressionsvektor pET28a kloniert (Klonierungsstrategien siehe 2.2.1.13.) und anschließend an die Arbeitsgruppe des Prof. Dr. Vincenzo Zara (Universität Lecce, Italien) geschickt. Nachdem dort die Proteine exprimiert, aufgereinigt und in künstlichen Membranvesikeln rekonstituiert worden sind, wurde die Transportaktivität gemessen. Die Fähigkeit zum Transport von Dicarboxylaten war in den drei Derivaten DIC_{P33A}, DIC_{D35A} und DIC_{K38A} vollständig aufgehoben. Somit konnte gezeigt werden, dass selbst einzelne geladene Aminosäuren eines einzigen CS-Motives für die Aufrechterhaltung einer funktionsfähigen Konformation des Dicarboxylat-Translokators in der Membran notwendig sind. Darüber hinaus spielt auch das in der *Carrier Signature* sich befindende Prolin eine wichtige Rolle bei der korrekten Positionierung der geladenen Aminosäuren.

Die in dieser Dissertation dargelegten Daten deuten darauf hin, dass durch minimale Änderungen oder den Verlust eines CS-Motives die ionischen Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Modulen an der Matrixseite der Innenmembran aufgehoben werden und zur Destabilisierung der für die Transportaktivität oder Substraterkennung notwendigen Konformation in der Membran führen. Da die Metabolit-Translokatoren unterschiedliche Substrate erkennen, ist anzunehmen, dass andere Aminosäuren an der Substraterkennung beteiligt sind. Tatsächlich konnten von Robinson & Kunji (2006) durch Sequenzanalyse verschiedene Gruppen an Aminosäuren ausfindig gemacht werden, welche in Translokatorproteine mit ähnlichen Substraten konserviert sind. Die *Carrier Signature* stellt somit eher ein Struktur-determinierendes Motiv und nicht ein Substraterkennungsmotiv dar. Eine mögliche Rolle der *Carrier Signature* an der mitochondrialen Zielerkennung konnte in dieser Dissertation ausgeschlossen werden.

4. Diskussion

Die vorliegende Dissertation liefert neue Erkenntnisse zur mitochondrialen Zielerkennung von Toxinen, die von Bakterien in die Mitochondrien der Wirtszelle eingeschleust werden. Es konnte gezeigt werden, dass das Map-Toxin der enteropathogenen *E. coli* (EPEC) über eine mitochondriale Zielerkennungssequenz verfügt, die Ähnlichkeiten zu Präsequenzen mitochondrialer Matrix-Proteine aufweist und für die Translokation des Toxins in die Matrix der Mitochondrien erforderlich ist. Es konnte aufgeklärt werden, dass hierbei die wirtsspezifischen Translokationsmechanismen verwendet werden, die auch für endogene Proteine der Matrix gelten. Weiterhin wurde gezeigt, dass die mitochondriale Lokalisation des Map-Toxins auf definierte Foci beschränkt ist und zur Fragmentierung der mitochondrialen Netzwerke führt. Die Map-vermittelte Fragmentierung ist von den Komponenten des endogenen Teilungsapparates der Mitochondrien unabhängig. Schließlich führt die Akkumulation des Map-Toxins in Mitochondrien zum Verlust des Membranpotentials. Für die Zytotoxizität des Map-Toxins sind letztlich allerdings Prozesse im Cytosol entscheidend. Für die Funktion im Cytosol und in Mitochondrien ist ein konserviertes WXXE-Motiv essentiell, das ersten Daten zufolge eine Erkennungssequenz für SUMO-Ligasen darstellen könnte. Darüber hinaus konnten in dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse zur Biogenese der mitochondrialen Metabolit-Translokatoren hinzugewonnen werden. Es wurde gezeigt, dass die Präsequenz des Citrat-Translokators, im Gegensatz zu den Präsequenzen von Proteinen der Matrix, nicht für die mitochondriale Zielerkennung erforderlich ist. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass auch die in allen Metabolit-Translokatoren konservierte *Carrier Signature* nicht an der mitochondrialen Zielerkennung beteiligt ist. Die in dieser Dissertation gewonnenen Daten zeigen stattdessen, dass die *Carrier Signature* essentiell an der Aufrechterhaltung einer funktionellen Konformation der Translokatorproteine in der Innenmembran beteiligt ist.

4.1. Rolle von Sequenzmotiven bei der Biogenese mitochondrialer Metabolit-Translokatoren

4.1.1. Die Rolle der konservierten *Carrier Signature* mitochondrialer Metabolit-Translokatoren in Zielerkennung und Funktion

Für die Untersuchungen zur Biogenese mitochondrialer Metabolit-Translokatoren wurden als Modellproteine der Dicarboxylat-Translokator (DIC, *d*icarboxylate c*arrier*) und der Citrat-Translokator (CIC, *c*itrate c*arrier*) verwendet.

Als Aufgabe dieser Dissertation sollte zunächst die Rolle der in allen Mitgliedern der Familie mitochondrialer Metabolit-Translokatoren konservierten *Carrier Signature* (CS) an der Biogenese des Dicarboxylat-Translokators (DIC) aufgeklärt werden. In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein kompletter oder partieller Verlust der *Carrier Signature* auf die Biogenese des DIC kaum einen Einfluss hatte: (1) Der DIC wurde unabhängig von der *Carrier Signature* vom Tom70-Rezeptor der Außenmembran erkannt. (2) Der DIC wurde unabhängig von der *Carrier Signature* effizient über die Außenmembran in den Intermembranraum transportiert. (3) Der DIC wurde nach Verlust der *Carrier Signature* mit verminderter, aber gleichwohl hinreichender Effizienz in die Innenmembran inseriert. (4) Gänzlich unabhängig von der *Carrier Signature* bildeten sich hier DIC-Dimere.

Essentiell war die *Carrier Signature* hingegen in den anschließend durchgeführten Untersuchungen zur Funktion des DIC: In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Zara (Universität Lecce, Italien) konnte nach Rekonstitution von gereinigtem DIC und gereinigten DIC-Derivaten in künstliche Membranvesikel durch Translokationsmessungen nachgewiesen werden, dass die *Carrier Signature* essentiell für die Metabolit-Austauschfunktion des Dicarboxylat-Translokators ist. Der Verlust einzelner geladener Aminosäuren der *Carrier Signature* führte bereits zu einem vollständigen Verlust der Funktion. Die Funktion des DIC war auch bei Substitution der CS-spezifischen Proline aufgehoben.

Hinweise auf eine besondere Bedeutung der *Carrier Signature* hatten sich aus genetischen Daten bereits in der Studie von Nelson *et al.* (1998) ergeben. Einzelne geladene Aminosäuren der *Carrier Signature* des ATP/ADP-Translokators (AAC, *A*TP/ADP c*arrier*) aus *Saccharomyces cerevisiae* waren durch neutrale Aminosäuren ersetzt und die Respirationsfähigkeit der Hefemutanten überprüft worden. Hefezellen,

in denen positiv oder negativ geladene Aminosäuren der CS-Motive des AAC durch neutrale Aminosäuren substituiert wurden, hatten die Fähigkeit zur Atmung verloren. Dabei war allerdings offen geblieben, in welchem funktionellen Zusammenhang die jeweiligen Aminosäuren relevant waren.

Erst in jüngster Zeit wurde von Pebay-Peyroula *et al.* (2003) erstmals die dreidimensionale Struktur eines mitochondrialen Metabolit-Translokators durch Röntgenkristallographie aufgeklärt. Ausgehend von der Proteinstruktur des AAC konnte auch die Topologie der drei *Carrier Signature*-Motive bestimmt werden. Es fiel auf, dass die CS-Motive über ionische Wechselwirkungen miteinander einen Ring an der Matrix-gerichteten Öffnung der AAC-Pore bilden können. Die Proline der CS-Motive spielen diesen Daten zufolge eine wichtige Rolle in der korrekten Positionierung der geladenen Aminosäuren interner CS-Motive zur Ausbildung von intramolekularen Salzbrücken.

Die in dieser Dissertation dargelegten Daten legen den Schluss nahe, dass durch den Verlust eines CS-Motives die ionischen Wechselwirkungen zwischen den interagierenden Modulen an der Matrixseite der Innenmembran aufgehoben werden. Damit kommt es offenbar zur Destabilisierung der für die Transportaktivität oder Substraterkennung notwendigen Konformation des Translokators. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit dem Dicarboxylat-Translokator stellen den ersten direkten Nachweis dar, dass die *Carrier Signature* von Metabolit-Translokatoren für die Aufrechterhaltung der Funktion in der Innenmembran der Mitochondrien notwendig ist.

Da mehrere unterschiedliche Translokatoren posttranslational in Mitochondrien importiert und in der Innenmembran inseriert werden müssen, war zunächst die Vermutung nahe liegend, dass ein allgemeines Zielerkennungsmerkmal von der Translokationsmaschinerie der Außenmembran und Insertionsmaschinerie der Innenmembran erkannt wird. Ein solches in allen Translokatoren vorhandenes Merkmal schien mit der *Carrier Signature* gegeben zu sein. Darüber hinaus konnten Endres *et al.* (1999) und Brandner *et al.* (2005) zeigen, dass jedes Modul der aus drei Modulen bestehenden Metabolit-Translokatoren ausreichend Information zur Translokation in Mitochondrien enthält. Ein in allen drei Modulen eines Translokatorproteins wiederkehrendes Motiv ist stets die konservierte *Carrier Signature*.

Die Daten dieser Dissertation schließen jedoch eine Bedeutung der *Carrier Signature* an der mitochondrialen Zielerkennung aus. Auch sprechen die Daten gegen die von Endres *et al.* (1999) aufgestellte Hypothese, dass die *Carrier Signature* für die Anbindung an die kleinen Tim-Proteine des Intermembranraums von Bedeutung sein könnte. Systematische Untersuchungen von Curran *et al.* (2002) zur Affinität verschiedener Peptide ergaben, dass die kleinen Tim-Proteine bevorzugt an die hydrophoben Transmembrandomänen der Metabolit-Translokatoren binden. Auch die in jüngster Zeit von Webb *et al.* (2006) aufgeklärte Struktur des Tim9/Tim10-Komplexes deutet auf eine Interaktion der kleinen Tim-Proteine mit den Helices der Translokatorvorstufen hin.

Stattdessen zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit die Notwendigkeit der *Carrier Signature* in der Funktion der in der Innenmembran erzeugten Pore der Metabolit-Translokatoren. Bei einer Destabilisierung der ionischen Wechselwirkungen zwischen den drei CS-Motiven ist als Folge eine veränderte Konformation in der Innenmembran zu erwarten, die zum Verlust der Austauschfunktion in der Innenmembran der Mitochondrien führt. Überraschend zeichnet sich damit ab, dass die Aminosäuren der *Carrier Signature* aller Metabolit-Translokatoren unmittelbar an der Bildung der jeweiligen Substratkanäle beteiligt und dabei funktionell von entscheidender Bedeutung sind, obwohl die Substrate der verschiedenen Translokatoren durchaus sehr unterschiedlich sind.

4.1.2. Die Funktion der Präsequenz mitochondrialer Metabolit-Translokatoren

Bestimmte Metabolit-Translokatoren aus Säugetieren und Pflanzen weisen eine N-terminale Präsequenz mit Ähnlichkeiten zu mitochondrialen Präsequenzen von Matrix-Proteinen auf (Palmieri, 1996; Zara, 2003; Murcha, 2004). Die Evolution und Funktion dieser Präsequenzen konnte bisher nicht eindeutig festgelegt werden. In dieser Arbeit sollte auf die mitochondriale Zielerkennung des Citrat-Translokators aus *Rattus norvegicus* in Bezug auf die N-terminale Präsequenz eingegangen werden. Da Translokatorproteine auch über interne Zielerkennungssignale von Außenmembranrezeptoren erkannt werden können, muss der Verlust der Präsequenz nicht zwangsläufig eine Herabsetzung der Importeffizienz zur Folge haben. Aus diesem Grund sollten die Interaktionen des Citrat-Translokators mit den Rezeptoren der Translokationsmaschinerie der mitochondrialen Außenmembran näher untersucht

werden, um eine mögliche Beteiligung der Translokator-Präsequenz an der mitochondrialen Zielerkennung aufzuspüren. Es konnte zweifelsfrei in dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Präsequenz des Citrat-Translokators aus *Rattus norvegicus* nicht an der mitochondrialen Zielerkennung beteiligt ist. Der Citrat-Translokator wird trotz basischer Präsequenz nicht von Rezeptoren der Außenmembran erkannt, die für die Zielerkennung von Präsequenz-tragenden Vorstufenproteinen der Matrix zuständig sind. Stattdessen ist der Import des Citrat-Translokators in gewohnter Weise abhängig vom hierfür spezialisierten Tom70-Rezeptor. Der Citrat-Translokator verwendet die für die Zielerkennung von Metabolit-Translokatoren üblichen Mechanismen zur Translokation in Mitochondrien.

In manchen Metabolit-Translokatoren, z.B. boviner Phosphat-Translokator, scheint die Präsequenz den Import in Mitochondrien zu begünstigen (Zara, 1991; Zara, 1992). Die Präsequenz der Metabolit-Translokatoren aus Pflanzen kann die Insertion in die Innenmembran der Mitochondrien stimulieren (Murtha, 2005). Im Gegensatz dazu, ist den Daten der vorliegenden Dissertation zufolge, die Präsequenz des Citrat-Translokators aus *Rattus norvegicus* (Ratte) nicht für die Translokation über und Insertion in mitochondriale Membranen notwendig. Vielmehr übernimmt die Präsequenz in diesem Fall die Rolle eines intramolekularen Chaperons, zur Erhöhung der Löslichkeit des Vorstufenproteins (Zara, 2003; Zara, 2005). Auch Mozo *et al.* (1995) konnten unter *in vivo* Bedingungen für die Präsequenz des ATP/ADP-Translokators aus *Solanum tuberosum* (Kartoffel) zeigen, dass diese nicht hinreichend und nicht erforderlich für die mitochondriale Zielerkennung ist. Die Präsequenz von Metabolit-Translokatoren wird nach Insertion der Vorstufenproteine in die Innenmembran durch spezifische Proteasen abgespalten. Während Präsequenzen von Metabolit-Translokatoren aus Pflanzen in zwei Schritten unter Beteiligung von MPP (*matrix processing peptidase*) und einer Serin-Protease des Intermembranraumes abgespalten werden (Murtha, 2004), wurde für die Präsequenz des Citrat-Translokators aus *Anguilla anguilla* (europäischer Flusssaal) eine Abspaltung durch die Mg²⁺-abhängige Intermembranraum-Peptidase Imp1 nachgewiesen (Zara, 2006).

Mehrere Anhaltspunkte lassen vermuten, dass die Präsequenzen der mitochondrialen Metabolit-Translokatoren erst vergleichsweise spät in der Evolution erworben wurden: (1) Die meisten bislang identifizierten Translokatoren weisen keinerlei Präsequenz auf. (2) Die mitunter vorhandenen N-terminalen Präsequenzen

von Metabolit-Translokatoren zeigen in mehrerer Hinsicht unterschiedliche Funktionen. (3) Die Ähnlichkeit der Präsequenzen untereinander ist wesentlich geringer als die Ähnlichkeit der reifen Translokatoren (Zara, 2006). Wahrscheinlich hatten die mitochondrialen Metabolit-Translokatoren der ersten Eukaryonten ursprünglich keine Präsequenzen. Die vorliegende Dissertation demonstriert zudem, dass die Präsequenzen mitochondrialer Proteine nicht immer nur als Zielerkennungssignal dienen.

4.2. Sequenzmotive des Map-Toxins enteropathogener *E. coli* – Stämme für Zielerkennung und Funktion

Einige Aspekte der Biogenese und Zielerkennung mitochondrialer Proteine können nicht ausschließlich durch *in vitro* Importexperimente untersucht werden. Hierzu gehört, dass bestimmte Vorstufenproteine nur unter bestimmten physiologischen Bedingungen oder Zellzyklus-Phasen hergestellt und an die Mitochondrien abgegeben werden. Außerdem werden manche Vorstufenproteine nur in bestimmten Zelltypen exprimiert und in Mitochondrien transloziert, wie z.B. für das humane Parvulin (Par17) gezeigt werden konnte (Müller, 2006). Weitgehend ungeklärt ist außerdem die Rolle posttranslationaler Modifikationen für die Zielerkennung und Biogenese mitochondrialer Proteine. Durch den Einsatz der in Retikulozytenlysat synthetisierten Vorstufenproteine in Importexperimenten *in vitro* kann dieser Aspekt *per definitionem* nicht berücksichtigt werden. Schließlich kann auch die Verteilung eines Proteins innerhalb des mitochondrialen Netzwerks der Zelle inhomogen sein. Unter physiologischen Bedingungen treten Mitochondrien vielmehr auch mit weiteren intrazellulären Strukturen, wie z.B. mit Aktin-Filamenten oder Microtubuli in Kontakt und ermöglichen somit lokal begrenzte Aufenthaltsorte bestimmter mitochondrialer Proteine, die nicht ubiquitär an oder in Mitochondrien verteilt sind. Darüber hinaus können mitochondriale Proteine in submitochondriale Mikrodomänen lokalisiert sein. Dazu gehören unter anderem Kontaktstellen (*mitochondrial contact sites*) der mitochondrialen Außen- und Innenmembran (Brdiczka, 2006).

Der Einsatz isolierter Mitochondrien *in vitro* liefert u.U. eine Antwort auf die Frage, ob ein Vorstufenprotein grundsätzlich mit Mitochondrien assoziieren kann, erlaubt aber nicht unbedingt eine Aufklärung über die Lokalisation eines Proteins innerhalb der lebenden Zelle. Die Mikroskopie stellt eine wichtige und ergänzende Methode zur

Untersuchung der Mitochondrien-Biogenese dar. Durch die Verwendung von Reporterproteinen, wie z.B. das grün-fluoreszierende Protein (GFP) aus *Aequorea victoria*, kann die mitochondriale Lokalisation eines daran gentechnisch fusionierten Proteins direkt mittels Fluoreszenzmikroskopie untersucht werden. Außerdem können Mitochondrien mit speziellen Farbstoffen (z.B. MitoTracker™) angefärbt und somit die Auswirkungen auf deren Morphologie nach Lokalisation eines bestimmten Proteins nachvollzogen werden (Papatheodorou, 2006).

4.2.1. Mechanismen der mitochondrialen Zielerkennung des Map-Toxins und dessen Translokation in Mitochondrien

Das Map-Toxin enteropathogener *E. coli* liefert ein Beispiel dafür, dass unterschiedliche methodische Herangehensweisen erforderlich sein können, um ein komplettes Bild über die Zielerkennung eines nicht-endogenen, mitochondrialen Proteins zu erhalten. In der vorliegenden Dissertation konnte zunächst mittels *in vitro* Importexperimente gezeigt werden, dass Map unter Beteiligung von Rezeptoren des TOM-Komplexes und Erkennung einer N-terminalen Präsequenz über die generelle Importpore TIM23-abhängig in die Matrix importiert wird. Es handelt sich hierbei um die erste systematische Untersuchung der mitochondrialen Zielerkennung und Translokation eines bakteriellen Proteins mit N-terminaler Präsequenz.

Für ein weiteres EPEC-spezifisches Effektorprotein, EspF, konnte von Nagai *et al.* (2005) ebenfalls eine Lokalisation an Mitochondrien gezeigt werden. EspF weist ebenfalls eine N-terminale Präsequenz mit charakteristischen Merkmalen mitochondrialer Matrixproteine auf. Bis auf den experimentellen Nachweis, dass die Translokation von EspF ein intaktes Membranpotential der Innenmembran benötigt, konnten Nagai *et al.* (2005) nicht die submitochondriale Lokalisation von EspF oder die Beteiligung von mitochondrialen Translokationskomponenten an dessen Zielerkennung bzw. Translokation aufklären.

Wie nun für das Map-Toxin gezeigt werden konnte, sind EPEC-Bakterien in der Lage, das Map-Toxin mit einer mitochondrialen Präsequenz auszustatten und es unter Verwendung wirtsspezifischer mitochondrialer Translokationsmaschinerien in die Matrix der Mitochondrien zu dirigieren. Ähnliches ist auch für das EspF-Toxin zu erwarten, da dessen N-terminale Präsequenz und $\Delta\Psi$ -abhängiger Import in Mitochondrien starke Indizien für eine Translokation in die Matrix darstellen.

Eine Gruppe anderer bakterieller Toxine, die bestimmte Poren-bildende Proteine umfasst, hat bislang keine Hinweise auf typische mitochondriale Präsequenzen ergeben. Hierzu gehören das VacA-Toxin von *Helicobacter pylori*, das PorB von *Neisseria gonorrhoeae*, Omp38 von *Acinetobacter baumannii*, sowie das aus zwei Komponenten bestehende PVL-Toxin von *Staphylococcus aureus*. Am eingehendsten konnte bisher der mitochondriale Zielerkennungs- und Translokationsmechanismus des PorB-Toxins aus *Neisseria gonorrhoeae* aufgeklärt werden. In diesem Fall verwendet PorB eine für Poren-bildende mitochondriale Proteine typische Translokationsroute (Müller, 2002). Map wird den Ergebnissen dieser Dissertation zufolge analog zum PorB nicht über alternative Routen oder wirtsuntypische Mechanismen in Mitochondrien importiert, sondern unter Beteiligung der Importwege endogener mitochondrialer Proteine.

4.2.2. Auswirkungen des Map-Toxins in Mitochondrien und im Cytosol

Bei der Untersuchung der mitochondrialen Lokalisation des Map-Toxins mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie in *Saccharomyces cerevisiae* stellte sich heraus, dass Map innerhalb des mitochondrialen Netzwerks nicht ubiquitär verteilt ist. Vielmehr konnte eine allmähliche Akkumulation an bestimmten Foci beobachtet werden. Die mitochondriale Lokalisation des Map-Toxins hatte schließlich die Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks und den allmählichen Verlust des Membranpotentials zur Folge. Wie in Folgeexperimenten gezeigt wurde, hatten beide Effekte einen weitaus geringeren toxischen Einfluss auf die Hefezellen, als die Akkumulation des Map-Toxins im Cytosol. Dieser Befund wurde indirekt auch von einer weiteren Arbeitsgruppe bestätigt (Rodriguez-Escudero, 2005). Unter normalen Umständen führt die Fragmentierung der Mitochondrien und der Verlust des Membranpotentials zum Auslösen von Apoptose. Ein Absterben der Hefezellen nach der Map-induzierten Teilung der Mitochondrien wurde in dieser Arbeit nicht beobachtet.

Vermutlich wirkt die Map-induzierte Spaltung der Mitochondrien in den Wirtszellen antiapoptotisch. Ein solcher Effekt wurde in jüngster Zeit auch für das Protein vMIA des Cytomegalovirus und die in Säugerzellen für die Spaltung der Mitochondrien erforderliche GTPase Drp-1 beschrieben (Szabadkai, 2004; Roumier, 2006). Da ein weiteres EPEC-Toxin, EspF, bekanntermaßen proapoptotisch wirkt, kann eine

Funktion des Map-Toxins darin liegen, unter bestimmten Umständen durch die Spaltung des mitochondrialen Netzwerks eine EspF-ausgelöste Apoptose zu verhindern.

Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, ist die cytosolische Toxizität des Map-Toxins abhängig vom Vorhandensein eines intakten WXXE-Motives (Aminosäuren 74 bis 78), das in allen Mitgliedern einer Familie aus Map-homologen Proteinen verwandter Bakterienspezies konserviert ist (Alto, 2006). Die punktuelle mitochondriale Lokalisation des Map-Toxins weist auf zusätzliche Zielerkennungsmerkmale hin, die eine definierte, lokal begrenzte Verteilung innerhalb des mitochondrialen Netzwerks der Zelle verursachen. Bisher sind keine weiteren mitochondriale Matrix-Proteine bekannt, die ein ähnliches subzelluläres, mitochondriales Verteilungsmuster aufweisen.

Worum könnte es sich nun bei den Map-spezifischen Foci innerhalb des mitochondrialen Retikulums handeln? In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Import des Map-Toxins in die Matrix der Mitochondrien über den TOM- und den TIM23-Komplex vonstatten geht. Beide Translokationsmaschinerien werden bei Import eines Vorstufenproteins gleichzeitig an Kontaktstellen der mitochondrialen Außen- und Innenmembran passiert (Donzeau, 2000; Chacinska, 2003). Eine Möglichkeit besteht darin, dass das Map-Toxin unter *in vivo* Bedingungen in solchen Kontaktstellen arretiert. Darüber hinaus könnte das Map-Toxin unter *in vivo* Bedingungen zu einem gewissen Grad auch an der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert sein, um als Kristallisationspunkt für Proteine der mitochondrialen Spaltungsmaschinerie zu fungieren. Dieser Proteinkomplex, in der Bäckerhefe bestehend aus den Proteinen Dnm1, Gag3 und Fis1, weist ebenfalls ein punktförmiges Verteilungsmuster an Mitochondrien auf (Otsuga, 1998; Bleazard, 1999). Die Proteinkomplexe definieren dadurch den Ort, an dem die Teilung der Mitochondrien stattfinden wird (Shaw & Nunnari, 2002). Da das Map-Toxin ebenfalls die Spaltung des mitochondrialen Netzwerks zur Folge hat, besteht die Möglichkeit, dass es zusätzliche Zielerkennungsmerkmale zur Lokalisation an mitochondriale Spaltstellen aufweist.

Die Map-vermittelte Spaltung der Mitochondrien geschieht jedoch auch in Abwesenheit der mitochondrialen Spaltungsmaschinerie, wie in dieser Dissertation demonstriert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass Map einen alternativen Mechanismus zur Teilung der Mitochondrien verwendet. Die von Alto *et al.* (2006) für

das Map-Toxin beschriebene Mimikry der Wirts-GTPase Cdc42 ermöglicht ein Szenario, bei dem Map eventuell auch mitochondriale GTPasen nachahmen könnte. Das mitochondriale GTPase-Protein Dnm1 übernimmt eine zentrale Rolle bei der Spaltung der Mitochondrien, indem es durch Oligomerisierung überdimensionierte Spiralen um die Spaltstellen der Mitochondrien herum bildet (Ingerman, 2005). Dieser Mechanismus entspricht der Dynamin-abhängigen Abschnürung von Membranvesikeln (McFadden & Ralph, 2003). Vermutlich ahmt das Map-Toxin den Mechanismus der Dnm1-vermittelten Spaltung nach.

Doch nicht alle Komponenten von endogenen Maschinerien, die zur Fusion und Teilung von Mitochondrien benötigt werden, konnten bisher aufgeklärt werden. Eventuell interagiert Map mit bisher nicht identifizierten Proteinkomplexen in submitochondriale Kompartimente, die ebenfalls für die Morphologie der Mitochondrien von Bedeutung sind und an distinkten Punkten innerhalb des mitochondrialen Netzwerks lokalisieren. Erst in jüngster Zeit konnte ein weiterer submitochondrialer Komplex unter Beteiligung des Proteins OPA1 (*optic atrophy 1*, Mgm1) identifiziert werden, der die Morphologie der Cristae-Strukturen der mitochondrialen Innenmembran kontrolliert und dadurch die Zelle vor Apoptose schützt (Cipolat, 2006; Frezza, 2006; Ishihara, 2006).

In dieser Arbeit konnten zusätzlich Indizien für eine Sumoylierung des Map-Toxins gesammelt werden. Bei der Sumoylierung handelt es sich um eine erst vor wenigen Jahren identifizierte posttranslationale Modifikation von Proteinen, bei der ein 101 Aminosäuren langes Peptid, SUMO (*small ubiquitin-related modifier*), kovalent an Zielproteine angehängt wird (Mahajan, 1997). Spezielle SUMO-Ligasen erkennen definierte Konsensussequenzen und verknüpfen SUMO an einem sich darin befindenden Lysin. Die Sumoylierung scheint in vielen zellulären Prozessen eine Rolle zu spielen, unter anderem beim intrazellulären Proteintransport und bei der Zellteilung (Melchior, 2003; Bossis & Melchior, 2006). Zunächst wurde ein Algorithmus zur Identifizierung von Konsensussequenzen für die Erkennung durch SUMO-Ligasen an der Primärsequenz des Map-Toxins angewandt (Gramatikoff, 2004). Eine Stelle zwischen den Aminosäuren 75 bis 78 wies hierbei eine hohe Wahrscheinlichkeit als Erkennungssequenz für SUMO-Ligasen auf. Interessanterweise befand sich die potentielle Sumoylierungsstelle innerhalb des konservierten WXXXE-Motives der Proteinfamilie Map-homologer Toxine. Das Map-Toxin weist in dieser Proteinfamilie eine Sonderstellung auf, da es als einziges

Mitglied eine mitochondriale Präsequenz besitzt. Außerdem weisen die WXXXE-Motive der übrigen Mitglieder der konservierten Proteinfamilie keine interne Sumoylierungssequenz auf. Dies lässt vermuten, dass die Sumoylierungssequenz innerhalb des WXXXE-Motives spezifisch für die Funktion des Map-Toxins in Mitochondrien entwickelt worden ist. Tatsächlich deuten vorläufige experimentelle Daten darauf hin, dass die cytosolische Toxizität des Map-Toxins nicht beeinträchtigt wird, wenn das für die SUMO-Modifikation zuständige Lysin-76 durch die ebenfalls positiv geladene Aminosäure Arginin ausgetauscht wird. Stattdessen konnte aber in ersten Experimenten festgestellt werden, dass die Map-induzierte Teilung der Mitochondrien unterbunden ist, wenn das für die Sumoylierung notwendige Lysin-76 in eine andere Aminosäure umgewandelt wird. Map, welches nicht mehr sumoyliert werden kann, akkumuliert aber dennoch an distinkten Punkten innerhalb des mitochondrialen Netzwerks.

Die Sumoylierung des Map-Toxins ist offensichtlich relevant für die Funktion des Map-Toxins an Mitochondrien, nicht aber für dessen intermitochondriale Lokalisation. Dies scheint auch für das WXXXE-Motiv zu gelten. Denn der Austausch der Aminosäure Tryptophan-74 durch die neutrale Aminosäure Alanin, hatte für das Map-Toxin ebenfalls den Verlust der Mitochondrien-fragmentierenden Fähigkeit und die mitochondriale Lokalisation an bestimmten Foci zur Folge. Auffälligerweise konnte für das Säuger-Homolog des Hefe-Proteins Dnm1, Drp1, ebenfalls gezeigt werden, dass das Protein für eine effektive Fragmentierung der Mitochondrien zuvor sumoyliert werden muss (Harder, 2004). Die duale Relevanz des WXXXE-Motives an Mitochondrien und Cytosol, lässt ein allgemeines Funktionsprinzip des Map-Toxins an beiden Kompartimenten vermuten. Alternativ kann es sich beim WXXXE-Motiv um ein äußerst wichtiges, struktur-determinierendes Motiv handeln. Das Ausbleiben der Map-induzierten Fragmentierung der Mitochondrien, hervorgerufen durch den Austausch der Aminosäure Tryptophan-74 oder Lysin-76 des WXXXE- bzw. SUMO-Motives, wäre in diesem Fall indirekt durch Fehlfaltung des Map-Toxins in eine nicht-funktionelle Form ausgelöst.

In zukünftigen Experimenten wird es notwendig sein, eine eventuell stattfindende Sumoylierung des Map-Toxins nachzuweisen und die damit verbundenen funktionellen Aspekte aufzuklären. Von besonderer Bedeutung werden Untersuchungen zur Rolle des WXXXE-Motives für die vollständige Aufklärung der subzellulären Funktionen des Map-Toxins sein.

5. Zusammenfassung / Summary

Mitochondrien nehmen im Zuge ihrer Biogenese ständig kernkodierte Proteine aus dem Cytosol auf. Der Proteinimport wird in der mitochondrialen Außenmembran von TOM-Proteinen, in der Innenmembran von TIM-Proteinen vermittelt. Mitunter gelangen auch toxische Proteine in die Mitochondrien, die von pathogenen Bakterien an die infizierten Gewebe abgegeben werden. Die vorliegende Dissertation liefert neue Erkenntnisse zur Rolle charakteristischer Sequenzmotive, die sich in endogenen und toxischen mitochondrialen Proteinen nachweisen lassen.

In einem umfangreichen Projekt wurde die Bedeutung von Sequenzmotiven mitochondrialer Metabolit-Translokatoren in deren Biogenese und Funktion näher untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die positiv geladene N-terminale Präsequenz des Citrat-Translokators aus *Rattus norvegicus* nicht an der mitochondrialen Zielerkennung beteiligt ist sondern als internes Chaperon dient. Ein in allen Metabolit-Translokatoren konserviertes Sequenzmotiv, PX(D/E)XX(R/K), die *Carrier Signature*, stellt ebenfalls kein mitochondriales Zielerkennungssignal dar, wie anhand des Dicarboxylat-Translokators aus *Saccharomyces cerevisiae* nachgewiesen werden konnte. Auch die Translokation über die Außenmembran, sowie die Insertion in die Innenmembran und die nachfolgende Dimerisierung des Dicarboxylat-Translokators ist von der *Carrier Signature* weitgehend unabhängig. Stattdessen wurde entdeckt, dass die *Carrier Signature* primär für die Funktion der Metabolit-Translokatoren in der Innenmembran der Mitochondrien notwendig ist.

In einem weiteren Projekt wurde für das Map-Toxin enteropathogener *Escherichia coli* – Stämme (EPEC) gezeigt, dass es unter Vermittlung seiner typischen N-terminalen Präsequenz unter Beteiligung der TOM- und TIM-Komplexe in die Matrix der Mitochondrien dirigiert wird. Das Map-Toxin löst dann unabhängig von der endogenen mitochondrialen Teilungsmaschinerie eine Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks und den Verlust des Membranpotentials aus. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, dass ein internes konserviertes WXXXE Sequenzmotiv für die Zytotoxizität des Map-Toxins im Cytosol und für die Spaltung der Mitochondrien essentiell ist. Vermutlich dient ein Lysinrest innerhalb der WXXXE-Sequenz als Sumoylierungsstelle.

Die Untersuchungen zeigen, dass Mechanismen des intrazellulären Proteintransports nicht nur bei der Biogenese der Mitochondrien, sondern auch bei pathologischen Prozessen eine wichtige Rolle spielen können.

In the course of their biogenesis, mitochondria take up nuclear encoded proteins from the cytosol continuously. Protein import at the mitochondrial outer membrane is mediated by TOM proteins and by TIM proteins at the inner membrane, respectively. Now and then, toxic proteins released by pathogenic bacteria to infected tissue can also reach mitochondria. The present dissertation provides new findings on the role of characteristic sequence motifs that can be identified in endogenous and toxic mitochondrial proteins.

In an extensive project the importance of sequence motifs from mitochondrial metabolite carrier proteins in their biogenesis and function was investigated in more detail. It could be shown, that the positively charged presequence of the citrate carrier from *Rattus norvegicus* is not involved in mitochondrial targeting but rather serves as an internal chaperone. A conserved sequence motif, PX(D/E)XX(R/K), the *Carrier Signature*, which can be found in all mitochondrial carrier proteins, does also not represent a mitochondrial targeting signal, as could be proven by using the dicarboxylate carrier from *Saccharomyces cerevisiae* as a model protein. Even the translocation across the outer membrane, the insertion into the inner membrane and the following dimerization of the dicarboxylate carrier are processes occurring independently of the *Carrier Signature*. Instead, it was discovered, that the *Carrier Signature* is primarily necessary for the function of metabolite carrier proteins in the inner membrane.

In another project it could be shown for the Map toxin from enteropathogenic *Escherichia coli* strains (EPEC), that it is directed to the mitochondrial matrix, mediated by its typical N-terminal presequence and by the TOM and TIM complexes, respectively. The Map toxin leads then to the fragmentation of the mitochondrial network independent of the mitochondrial fission machinery and to the loss of the mitochondrial membrane potential. Moreover, it could be proven, that an internal conserved sequence motif, WXXE, is essential for cytotoxicity of the Map toxin in the cytosol and for fission of mitochondria. A lysine residue within the WXXE sequence serves probably as a locus of sumoylation.

The investigations show, that mechanisms of intracellular protein transport are not only important for the biogenesis of mitochondria, but can also be relevant for pathological processes.

6. Literaturverzeichnis

Abe Y, Shodai T, Muto T, Mihara K, Torii H, Nishikawa S, Endo T, Kohda D.
Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20.

Cell. 2000 Mar 3;100(5):551-60.

Adam A, Endres M, Sirrenberg C, Lottspeich F, Neupert W, Brunner M.
Tim9, a new component of the TIM22.54 translocase in mitochondria.

EMBO J. 1999 Jan 15;18(2):313-9.

Ahting U, Waizenegger T, Neupert W, Rapaport D.

Signal-anchored proteins follow a unique insertion pathway into the outer membrane of mitochondria.

J Biol Chem. 2005 Jan 7;280(1):48-53. Epub 2004 Oct 22.

Alto NM, Shao F, Lazar CS, Brost RL, Chua G, Mattoo S, McMahon SA, Ghosh P, Hughes TR, Boone C, Dixon JE.

Identification of a bacterial type III effector family with G protein mimicry functions.

Cell. 2006 Jan 13;124(1):133-45.

Aquila H, Link TA, Klingenberg M.

Solute carriers involved in energy transfer of mitochondria form a homologous protein family.

FEBS Lett. 1987 Feb 9;212(1):1-9. Review.

Asai T, Takahashi T, Esaki M, Nishikawa S, Ohtsuka K, Nakai M, Endo T.

Reinvestigation of the requirement of cytosolic ATP for mitochondrial protein import.

J Biol Chem. 2004 May 7;279(19):19464-70. Epub 2004 Mar 4.

Baker A, Sparkes IA.

Peroxisome protein import: some answers, more questions.

Curr Opin Plant Biol. 2005 Dec;8(6):640-7. Epub 2005 Sep 22. Review.

Bauer MF, Sirrenberg C, Neupert W, Brunner M.

Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria.

Cell. 1996 Oct 4;87(1):33-41.

Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, Tieu Q, Nunnari J, Shaw JM.

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

Nat Cell Biol. 1999 Sep;1(5):298-304.

Bolliger L, Junne T, Schatz G, Lithgow T.

Acidic receptor domains on both sides of the outer membrane mediate translocation of precursor proteins into yeast mitochondria.

EMBO J. 1995 Dec 15;14(24):6318-26.

Bossis G, Melchior F.

SUMO: Regulating the regulator.

Cell Div. 2006 Jun 29;1(1):13 [Epub ahead of print]

Bradford MM.

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.

Anal Biochem. 1976 May 7;72:248-54.

Brandner K, Rehling P, Truscott KN.

The carboxyl-terminal third of the dicarboxylate carrier is crucial for productive association with the inner membrane twin-pore translocase.

J Biol Chem. 2005 Feb 18;280(7):6215-21. Epub 2004 Dec 9.

Brdiczka DG, Zorov DB, Sheu SS.

Mitochondrial contact sites: their role in energy metabolism and apoptosis.

Biochim Biophys Acta. 2006 Feb;1762(2):148-63. Epub 2005 Oct 28. Review.

Burri L, Vascotto K, Fredersdorf S, Tiedt R, Hall MN, Lithgow T.

Zim17, a novel zinc finger protein essential for protein import into mitochondria.

J Biol Chem. 2004 Nov 26;279(48):50243-9. Epub 2004 Sep 21.

Chacinska A, Lind M, Frazier AE, Dudek J, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Truscott KN, Guiard B, Pfanner N, Rehling P.

Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17.

Cell. 2005 Mar 25;120(6):817-29.

Chacinska A, Rehling P, Guiard B, Frazier AE, Schulze-Specking A, Pfanner N, Voos W, Meisinger C.

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

EMBO J. 2003 Oct 15;22(20):5370-81.

Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, Hyun SH, Kim SA, Lee SK, Lee JC.

Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells.

Cell Microbiol. 2005 Aug;7(8):1127-38.

Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B.

Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling.

Cell. 2006 Jul 14;126(1):163-75.

Claros MG, Vincens P.

Computational method to predict mitochondrially imported proteins and their targeting sequences.

Eur J Biochem. 1996 Nov 1;241(3):779-86.

Court DA, Nargang FE, Steiner H, Hodges RS, Neupert W, Lill R.

Role of the intermembrane-space domain of the preprotein receptor Tom22 in protein import into mitochondria.

Mol Cell Biol. 1996 Aug;16(8):4035-42.

Curran SP, Leuenberger D, Oppliger W, Koehler CM.

The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier.

EMBO J. 2002 Mar 1;21(5):942-53.

de Marcos-Lousa C, Sideris DP, Tokatlidis K.

Translocation of mitochondrial inner-membrane proteins: conformation matters.

Trends Biochem Sci. 2006 May;31(5):259-67. Epub 2006 Apr 17.

Dekker PJ, Keil P, Rassow J, Maarse AC, Pfanner N, Meijer M.

Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane.

FEBS Lett. 1993 Sep 6;330(1):66-70.

Donzeau M, Kaldi K, Adam A, Paschen S, Wanner G, Guiard B, Bauer MF, Neupert W, Brunner M.

Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes.

Cell. 2000 May 12;101(4):401-12.

Endo T, Yamamoto H, Esaki M.

Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles.

J Cell Sci. 2003 Aug 15;116(Pt 16):3259-67. Review.

Endres M, Neupert W, Brunner M.

Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex.

EMBO J. 1999 Jun 15;18(12):3214-21.

Frazier AE, Dudek J, Guiard B, Voos W, Li Y, Lind M, Meisinger C, Geissler A, Sickmann A, Meyer HE, Bilanchone V, Cumsky MG, Truscott KN, Pfanner N, Rehling P.

Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor.

Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):226-33. Epub 2004 Feb 15.

Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L.

OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion.

Cell. 2006 Jul 14;126(1):177-89.

Galmiche A, Rassow J, Doye A, Cagnol S, Chambard JC, Contamin S, de Thillot V, Just I, Ricci V, Solcia E, Van Obberghen E, Boquet P.

The N-terminal 34 kDa fragment of Helicobacter pylori vacuolating cytotoxin targets mitochondria and induces cytochrome c release.

EMBO J. 2000 Dec 1;19(23):6361-70.

Gambill BD, Voos W, Kang PJ, Miao B, Langer T, Craig EA, Pfanner N.

A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins.

J Cell Biol. 1993 Oct;123(1):109-17.

Geissler A, Chacinska A, Truscott KN, Wiedemann N, Brandner K, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Pfanner N, Rehling P.

The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel.

Cell. 2002 Nov 15;111(4):507-18.

Genestier AL, Michallet MC, Prevost G, Bellot G, Chalabreysse L, Peyrol S, Thivolet F, Etienne J, Lina G, Vallette FM, Vandenesch F, Genestier L.

Staphylococcus aureus Panton-Valentine leukocidin directly targets mitochondria and induces Bax-independent apoptosis of human neutrophils.

J Clin Invest. 2005 Nov;115(11):3117-27.

Gentle I, Gabriel K, Beech P, Waller R, Lithgow T.

The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria.

J Cell Biol. 2004 Jan 5;164(1):19-24. Epub 2003 Dec 29.

Grammatikoff K, Wu C, Shi X, Fang F.

SUMO: The Proteome's Little Prince.

In *Frontiers of Biotechnology and Pharmaceuticals*, Science Press USA Inc 2004; 4: 181 - 210.

Gutensohn M, Fan E, Frielingsdorf S, Hanner P, Hou B, Hust B, Klosgen RB.

Toc, Tic, Tat et al.: structure and function of protein transport machineries in chloroplasts.

J Plant Physiol. 2006 Feb;163(3):333-47. Epub 2005 Dec 28. Review.

Harder Z, Zunino R, McBride H.

Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission.

Curr Biol. 2004 Feb 17;14(4):340-5.

Hawlitshchek G, Schneider H, Schmidt B, Tropschug M, Hartl FU, Neupert W.

Mitochondrial protein import: identification of processing peptidase and of PEP, a processing enhancing protein.

Cell. 1988 Jun 3;53(5):795-806.

Heiland I, Erdmann R.

Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins.

FEBS J. 2005 May;272(10):2362-72. Review.

Herrmann JM, Hell K.

Chopped, trapped or tacked--protein translocation into the IMS of mitochondria.

Trends Biochem Sci. 2005 Apr;30(4):205-11. Review.

Herrmann JM, Neupert W.

Protein insertion into the inner membrane of mitochondria.

IUBMB Life. 2003 Apr-May;55(4-5):219-25. Review.

Hines V, Brandt A, Griffiths G, Horstmann H, Brutsch H, Schatz G.

Protein import into yeast mitochondria is accelerated by the outer membrane protein MAS70.

EMBO J. 1990 Oct;9(10):3191-200.

Hohfeld J, Hartl FU.

Role of the chaperonin cofactor Hsp10 in protein folding and sorting in yeast mitochondria.

J Cell Biol. 1994 Jul;126(2):305-15.

Hoppins SC, Nargang FE.

The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes.

J Biol Chem. 2004 Mar 26;279(13):12396-405. Epub 2004 Jan 13.

Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J.

Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria.

J Cell Biol. 2005 Sep 26;170(7):1021-7.

Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K.

Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1.

EMBO J. 2006 Jul 12;25(13):2966-77. Epub 2006 Jun 15.

Ishikawa D, Yamamoto H, Tamura Y, Moritoh K, Endo T.

Two novel proteins in the mitochondrial outer membrane mediate beta-barrel protein assembly.

J Cell Biol. 2004 Aug 30;166(5):621-7. Epub 2004 Aug 23.

Kakhniashvili D, Mayor JA, Gremse DA, Xu Y, Kaplan RS.

Identification of a novel gene encoding the yeast mitochondrial dicarboxylate transport protein via overexpression, purification, and characterization of its protein product.

J Biol Chem. 1997 Feb 14;272(7):4516-21.

Kang PJ, Ostermann J, Shilling J, Neupert W, Craig EA, Pfanner N.

Requirement for hsp70 in the mitochondrial matrix for translocation and folding of precursor proteins.

Nature. 1990 Nov 8;348(6297):137-43.

Kenny B.

Enteropathogenic Escherichia coli (EPEC)-- a crafty subversive little bug.

Microbiology. 2002 Jul;148(Pt 7):1967-78.

Kenny B, Jepson M.

Targeting of an enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) effector protein to host mitochondria.

Cell Microbiol. 2000 Dec;2(6):579-90.

Kerscher O, Sepuri NB, Jensen RE.

Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane.

Mol Biol Cell. 2000 Jan;11(1):103-16.

Kerscher O, Holder J, Srinivasan M, Leung RS, Jensen RE.

The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane.

J Cell Biol. 1997 Dec 29;139(7):1663-75.

Koehler CM, Murphy MP, Bally NA, Leuenberger D, Oppliger W, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Or E.

Tim18p, a new subunit of the TIM22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane.

Mol Cell Biol. 2000 Feb;20(4):1187-93.

Koehler CM, Merchant S, Oppliger W, Schmid K, Jarosch E, Dolfini L, Junne T, Schatz G, Tokatlidis K.

Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins.

EMBO J. 1998 Nov 16;17(22):6477-86.

Koehler CM, Jarosch E, Tokatlidis K, Schmid K, Schweyen RJ, Schatz G.

Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space.

Science. 1998 Jan 16;279(5349):369-73.

Komiya T, Rospert S, Koehler C, Looser R, Schatz G, Mihara K.

Interaction of mitochondrial targeting signals with acidic receptor domains along the protein import pathway: evidence for the 'acid chain' hypothesis.

EMBO J. 1998 Jul 15;17(14):3886-98.

Kovermann P, Truscott KN, Guiard B, Rehling P, Sepuri NB, Muller H, Jensen RE, Wagner R, Pfanner N.

Tim22, the essential core of the mitochondrial protein insertion complex, forms a voltage-activated and signal-gated channel.

Mol Cell. 2002 Feb;9(2):363-73.

Kozany C, Mokranjac D, Sichting M, Neupert W, Hell K.

The J domain-related cochaperone Tim16 is a constituent of the mitochondrial TIM23 preprotein translocase.

Nat Struct Mol Biol. 2004 Mar;11(3):234-41. Epub 2004 Feb 15.

Kozjak V, Wiedemann N, Milenkovic D, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N.

An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane.

J Biol Chem. 2003 Dec 5;278(49):48520-3. Epub 2003 Oct 21.

Krimmer T, Rapaport D, Ryan MT, Meisinger C, Kassenbrock CK, Blachly-Dyson E, Forte M, Douglas MG, Neupert W, Nargang FE, Pfanner N.

Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex.

J Cell Biol. 2001 Jan 22;152(2):289-300.

Kunji ER.

The role and structure of mitochondrial carriers.

FEBS Lett. 2004 Apr 30;564(3):239-44. Review.

Laloraya S, Gambill BD, Craig EA.

A role for a eukaryotic GrpE-related protein, Mge1p, in protein translocation.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994 Jul 5;91(14):6481-5.

Lingappa VR, Blobel G.

Early events in the biosynthesis of secretory and membrane proteins: the signal hypothesis.

Recent Prog Horm Res. 1980;36:451-75. Review.

Maarse AC, Blom J, Keil P, Pfanner N, Meijer M.

Identification of the essential yeast protein MIM17, an integral mitochondrial inner membrane protein involved in protein import.

FEBS Lett. 1994 Aug 1;349(2):215-21.

Maarse AC, Blom J, Grivell LA, Meijer M.

MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria.

EMBO J. 1992 Oct;11(10):3619-28.

Mahajan R, Delphin C, Guan T, Gerace L, Melchior F.

A small ubiquitin-related polypeptide involved in targeting RanGAP1 to nuclear pore complex protein RanBP2.

Cell. 1997 Jan 10;88(1):97-107.

Mancias JD, Goldberg J.

Exiting the endoplasmic reticulum.

Traffic. 2005 Apr;6(4):278-85. Review.

Martin J.

Molecular chaperones and mitochondrial protein folding.

J Bioenerg Biomembr. 1997 Feb;29(1):35-43.

Massari P, Ho Y, Wetzler LM.

Neisseria meningitidis porin PorB interacts with mitochondria and protects cells from apoptosis.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Aug 1;97(16):9070-5.

McFadden GI, Ralph SA.

Dynamin: the endosymbiosis ring of power?

Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Apr 1;100(7):3557-9. Epub 2003 Mar 25.

Meier S, Neupert W, Herrmann JM.

Proline residues of transmembrane domains determine the sorting of inner membrane proteins in mitochondria.

J Cell Biol. 2005 Sep 12;170(6):881-8.

Meisinger C, Rissler M, Chacinska A, Szklarz LK, Milenkovic D, Kozjak V, Schonfisch B, Lohaus C, Meyer HE, Yaffe MP, Guiard B, Wiedemann N, Pfanner N.

The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane.

Dev Cell. 2004 Jul;7(1):61-71.

Melchior F, Schergaut M, Pichler A.

SUMO: ligases, isopeptidases and nuclear pores.

Trends Biochem Sci. 2003 Nov;28(11):612-8. Review.

Miao B, Davis JE, Craig EA.

Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*.

J Mol Biol. 1997 Feb 7;265(5):541-52.

Mihara K, Omura T.

Cytosolic factors in mitochondrial protein import.

Experientia. 1996 Dec 15;52(12):1063-8. Review.

Milenkovic D, Kozjak V, Wiedemann N, Lohaus C, Meyer HE, Guiard B, Pfanner N, Meisinger C.

Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability.

J Biol Chem. 2004 May 21;279(21):22781-5. Epub 2004 Apr 2.

Miroux B, Walker JE.

Over-production of proteins in *Escherichia coli*: mutant hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels.

J Mol Biol. 1996 Jul 19;260(3):289-98. Review.

Moczko M, Bomer U, Kubrich M, Zufall N, Honlinger A, Pfanner N.

The intermembrane space domain of mitochondrial Tom22 functions as a trans binding site for preproteins with N-terminal targeting sequences.

Mol Cell Biol. 1997 Nov;17(11):6574-84.

Moczko M, Ehmann B, Gartner F, Honlinger A, Schafer E, Pfanner N.

Deletion of the receptor MOM19 strongly impairs import of cleavable preproteins into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria.

J Biol Chem. 1994 Mar 25;269(12):9045-51.

Moczko M, Gartner F, Pfanner N.

The protein import receptor MOM19 of yeast mitochondria.

FEBS Lett. 1993 Jul 12;326(1-3):251-4.

Mokranjac D, Neupert W.

Protein import into mitochondria.

Biochem Soc Trans. 2005 Nov;33(Pt 5):1019-23. Review.

Mokranjac D, Popov-Celeketić D, Hell K, Neupert W.

Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites.

J Biol Chem. 2005 Jun 24;280(25):23437-40. Epub 2005 May 4.

Mokranjac D, Sichtung M, Neupert W, Hell K.

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

EMBO J. 2003 Oct 1;22(19):4945-56.

Mokranjac D, Paschen SA, Kozany C, Prokisch H, Hoppins SC, Nargang FE, Neupert W, Hell K.

Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria.

EMBO J. 2003 Feb 17;22(4):816-25.

Motz C, Martin H, Krimmer T, Rassow J.

Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane.

J Mol Biol. 2002 Nov 1;323(4):729-38.

Mozo T, Fischer K, Flugge UI, Schmitz UK.

The N-terminal extension of the ADP/ATP translocator is not involved in targeting to plant mitochondria in vivo.

Plant J. 1995 Jun;7(6):1015-20.

Müller JW, Kessler D, Neumann D, Stratmann T, Papatheodorou P, Hartmann-Fatu C, Bayer P.

Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation.

BMC Mol Biol. 2006 Mar 7;7:9.

Müller A, Rassow J, Grimm J, Machuy N, Meyer TF, Rudel T.

VDAC and the bacterial porin PorB of *Neisseria gonorrhoeae* share mitochondrial import pathways.

EMBO J. 2002 Apr 15;21(8):1916-29.

Müller A, Gunther D, Brinkmann V, Hurwitz R, Meyer TF, Rudel T.

Targeting of the pro-apoptotic VDAC-like porin (PorB) of *Neisseria gonorrhoeae* to mitochondria of infected cells.

EMBO J. 2000 Oct 16;19(20):5332-43.

Murcha MW, Millar AH, Whelan J.

The N-terminal cleavable extension of plant carrier proteins is responsible for efficient insertion into the inner mitochondrial membrane.

J Mol Biol. 2005 Aug 5;351(1):16-25.

Murcha MW, Elhafez D, Millar AH, Whelan J.

The N-terminal extension of plant mitochondrial carrier proteins is removed by two-step processing: the first cleavage is by the mitochondrial processing peptidase.

J Mol Biol. 2004 Nov 19;344(2):443-54.

Nagai T, Abe A, Sasakawa C.

Targeting of enteropathogenic Escherichia coli EspF to host mitochondria is essential for bacterial pathogenesis: critical role of the 16th leucine residue in EspF.

J Biol Chem. 2005 Jan 28;280(4):2998-3011. Epub 2004 Nov 8.

Nakamura H, Hase A.

Cellular differentiation in the process of generation of the eukaryotic cell.

Orig Life Evol Biosph. 1990-91;20(6):499-514. Review.

Nelson DR, Felix CM, Swanson JM.

Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family.

J Mol Biol. 1998 Mar 27;277(2):285-308.

Nougayrede JP, Sonnenberg MS.

Enteropathogenic Escherichia coli EspF is targeted to mitochondria and is required to initiate the mitochondrial death pathway.

Cell Microbiol. 2004 Nov;6(11):1097-111.

Omura T.

Mitochondria-targeting sequence, a multi-role sorting sequence recognized at all steps of protein import into mitochondria.

J Biochem (Tokyo). 1998 Jun;123(6):1010-6. Review.

Otsuga D, Keegan BR, Brisch E, Thatcher JW, Hermann GJ, Bleazard W, Shaw JM.

The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast.

J Cell Biol. 1998 Oct 19;143(2):333-49.

Palmieri F, Bisaccia F, Capobianco L, Dolce V, Fiermonte G, Iacobazzi V, Indiveri C, Palmieri L.

Mitochondrial metabolite transporters.

Biochim Biophys Acta. 1996 Jul 18;1275(1-2):127-32. Review.

Palmieri L, Palmieri F, Runswick MJ, Walker JE.

Identification by bacterial expression and functional reconstitution of the yeast genomic sequence encoding the mitochondrial dicarboxylate carrier protein.

FEBS Lett. 1996 Dec 16;399(3):299-302.

Papatheodorou P, Domanska G, Oxle M, Mathieu J, Selchow O, Kenny B, Rassow J.
The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology.

Cell Microbiol. 2006 Apr;8(4):677-89.

Paschen SA, Neupert W, Rapaport D.

Biogenesis of beta-barrel membrane proteins of mitochondria.

Trends Biochem Sci. 2005 Oct;30(10):575-82. Review.

Pebay-Peyroula E, Dahout-Gonzalez C, Kahn R, Trezeguet V, Lauquin GJ, Brandolin G.

Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside.

Nature. 2003 Nov 6;426(6962):39-44.

Pemberton LF, Paschal BM.

Mechanisms of receptor-mediated nuclear import and nuclear export.

Traffic. 2005 Mar;6(3):187-98. Review.

Perry AJ, Lithgow T.

Protein targeting: entropy, energetics and modular machines.

Curr Biol. 2005 Jun 7;15(11):R423-5. Review.

Pfanner N, Wiedemann N, Meisinger C, Lithgow T.

Assembling the mitochondrial outer membrane.

Nat Struct Mol Biol. 2004 Nov;11(11):1044-8. Review.

Pfanner N, Craig EA, Meijer M.

The protein import machinery of the mitochondrial inner membrane.

Trends Biochem Sci. 1994 Sep;19(9):368-72. Review.

Rapaport D.

How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane?

J Cell Biol. 2005 Nov 7;171(3):419-23. Epub 2005 Oct 31. Review.

Rapaport D.

Biogenesis of the mitochondrial TOM complex.

Trends Biochem Sci. 2002 Apr;27(4):191-7. Review.

Rassow J, Pfanner N.

Protein biogenesis: chaperones for nascent polypeptides.

Curr Biol. 1996 Feb 1;6(2):115-8. Review.

Rassow J, Mohrs K, Koidl S, Barthelmess IB, Pfanner N, Tropschug M.

Cyclophilin 20 is involved in mitochondrial protein folding in cooperation with molecular chaperones Hsp70 and Hsp60.

Mol Cell Biol. 1995 May;15(5):2654-62.

Rassow J, Guiard B, Wienhues U, Herzog V, Hartl FU, Neupert W.

Translocation arrest by reversible folding of a precursor protein imported into mitochondria. A means to quantitate translocation contact sites.

J Cell Biol. 1989 Oct;109(4 Pt 1):1421-8.

Rehling P, Model K, Brandner K, Kovermann P, Sickmann A, Meyer HE, Kuhlbrandt W, Wagner R, Truscott KN, Pfanner N.

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

Science. 2003 Mar 14;299(5613):1747-51.

Rehling P, Pfanner N, Meisinger C.

Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane--a guided tour.

J Mol Biol. 2003 Feb 21;326(3):639-57. Review.

Robinson AJ, Kunji ER.

Mitochondrial carriers in the cytoplasmic state have a common substrate binding site.

Proc Natl Acad Sci U S A. 2006 Feb 21;103(8):2617-22. Epub 2006 Feb 9.

Rodriguez-Escudero I, Hardwidge PR, Nombela C, Cid VJ, Finlay BB, Molina M.

Enteropathogenic Escherichia coli type III effectors alter cytoskeletal function and signalling in Saccharomyces cerevisiae.

Microbiology. 2005 Sep;151(Pt 9):2933-45.

Roise D, Schatz G.

Mitochondrial presequences.

J Biol Chem. 1988 Apr 5;263(10):4509-11.

Roumier T, Szabadkai G, Simoni AM, Perfettini JL, Paulau AL, Castedo M, Metivier D, Badley A, Rizzuto R, Kroemer G.

HIV-1 protease inhibitors and cytomegalovirus vMIA induce mitochondrial fragmentation without triggering apoptosis.

Cell Death Differ. 2006 Feb;13(2):348-51.

Ryan MT, Muller H, Pfanner N.

Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane.

J Biol Chem. 1999 Jul 16;274(29):20619-27.

Saeki K, Suzuki H, Tsuneoka M, Maeda M, Iwamoto R, Hasuwa H, Shida S, Takahashi T, Sakaguchi M, Endo T, Miura Y, Mekada E, Mihara K.

Identification of mammalian TOM22 as a subunit of the preprotein translocase of the mitochondrial outer membrane.

J Biol Chem. 2000 Oct 13;275(41):31996-2002.

Schatz G.

Just follow the acid chain.

Nature. 1997 Jul 10;388(6638):121-2.

Schleyer M, Neupert W.

Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes.

Cell. 1985 Nov;43(1):339-50.

Schleyer M, Neupert W.

Transport of ADP/ATP carrier into mitochondria. Precursor imported in vitro acquires functional properties of the mature protein.

J Biol Chem. 1984 Mar 25;259(6):3487-91.

Shaw JM, Nunnari J.

Mitochondrial dynamics and division in budding yeast.

Trends Cell Biol. 2002 Apr;12(4):178-84. Review.

Sherman EL, Go NE, Nargang FE.

Functions of the small proteins in the TOM complex of *Neurospora crassa*.

Mol Biol Cell. 2005 Sep;16(9):4172-82. Epub 2005 Jun 29.

Sichting M, Mokranjac D, Azem A, Neupert W, Hell K.

Maintenance of structure and function of mitochondrial Hsp70 chaperones requires the chaperone Hep1.

EMBO J. 2005 Mar 9;24(5):1046-56. Epub 2005 Feb 17.

Sikorski RS, Hieter P.

A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*.

Genetics. 1989 May;122(1):19-27.

Simon S.

Translocation of proteins across the endoplasmic reticulum.

Curr Opin Cell Biol. 1993 Aug;5(4):581-8. Review.

Simpson N, Shaw R, Crepin VF, Mundy R, FitzGerald AJ, Cummings N, Straatman-Iwanowska A, Connerton I, Knutton S, Frankel G.

The enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system effector Map binds EBP50/NHERF1: implication for cell signalling and diarrhoea.

Mol Microbiol. 2006 Apr;60(2):349-63.

Sirrenberg C, Endres M, Folsch H, Stuart RA, Neupert W, Brunner M.

Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5.

Nature. 1998 Feb 26;391(6670):912-5.

Sirrenberg C, Bauer MF, Guiard B, Neupert W, Brunner M.

Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22.

Nature. 1996 Dec 12;384(6609):582-5.

Steger HF, Sollner T, Kiebler M, Dietmeier KA, Pfaller R, Trulzsch KS, Tropschug M, Neupert W, Pfanner N.

Import of ADP/ATP carrier into mitochondria: two receptors act in parallel.

J Cell Biol. 1990 Dec;111(6 Pt 1):2353-63.

Swanton E, Buleid NJ.

Protein folding and translocation across the endoplasmic reticulum membrane.

Mol Membr Biol. 2003 Apr-Jun;20(2):99-104. Review.

Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ, Rizzuto R.

Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca²⁺ waves and protects against Ca²⁺-mediated apoptosis.

Mol Cell. 2004 Oct 8;16(1):59-68.

Taylor RD, Pfanner N.

The protein import and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane.

Biochim Biophys Acta. 2004 Jul 23;1658(1-2):37-43. Review.

Tokatlidis K, Vial S, Luciano P, Vergnolle M, Clemence S.

Membrane protein import in yeast mitochondria.

Biochem Soc Trans. 2000;28(4):495-9. Review.

Tokatlidis K, Schatz G.

Biogenesis of mitochondrial inner membrane proteins.

J Biol Chem. 1999 Dec 10;274(50):35285-8. Review.

Truscott KN, Voos W, Frazier AE, Lind M, Li Y, Geissler A, Dudek J, Muller H, Sickmann A, Meyer HE, Meisinger C, Guiard B, Rehling P, Pfanner N.

A J-protein is an essential subunit of the presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria.

J Cell Biol. 2003 Nov 24;163(4):707-13.

Ungermann C, Neupert W, Cyr DM.

The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria.

Science. 1994 Nov 18;266(5188):1250-3.

van der Bliek AM.

A mitochondrial division apparatus takes shape.

J Cell Biol. 2000 Oct 16;151(2):F1-4.

van der Laan M, Chacinska A, Lind M, Perschil I, Sickmann A, Meyer HE, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N, Rehling P.

Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor.

Mol Cell Biol. 2005 Sep;25(17):7449-58.

van Wilpe S, Ryan MT, Hill K, Maarse AC, Meisinger C, Brix J, Dekker PJ, Moczko M, Wagner R, Meijer M, Guiard B, Honlinger A, Pfanner N.

Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase.

Nature. 1999 Sep 30;401(6752):485-9.

Erratum in: *Nature.* 2000 Nov 30;408(6812):616.

Waizenegger T, Habib SJ, Lech M, Mokranjac D, Paschen SA, Hell K, Neupert W, Rapaport D.

Tob38, a novel essential component in the biogenesis of beta-barrel proteins of mitochondria.

EMBO Rep. 2004 Jul;5(7):704-9. Epub 2004 Jun 18.

Webb CT, Gorman MA, Lazarou M, Ryan MT, Gulbis JM.

Crystal structure of the mitochondrial chaperone TIM9.10 reveals a six-bladed alpha-propeller.

Mol Cell. 2006 Jan 6;21(1):123-33.

Wickner W, Schekman R.

Protein translocation across biological membranes.

Science. 2005 Dec 2;310(5753):1452-6. Review.

Wiedemann N, Truscott KN, Pfannschmidt S, Guiard B, Meisinger C, Pfanner N.

Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway.

J Biol Chem. 2004 Apr 30;279(18):18188-94. Epub 2004 Feb 20.

Wiedemann N, Kozjak V, Chacinska A, Schonfisch B, Rospert S, Ryan MT, Pfanner N, Meisinger C.

Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane.

Nature. 2003 Jul 31;424(6948):565-71.

Wiedemann N, Pfanner N, Ryan MT.

The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria.

EMBO J. 2001 Mar 1;20(5):951-60.

Yaffe MP.

The cutting edge of mitochondrial fusion.

Nat Cell Biol. 2003 Jun;5(6):497-9.

Yamamoto H, Momose T, Yatsukawa Y, Ohshima C, Ishikawa D, Sato T, Tamura Y, Ohwa Y, Endo T.

Identification of a novel member of yeast mitochondrial Hsp70-associated motor and chaperone proteins that facilitates protein translocation across the inner membrane.

FEBS Lett. 2005 Jan 17;579(2):507-11.

Yamamoto H, Esaki M, Kanamori T, Tamura Y, Nishikawa S, Endo T.

Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes.

Cell. 2002 Nov 15;111(4):519-28.

Yano M, Hoogenraad N, Terada K, Mori M.

Identification and functional analysis of human Tom22 for protein import into mitochondria.

Mol Cell Biol. 2000 Oct;20(19):7205-13.

Zara V, Ferramosca A, Papatheodorou P, Palmieri F, Rassow J.

Import of rat mitochondrial citrate carrier (CIC) at increasing salt concentrations promotes presequence binding to import receptor Tom20 and inhibits membrane translocation.

J Cell Sci. 2005 Sep 1;118(Pt 17):3985-95.

Zara V, Ferramosca A, Palmisano I, Palmieri F, Rassow J.

Biogenesis of rat mitochondrial citrate carrier (CIC): the N-terminal presequence facilitates the solubility of the preprotein but does not act as a targeting signal.

J Mol Biol. 2003 Jan 10;325(2):399-408.

Zara V, Palmisano I, Rassow J, Palmieri F.

Biogenesis of the dicarboxylate carrier (DIC): translocation across the mitochondrial outer membrane and subsequent release from the TOM channel are membrane potential-independent.

J Mol Biol. 2001 Jul 27;310(5):965-71.

Zara V, Palmieri F, Mahlke K, Pfanner N.

The cleavable presequence is not essential for import and assembly of the phosphate carrier of mammalian mitochondria but enhances the specificity and efficiency of import.

J Biol Chem. 1992 Jun 15;267(17):12077-81.

Zara V, Rassow J, Wachter E, Tropschug M, Palmieri F, Neupert W, Pfanner N.

Biogenesis of the mitochondrial phosphate carrier.

Eur J Biochem. 1991 Jun 1;198(2):405-10.

Erratum in: *Eur J Biochem.* 1991 Sep 15;200(3):812.

Abkürzungsverzeichnis

(ausgenommen sind SI-Einheiten und chemische Formeln)

A/E	<i>attachment / effacement</i>
AAC	ATP/ADP-Translokator
Abb.	Abbildung
AB-Mix	Acrylamid/Bisacrylamid-Mix
ADP	Adenosindiphosphat
AG	Arbeitsgruppe
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BN	<i>Blue Native</i>
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
CIC	Citrat-Translokator
CLSM	<i>confocal laser scanning microscopy</i>
CS	<i>Carrier Signature</i>
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DIC	Dicarboxylat-Translokator
DMSO	<i>Dimethylsulfoxid</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EACA	e-Aminocaprinsäure
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EM	EDTA MOPS

EPEC	enteropathogene <i>Eschericia coli</i>
et al.	und andere
fw	<i>forward</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GST	Glutathion-S-Transferase
HCl	Salzsäure
IgG	Immunglobulin G
IMS	Intermembranraum
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
kB	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LEE	<i>locus of enterocyte effacement</i>
Map	<i>mitochondria-associated protein</i>
MBS	Maleimidobenzoyl-N-hydroxysulfonsuccinimidester
MCF	<i>mitochondrial carrier family</i>
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
MP	Magermilchpulver
MPP	<i>matrix-processing peptidase</i>
NADH	Nikotinamiddinukleotid
NaOH	Natronlauge
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAM	<i>presequence translocase-associated motor</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pfu	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	negativ dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Konzentration
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
Ponceau S	3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4(4-sulphophylazo)2-7-naphtalin-disulfonsäure

rev	<i>reverse</i>
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAM	<i>sorting and assembly machinery</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Saccharose EDTA MOPS
SM/-ura	synthetisches Minimalmedium ohne Uracil
SUMO	<i>small ubiquitin-related modifier</i>
SW	Schwellen
TBE	Tris Borat EDTA
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	Tetramethyl-1,4-phenylendiamin
TIM	<i>translocase of the inner membrane</i>
TOB	<i>topogenesis of mitochondrial outer membrane beta-barrel proteins</i>
TOM	<i>translocase of the outer membrane</i>
Tris	N,N,N-Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	enzymatische Einheit
ü.N.	über Nacht
u.U.	unter Umständen
UV	Ultra-Violett
v/v	Volumen pro Volumen
Val	Valinomycin
vs.	versus
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
YNB	<i>yeast nitrogen base</i>
YPD	Hefeextrakt Pepton Glukose
YPG	Hefeextrakt Pepton Glycerol
z.B.	zum Beispiel

Lebenslauf

Panagiotis Papatheodorou (Diplom-Biologe)

* 07.02.1978 in Ludwigsburg, Baden-Württemberg

verheiratet, 1 Kind

griechische Staatsangehörigkeit

1984 – 1988	Flattich-Grundschule, Freiberg a.N.
1988 – 1997	Oscar-Paret-Schule, Gymnasium, Freiberg a.N.
1997 – 1999	Grundstudium der Biologie an der Universität Hohenheim
1999 – 2002	Hauptstudium der Biologie an der Universität Hohenheim
11/2001 – 08/2002	Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim „Identifizierung der mitochondrialen Zielerkennungssequenz des VacA-Toxins von <i>Helicobacter pylori</i> “
05.08.2002	Erlangung des akademischen Grades Diplom-Biologe mit der Gesamtnote 1,3
10/2002 – 12/2006	Doktorarbeit am Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim „Funktionen charakteristischer Sequenzmotive endogener und toxischer mitochondrialer Proteine“
01.12.2006	Erlangung des akademischen Grades Doktor der Naturwissenschaften mit der Gesamtnote 1,0 (<i>magna cum laude</i>)
05/1999 – 08/2000	Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart
06/2001 – 08/2001	Studentische Hilfskraft am Institut für klinische Prüfung GmbH (Veterinärmedizinisches Labor) in Ludwigsburg - Durchführung von BSE-Untersuchungen -
10/2002 – 12/2006	Wissenschaftlicher Angestellter (Doktorand) am Institut für Mikrobiologie an der Fakultät Naturwissenschaften der Universität Hohenheim
ab 01/2007	Wissenschaftlicher Angestellter (Post-Doc) am Institut für Physiologische Chemie, Abteilung Zellbiochemie, an der Medizinischen Fakultät der Ruhr- Universität Bochum

Publikationsliste

A. Originalarbeiten:

Zara V, Ferramosca A, Papatheodorou P, Palmieri F, Rassow J.

Import of rat mitochondrial citrate carrier (CIC) at increasing salt concentrations promotes presequence binding to import receptor Tom20 and inhibits membrane translocation.

Journal of Cell Science (2005) Sep 1;118(Pt 17):3985-95

Mueller JW, Kessler D, Neumann D, Stratmann T, Papatheodorou P, Hartmann-Fatu C, Bayer P.

Characterization of novel elongated Parvulin isoforms that are ubiquitously expressed in human tissues and originate from alternative transcription initiation.

BMC Molecular Biology (2006) Mar 7;7:9

Papatheodorou P, Domanska G, Oxle M, Mathieu J, Selchow O, Kenny B, Rassow J.

The enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Map effector is imported into the mitochondrial matrix by the TOM/Hsp70 system and alters organelle morphology.

Cellular Microbiology (2006) Apr;8(4):677-89

Zara V, Dolce V, Capobianco L, Ferramosca A, Papatheodorou P, Rassow J, Palmieri F.

Biogenesis of eel liver mitochondrial citrate carrier (CIC): negative charges can functionally substitute for positive charges in the presequence.

Journal of Molecular Biology (2006) Oct 28 [Epub ahead of print], DOI: 10.1016/j.jmb.2006.10.077

B. Buchbeiträge:

Papatheodorou P, Domanska G, Rassow J.

Fungal mitochondrial targeting.

Protein targeting protocols, Second Edition, Methods in Molecular Biology, Humana Press

Zur Publikation angenommen, Veröffentlichungsdatum April 2007, ISBN: 1-58829-702-0

Danksagung

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater Prof. Dr. Joachim Rassow für die Überlassung des Themas dieser Doktorarbeit, für seine sehr hilfreichen Ratschläge und für die wertvolle Unterstützung in meinem beruflichen Werdegang.

Den Kooperationspartnern aus Lecce (Italien), Newcastle (UK) und Duisburg sei hiermit auch für die effektive Zusammenarbeit gedankt.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meiner mittlerweile ans Herz gewachsenen Kollegin Dipl.-Biol. Elke Dian für die langjährige Zusammenarbeit, für die überaus großzügige Hilfsbereitschaft, für konstruktive Ideen und für die moralische Unterstützung in schwierigen, privaten Zeiten während der Promotion.

Ein großes Dankeschön möchte ich auch an Frau Elsa Seibel richten, für die freundliche Unterstützung und Hilfestellung in allen Phasen der Promotion, sowie für die stets problemlose Ausführung organisatorischer Angelegenheiten.

Allen ehemaligen und momentanen Mitgliedern des Instituts für Mikrobiologie der Universität Hohenheim, insbesondere Dr. Christian Motz, Eva Hauf, Grazyna Domanska, Olga Randelj, Penelope Strittmatter, Alexander Lang, Ioanna Bintintan und Dr. Sandy Facey, sei für die angenehme Zusammenarbeit und das freundliche Arbeitsklima gedankt.

Meinen Eltern, meiner Schwester, meinen Schwiegereltern und meinen Schwagern danke ich für den Beistand in schwierigen Zeiten der Promotion und für die finanzielle und moralische Unterstützung. Von großer Bedeutung war stets der Beistand und die Motivation meiner Ehefrau, Taipliadou Triantafillia.

Meinen ehemaligen Diplomanden Johannes Mathieu, Marius Öxle, Katrin Baltz und Maren Distel, sowie meiner Hiwi-Praktikantin Franziska Berke, danke ich für die angenehme Zusammenarbeit und für den Respekt der mir währenddessen entgegengebracht worden ist.

Bei meinen Freunden Chatzivassileiou Christos, Tsakiris Tolis, Loulas Nikos, Androniadis Amvrossios, Sidiropoulos Christos und Chatzigeorgiou Kostas bedanke ich mich für die Abwechslung und Motivation während stressiger Phasen der Promotion.

Meiner Tochter Eleni und dem (noch) ungeborenen Nachwuchs danke ich dafür, dass sie der ganzen Promotion einen Sinn geben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, Dipl.-Biol. Panagiotis Papatheodorou, dass ich die Arbeit selbständig gefertigt, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Stuttgart, den 01.08.2006

Diese Arbeit ist meinem Vater

Jiannis Papatheodorou

gewidmet.



† 16.04.2005