

Untersuchungen zur Biogenese von Proteinen in der mitochondrialen Innenmembran

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

**Fakultät für Naturwissenschaften
Universität Hohenheim**

Institut für Mikrobiologie

Vorgelegt von

Olga Randel
aus Prešov

2008

Dekan: Prof. Dr. Heinz Breer

1. berichtende Person : Prof. Dr. rer. nat Joachim Rassow
2. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat Artur Pfitzner
3. berichtende Person: Prof. Dr. rer. nat. Lutz Graeve

Mündliche Prüfung am : 22. 10. 2009

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung

- 1.1 Mitochondrien
- 1.2 Proteinimport in Mitochondrien
 - 1.2.1 Die Funktion des TOM-Komplexes
 - 1.2.2 Die Funktion der TIM-Komplexe
 - 1.2.3 Die Funktion des Oxa1
- 1.3 Die Biogenese der Proteinkomplexe der mitochondrialen Innenmembran
 - 1.3.1 Die ATP-Synthase
 - 1.3.2 Der Dicarboxylattranslokator (DIC)
 - 1.3.3 Die Biogenese des Oxa1
- 1.4 Fragestellung der Arbeit

2. Material und Methoden

2.1 Material

- 2.1.1 Chemikalien
- 2.1.2 Radiochemikalien
- 2.1.3 Enzyme
- 2.1.4 Antikörper
- 2.1.5 Antibiotika
- 2.1.6 Membranen und weitere Materialien
- 2.1.7 Geräte
- 2.1.8 Hefestämmen
- 2.1.9 Medien
- 2.1.10 Plasmide
- 2.1.11 Computerprogramme und Internetressourcen

2.2 Methoden

- 2.2.1 Molekularbiologische Methoden
 - 2.2.1.1 Plasmidisolierung
 - 2.2.1.2 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration
 - 2.2.1.3 Herstellung kompetenter *E.coli* – Zellen
 - 2.2.1.4 Herstellung kompetenter Hefezellen

-
- 2.2.1.5 Transformation von *E.coli*
 - 2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese
 - 2.2.1.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen
 - 2.2.1.8 PCR DNA-Polymerase-Kettenreaktion
 - 2.2.1.9 Konstruktion von Oxa1-HA durch homologe Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae*

 - 2.2.2 Proteinchemische Methoden
 - 2.2.2.1 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae*
 - 2.2.2.2 Zellaufschluss und Mitochondrienisolierung
 - 2.2.2.3 Proteinbestimmungen nach Bradford
 - 2.2.2.4 Bestimmungen des Membranpotentials der Mitochondrien
 - 2.2.2.5 Radioaktive Markierungen von Vorstufenproteinen in vitro
 - 2.2.2.6 Import radioaktiv markierter Vorstufenproteine in die Mitochondrien
 - 2.2.2.7 Quervernetzen
 - 2.2.2.8 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
 - 2.2.2.9 Blaue Nativgelelektrophorese
 - 2.2.2.10 Zweidimensionale (2D-) Gelelektrophorese
 - 2.2.2.11 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Coomassie Blue
 - 2.2.2.12 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Silbersalzen
 - 2.2.2.13 Western-Blotting
 - 2.2.2.14 Schwellen von Mitochondrien
 - 2.2.2.15 Carbonatextraktion mitochondrialer Proteine
 - 2.2.2.16 Ultraschallbehandlung
 - 2.2.2.17 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure
 - 2.2.2.18 Saccharosegradient
 - 2.2.2.19 Nickelsäulereinigung
 - 2.2.2.20 Autoradiographie von Gelen und Membranen

 - 2.2.3 Immunologische Methoden
 - 2.2.3.1 Immunologischer Nachweis – Enzym Immuno Assay
 - 2.2.3.2 Immunoprecipitation
 - 2.2.3.3 Koimmunopräzipitation

3. Ergebnisse

3.1 Biogenese der ATP-Synthase

- 3.1.1 Untersuchung der ATP-Synthase durch Blaue Nativgelelektrophorese
- 3.1.2 Nachweis von Defekten in der Assemblierung der ATP-Synthase
- 3.1.3 Assemblierung neu importierter Untereinheiten
- 3.1.4 Assemblierung der γ -Untereinheit

3.2 Biogenese des Dicarboxylattranslokators

- 3.2.1 Import des Dicarboxylattranslokators
- 3.2.2 Chemische Quervernetzung des Dicarboxylattranslokators mit dem Tim9/Tim10-Komplex

3.3 Biogenese des Oxa1 Proteins

- 3.3.1 Membraninsertion des Helices 4 und 5 des Oxa1
- 3.3.2 Assoziation des neu importierten Oxa1 mit Tim23
- 3.3.3 Komplexbildung des nativen Oxa1 in der Innenmembran
- 3.3.4 Funktion des mtHsp70 in der Biogenese des Oxa1

4. Diskussion

- 4.1 Assemblierung der mitochondrialen ATP-Synthase
- 4.2 Biogenese des Dicarboxylattranslokators
- 4.3 Biogenese und Funktion des Oxa1
- 4.4 Proteintransport in Mitochondrien und in Bakterien

5. Zusammenfassung/Summary

6. Literatur

7. Anhang

- Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen
- Lebenslauf
- Publikationen
- Danksagung
- Erklärung

1. Einleitung

Mitochondrien sind Zellorganelle, die viele Ähnlichkeiten zu den Eubakterien zeigen, und es ist eine gut begründete Vermutung, dass es sich bei den heutigen Mitochondrien um Nachkommen endosymbiontischer bakterieller Vorfahren handelt. Nachdem die weitaus meisten mitochondrialen Proteine im Kern der eukaryontischen Zelle kodiert sind, ergibt sich die Frage, welche Mechanismen die Mitochondrien im Laufe der Evolution entwickelt haben, um diese Proteine aus dem Cytosol aufzunehmen und gezielt in den verschiedenen mitochondrialen Kompartimenten zu funktionellen Komplexen zusammen zu setzen. In welchem Umfang sind dabei Prinzipien der prokaryontischen Vorfahren erhalten geblieben? Welche Mechanismen wurden im Kontext der eukaryontischen Zelle neu entwickelt? In der vorliegenden Arbeit wurde diesen Fragen nachgegangen, indem die Biogenese dreier kernkodierter Proteine näher untersucht wurde, die nach Translokation über die Außenmembran in Komplexen der mitochondrialen Innenmembran assemblieren. Als Modellproteine dienten die γ -Untereinheit der F_1 -ATPase ($F_1\gamma$), der Dicarboxylattranslokator (*Dicarboxylate carrier*, DIC), sowie ein Protein, das seinerseits an der Biogenese der Cytochromoxidase beteiligt ist (*Oxidase assembly*), das Protein Oxa1. Als Modellorganismus diente in diesen Untersuchungen die Bäckerhefe, *Saccharomyces cerevisiae*.

1.1 Mitochondrien

Mitochondrien sind in unterschiedlicher Anzahl in fast allen eukaryontischen Zellen vorhanden. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* bilden die Mitochondrien ein variables Netzwerk, so dass sich einzelne Mitochondrien in den intakten Zellen kaum abgrenzen lassen. In den Geweben der Wirbeltiere enthalten die Zellen hingegen zwischen 500 und 1500 separate Mitochondrien, die sich lichtmikroskopisch als ca. 0,5 μm dünne und meist mehrere Mikrometer lange Strukturen darstellen lassen (Schmidt und Unsicker, 2003). Im Zellzyklus der eukaryontischen Zellen werden die Mitochondrien niemals gänzlich neu gebildet. Vielmehr vermehren sich die vorhandenen Mitochondrien durch Wachstum und Teilung (Attardi und Schatz, 1988). Die Ribosomen der Mitochondrien enthalten eine 16S-rRNA, deren Basensequenz die Verwandtschaft der Mitochondrien zu den Prokaryonten eindrucksvoll bestätigt. Als nächste Verwandte der Mitochondrien wurden unter den Prokaryonten die Rickettsien identifiziert, die zu den α -Proteobakterien gehören (Whatley, 1981; Gray et al, 1999; Emelyanow, 2001).

Vermutlich wurden die Vorfahren der heutigen Mitochondrien vor ca. 2 Milliarden Jahren durch Endosymbiose von eukaryontischen Wirtszellen aufgenommen (Margulis, 1981; Schmidt und Unsicker, 2003). Viele Proteine, die ursprünglich vom Genom des Endosymbionten kodiert wurden, sind offenbar in abgewandelter Form bis heute in den Mitochondrien erhalten geblieben. Dieses gilt etwa für die Komplexe der Atmungskette und der ATP-Synthase, sowie für die Chaperonproteine mtHsp70 und Hsp60 (Neupert, 1997; Rassow und Pfanner, 1995). Im Verlauf der gemeinsamen Evolution von Endosymbiont und Wirtszelle wurde allerdings der überwiegende Teil der Gene des Endosymbionten in das Genom der Wirtszelle transferiert, so dass die Mehrzahl der mitochondrialen Proteine im Kern der Zelle codiert wird (Hartl und Neupert, 1990). In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sind lediglich 8 mitochondriale Proteine von der mitochondrialen DNA kodiert, alle übrigen Proteine sind kernkodiert (Foury et al., 1998; Borst und Givell, 1978). Das humane mitochondriale Genom kodiert 13 Proteine, bei denen es sich ausnahmslos um Untereinheiten der Atmungskette bzw. der ATP-Synthase handelt. Die kerncodierten Proteine werden im Cytosol translatiert und überwiegend posttranslational in die Mitochondrien importiert (Stojanovski et al, 2003; Pfanner und Geissler, 2001; Hoogenraad und Ryan, 2001; Neupert, 1997; Hartl und Neupert, 1990).

Die Strukturen und Mechanismen, die am mitochondrialen Proteinimport beteiligt sind, wurden in den vergangenen 20 Jahren vor allem unter Verwendung der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* und des Roten Brotschimmels *Neurospora crassa* untersucht (Herrmann und Neupert, 2000; Neupert, 1997 ; Pfanner et al, 1997; Yaffe, 1999; Horwich, 1990; Attardi und Schatz, 1988). Beide Organismen sind als Modellorganismen für Untersuchungen zum mitochondrialen Proteinimport besonders gut geeignet. Die Bäckerhefe bietet zudem den Vorteil, vielfältige genetische Methoden nutzen zu können.

Kerncodierte Proteine, die aus dem Cytosol aufgenommen wurden, müssen anschließend auf die vier Subkompartimente der Mitochondrien verteilt werden, also auf die Außenmembran, den Intermembranraum, die Innenmembran, und die Matrix. Dieser Prozess wird als Sortierung bezeichnet (engl. *sorting*). Die beiden mitochondrialen Membranen haben unterschiedliche Aufgaben und müssen deshalb auch unterschiedliche Proteine enthalten. Die Innenmembran zeigt zahlreiche Ausstülpungen in den Matrixraum, die so genannten Cristae. Nach neueren Daten sind die Hohlräume der Cristae lediglich durch sehr schmale Kanäle mit dem Intermembranraum verbunden, der sich unmittelbar unter der Außenmembran befindet.

Die Hohlräume der Cristae können deshalb mit einem gewissen Recht als separate Subkompartimente angesehen werden (Strauss et al., 2008; Frey und Mannella, 2000).

Die Membranen der Mitochondrien sind nicht nur Permeabilitätsbarrieren, vielmehr enthalten sie auch eine Vielzahl an Proteinkomplexen, die einen kontrollierten Transport von Stoffen über die Membranen vermitteln. Auf der Basis neuerer Untersuchungen zum Proteom der Mitochondrien wird vermutet, dass die Mitochondrien der Säugetiere etwa 1000 – 2000 unterschiedliche Proteine enthalten (Meisinger et al., 2008; Neupert und Herrmann, 2007; Stojanovski et al., 2003; Sickmann et al., 2003). In den Mitochondrien von *S. cerevisiae* werden insgesamt ca. 1000 Proteine vermutet (Prokisch et al., 2004). In der Innenmembran dominieren Proteine, die direkt oder indirekt an der mitochondrialen ATP-Synthese beteiligt sind. So stellen die Atmungskettenkomplexe und die ATP-Synthase einen erheblichen Anteil der Proteine. Das häufigste Protein der Innenmembran ist der ADP/ATP-Translokator (ADP/ATP carrier, AAC). In der Außenmembran zählen porenbildende Porine zu den häufigsten Proteinen. Ein erstaunlich großer Anteil der Proteine ist in der Außenmembran zudem an der Aufnahme der kernkodierte mitochondrialen Proteine aus dem Cytosol beteiligt.

1.2 Proteinimport in Mitochondrien

Bislang sind fünf Proteinkomplexe bekannt, die an der Translokation von Polypeptidketten über oder in die mitochondrialen Membranen beteiligt sind (Neupert und Herrmann, 2007; Bolender et al., 2008):

(1.) Der TOM-Komplex

In der Außenmembran befindet sich die *Translocase of the outer Membrane* (TOM). Der TOM-Komplex ist sowohl für die Translokation von Proteinen über die Außenmembran verantwortlich, als auch an der Insertion von Proteinen in diese Membran beteiligt.

(2.) Der SAM-Komplex

Der SAM-Komplex vermittelt die Insertion und Assemblierung (*Sorting and assembly*) der β -barrel-Proteine in der mitochondrialen Außenmembran. So werden die mitochondrialen Porine zunächst unter Vermittlung des TOM-Komplexes aufgenommen und dann mit Hilfe des SAM-Komplexes in die Lipidphase der Außenmembran integriert. Interessanterweise hat die Untereinheit Sam50 des SAM-Komplexes eine deutliche Sequenzähnlichkeit zum Omp85, das in der Außenmembran Gram-negativer Bakterien an der Biogenese der β -barrel-Proteine

beteiligt ist. In einer alternativen Nomenklatur wird der SAM-Komplex auch als TOB-Komplex bezeichnet (*Translocation and sorting of beta-barrel proteins*).

(3.) Der TIM23-Komplex

Die Translokation von Polypeptiden vom Intermembranraum in die Matrix wird durch den TIM23-Komplex vermittelt (*Translocase of the mitochondrial inner Membrane*). Der Komplex kooperiert mit dem Hitzeschockprotein mtHsp70 der mitochondrialen Matrix, das dem TIM23-Komplex, zusammen mit weiteren assoziierten Proteinen, als Motor-Einheit dient.

(4.) Der Tim22-Komplex

Der TIM22-Komplex vermittelt die Insertion neu synthetisierter Metabolitranslokatoren in die Innenmembran. Interessanterweise sind sich die namengebenden Untereinheiten Tim22 und Tim23 der jeweiligen TIM-Komplexe in ihrer Struktur sehr ähnlich.

(5.) Der Oxa1-Komplex

Oxa1 ist ein Protein der mitochondrialen Innenmembran, das an der Biogenese bestimmter Innenmembranproteine beteiligt ist. Ursprünglich wurde es in einem genetischen Verfahren identifiziert, in dem Komponenten gesucht wurden, die an der Biogenese der Cytochromoxidase (*OXidase Assembly*) beteiligt sind. Oxa1 zeigt eine deutliche Ähnlichkeit zum prokaryontischen Protein YidC, das offenbar eine ähnliche Funktion hat wie das Oxa1.

Alle diese genannten Proteinkomplexe erkennen ihre Substrate anhand definierter Zielerkennungssignale, durch die sich die mitochondrialen Proteine von anderen Proteinen der Zelle unterscheiden (Neupert, 1997; Schatz und Dobberstein, 1996). Mitochondriale Proteine, die von den Ribosomen im Cytosol neu synthetisiert werden, binden bereits während der Translation an verschiedene Chaperonproteine, u.a. an Mitglieder der Hsp70-Familie. Im Komplex mit den Chaperonproteinen werden die neu synthetisierten Proteine in einem translokationsfähigen Zustand zu den Mitochondrien geleitet. Hier vermitteln die Zielerkennungssignale der Vorstufenproteine die Erkennung durch die Komponenten der Proteinimportmaschinerie (Neupert und Herrmann, 2007; Künkele et al, 1998).

Die meisten mitochondrialen Proteine enthalten zunächst an ihrem Aminoterminus eine Präsequenz von ca. 15-40 Aminosäuren. Die Präsequenzen enthalten auffällig viele hydrophile, hydroxylierte, und positiv geladene Aminosäurereste, während negative Ladungen in der Regel fehlen. Aufgrund ihrer Aminosäuresequenz können Präsequenzen leicht eine amphipathische α -Helix bilden (Abe et al, 2000; Wang und Weiner, 1994; Blobel, 1980). Mitochondriale Präsequenzen dieser Struktur führen in den meisten Fällen zu einer

Sortierung des entsprechenden Proteins in die mitochondriale Matrix. Sobald die Präsequenzen die Matrix erreicht haben, werden sie dort von einem bestimmten Enzym abgespalten, so dass aus dem Vorstufenprotein (engl. *preprotein* oder *precursor protein*) ein entsprechend kleineres reifes Protein (engl. *mature protein*) entsteht. Es gibt aber auch Beispiele, in denen das Protein, nachdem die N-terminale Signalsequenz die Matrix erreicht hat, in die Innenmembran inseriert. Mitunter ist das Protein, etwa das Cytochrom b_2 der Hefe, nach proteolytischer Prozessierung im Intermembranraum lokalisiert (Gärtner et al., 1995; Rojo et al., 1998).

1.2.1 Die Funktion des TOM-Komplexes

Der TOM-Komplex bildet mit Hilfe seiner Komponente Tom40 die zentrale Eintrittsstelle nahezu sämtlicher mitochondrialer Proteine (Rehling et al., 2001; Paschen und Neupert, 2001; Pfanner und Geissler, 2001). Tom40 kooperiert mit zwei unterschiedlichen Rezeptorsystemen, Tom20/Tom22 und Tom70, die ebenfalls Bestandteile des TOM-Komplexes sind (Abb.1; Pfanner et al., 1996). Tom20 und Tom22 erkennen gemeinsam die positiv geladenen Präsequenzen, die von den meisten Vorstufenproteinen exponiert werden, und erleichtern den Eintritt der Vorstufenproteine in den Tom40-Kanal. Tom20 dient zudem als primäre Bindestelle für einige Proteine, die keine Präsequenz haben, wie z.B. das Außenmembranprotein Porin. Tom22 ist ein Protein, das an seiner zytosolischen Seite mehrere negative Ladungen trägt, die vermutlich direkt an die positiven Ladungen der helikalen Präsequenzen binden. Tom20 scheint hingegen mit den ungeladenen Seiten der amphipathischen α -Helices in Wechselwirkung zu treten (Yano et al, 2000; Brix et al., 1997; Dietmeier et al., 1997). Tom70 dient hauptsächlich als Rezeptor für den AAC und andere Mitglieder der Familie der mitochondrialen Metabolitranslokatoren (Brix et al, 1997; 1999). Diese Proteine tragen keine Präsequenz, vielmehr sind interne Sequenzabschnitte für die Wechselwirkung mit Tom70 verantwortlich (Wiedemann et al., 2001). Teilweise scheint am Import dieser Proteine auch Tom20 beteiligt zu sein (Pfanner und Geissler, 2001).

Nach der Bindung der Vorstufenproteine an die Importrezeptoren Tom20/Tom22 bzw. an Tom70 werden alle Proteine der gleichen Importpore übergeben, die im Wesentlichen von Tom40 gebildet wird (Hill et al., 1998; Baker et al., 1990). Die Stabilität des Komplexes aus Tom40 und den Importrezeptoren wird teilweise von einigen kleinen Tom-Proteinen moduliert, die ebenfalls Bestandteile des TOM-Komplexes sind. Es handelt sich um die Proteine Tom5, Tom6, Tom7 (Pfanner und Geissler, 2001). Der porenbildende Hauptbestandteil des TOM-Komplexes ist aber das Kanalprotein Tom40, das eine Pore von

ca. 2 nm Durchmesser bildet. Tom40 scheint fast vollständig in der Außenmembran eingebettet zu sein (Hönlinger et al, 1996). Vermutlich enthält es 8-10 antiparallele β -Stränge (Ahting et al, 2001). Jeder TOM-Komplex enthält mehrere Tom40-Proteine, wobei vermutet wird, dass zwei Tom40-Proteine jeweils eine Pore bilden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen zweigen die TOM-Komplexe zwei bis drei Poren (Ahting et al, 1999; van Wilpe et al, 1999; Künkele et al., 1998).

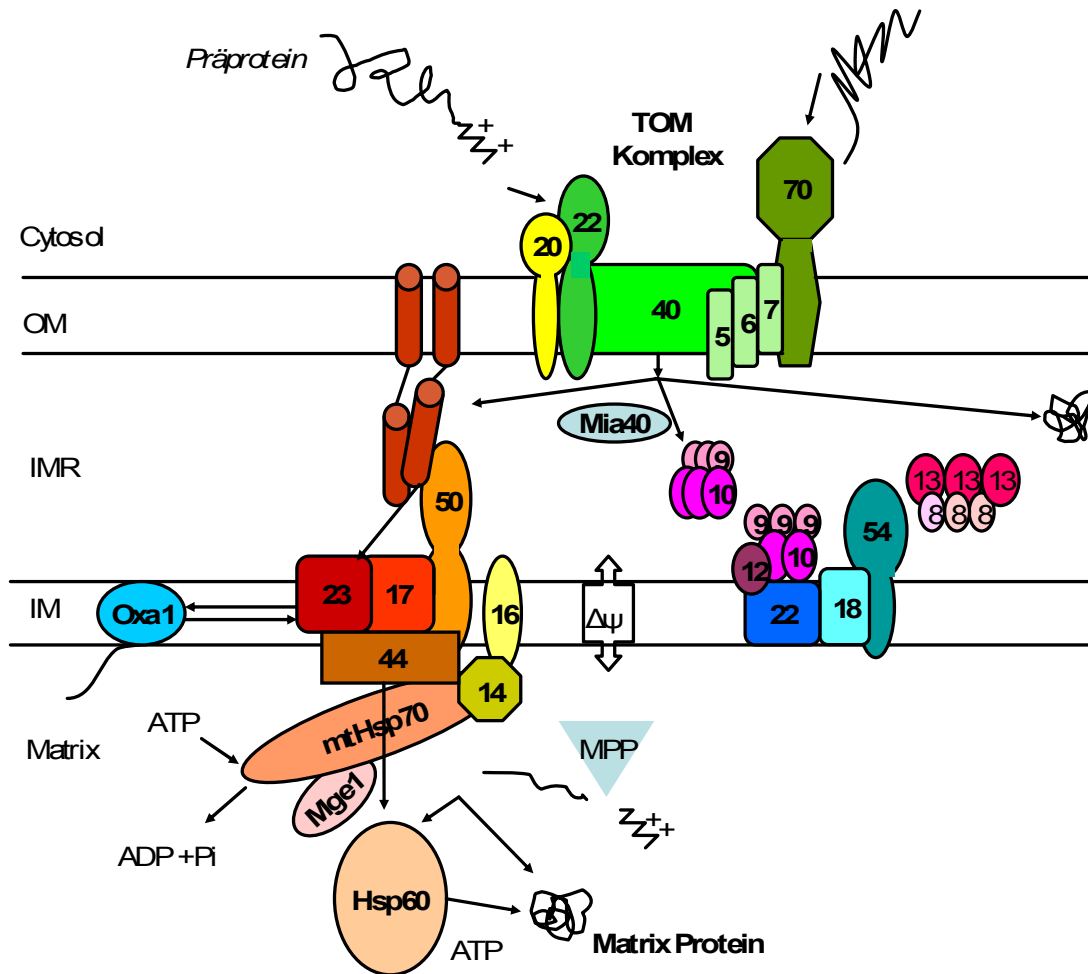


Abb. 1: Schematische Darstellung der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie

1.2.1 Die Funktion der TIM-Komplexe

Der TIM22-Komplex

Über den TIM22-Komplex werden Proteine mit internen Signalsequenzen aufgenommen. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um Proteine mit mehreren Transmembranregionen, die letztlich in die Innenmembran eingelagert werden. Hierzu gehört der ADP/ATP Translokator

und ihm verwandte Proteine. Es ist auffällig, dass die Mitglieder dieser Proteinfamilie in der Regel keine Präsequenz tragen. Tim22 bildet zusammen mit Tim22, Tim54, Tim18 und Tim12 einen Komplex von ca. 300 kDa. Das Protein Tim54 exponiert eine große Domäne in den Intermembranraum (Kerscher et al, 1997). Es ist nicht eindeutig geklärt, ob Tim54 der Bindung von Präsequenzen oder der Stabilisierung des Komplexes dient. Die Insertion der Proteine in die Tim22-Pore erfordert das mitochondriale Membranpotential (Rehling et al., 2003). In Abwesenheit des Membranpotentials akkumulieren die neu importierten Proteine im Intermembranraum (Zara et al., 2001; Rassow und Pfanner, 1991).

Die kleinen Tim-Proteine des Intermembranraumes

Der TIM23-Komplex kooperiert mit einer Gruppe kleiner Proteine des Intermembranraumes, Tim8, Tim9, Tim10, und Tim12, die neu synthetisierte Metabolittranslokatoren am TOM-Komplex aufnehmen und zum TIM22-Komplex transportieren (Webb et al, 2006; Sirrenberg et al, 1996; 1998; Kerscher et al, 2000; 1997; Adam et al, 1999; Koehler et al, 1998a; 1998b; 2000). Indem die kleinen Tim-Proteine die gebundenen Membranproteine vor Aggregation schützen, haben sie die Funktion von Chaperonproteinen. Drei Tim9 und drei Tim10 bilden jeweils einen gemeinsamen hexameren Komplex, der beim Import der Metabolittranslokatoren eine entscheidende Rolle spielt. Ein ähnlicher heterooligomerer Komplex wird von Tim8 und Tim13 gebildet. Dieser Komplex scheint allerdings nur an der Biogenese einer kleinen Zahl an mitochondrialen Proteinen beteiligt zu sein. Im Gegensatz zu Tim9 und Tim10 sind Tim8 und Tim13 in der Hefe nicht essentiell (Paschen et al, 2000).

Der TIM23-Komplex

Proteine, die aminoterminalen Präsequenzen enthalten, werden von einem Komplex aufgenommen, der Tim23 als porenbildende Komponente enthält (Truscott et al., 2001; Paschen und Neupert, 2001; Moro et al, 1999; Berthold et al, 1995; Kübrich et al., 1994; Dekker et al., 1993). Außerdem benötigen einige monotopie Innenmembranproteine (wie die Lactatdehydrogenase oder die Untereinheit Va der Cytochrom c-Oxidase) den TIM23-Komplex für ihre Membraninsertion (Gärtner et al., 1995; Rojo et al, 1998). Für einige Vorstufenproteine wurde gezeigt, dass die Translokation über die Innenmembran auch unabhängig von der Außenmembran und somit auch unabhängig vom TOM-Komplex erfolgen kann (Hwang et al, 1989). Der TIM23-Komplex kann die positiv geladenen Präsequenzen nur in Gegenwart des Membranpotentials aufnehmen. Für die anschließende

Translokation des Polypeptides wird ein ATP-abhängiger Importmotor als zweite Energiequelle benötigt (Pfanner und Geissler, 2001; Rassow et al., 1999; 1994).

Der TIM23-Komplex enthält die integralen Membranproteine Tim23 und Tim17, an der Matrixseite ist das Protein Tim44 assoziiert (Emtage und Jensen, 1993; Maarse et al, 1992; Blom et al, 1993; 1995; Schatz und Dobberstein, 1996; Bauer et al, 1996; Ryan et al, 1994). Die Funktion des Tim17 ist bislang ungeklärt. Eine weitere Komponente des TIM23-Komplexes ist Tim50. Es scheint eine Rolle in der Weitergabe der Vorstufenproteine vom TOM-Komplex an den Tim23-Translokationskanal zu spielen (Guo et al., 2004; Geissler et al, 2002; Mokranjac et al, 2003; Chacinska et al. 2003; Yamamoto et al, 2002).

Der PAM-Komplex

Vorstufenproteine inserieren in Gegenwart des Membranpotentials mit ihrer positiv geladenen Präsequenz in den Importkanal des TIM23-Komplexes. Die weiteren Schritte der Translokation sind vom Membranpotential unabhängig, benötigen aber ATP als Energiequelle. Das ATP-hydrolysierende System ist in diesem Kontext der PAM-Komplex, der *Presequence translocase-associated motor*. Dem PAM-Komplex werden derzeit fünf Komponenten zugerechnet: das mitochondriale Hitzeschockprotein mtHsp70, das Protein Tim44 als Adaptorprotein zur Verbindung des mtHsp70 mit dem Tim23, der Nukleotid-Austauschfaktor Mge1, die J-Proteine Pam 16 und Pam18, sowie das Protein Pam17 (Bolender et al., 2008).

mtHsp70 ist für die ATP-abhängigen Schritte des Proteinimportes verantwortlich. Es bindet in seiner N-terminalen Domäne ATP, das im Zusammenhang der Translokation der Vorstufenproteine zu ADP hydrolysiert wird. Mge1 (das mitochondriale Äquivalent des prokaryontischen GrpE) fördert die Freisetzung von Nukleotiden von mtHsp70 und greift damit in den Reaktionszyklus des mtHsp70 ein. In Ergänzung zum Mge1 sind auch Pam18 und Pam16 an der Regulation Aktivität des mtHsp70 beteiligt. Beide Proteine werden benötigt, um Proteine in die Matrix zu importieren. Interessanterweise sind Pam18 und Pam16 hingegen nicht erforderlich, wenn neu importierte Proteine nach Insertion in den TIM23-Komplex unmittelbar in die Innenmembran eingelagert werden. Pam16 und Pam18 bilden einen heterodimeren Komplex. Pam17 scheint in die Wechselwirkungen beider Proteine einzugreifen (van der Laan, 2005; D'Silva et al., 2005; Li et al., 2004; Frazier et al., 2004).

Das mechanistische Prinzip, das die Aktivität des mtHsp70 beim Import mitochondrialer Proteine bestimmt, ist noch nicht befriedigend geklärt. Insbesondere ist weiterhin unklar, ob

oder in welchem Umfang ATP-abhängige Konformationsänderungen des mtHsp70 unmittelbar für den Mechanismus der Translokation von Bedeutung sind. Weitgehend akzeptiert ist das Modell des *Brownian ratchet* (Brownsche Sperrklinke; Neupert und Brunner, 2002; Okamoto et al., 2002; Ungermann et al., 1994; 1996; Hartl, 1996). In diesem Modell wird postuliert, dass die Präsequenz eines translozierenden Proteins an das mtHsp70 bindet, sobald die Präsequenz die Matrixseite des TIM23-Komplexes erreicht. Abhängig von ATP löst sich der Komplex aus mtHsp70 und Präsequenz vom TIM23-Komplex ab und zieht das Vorstufenprotein weiter in die Matrix hinein. Entscheidend ist in diesem Modell die Voraussetzung, dass die Vorstufenproteine im TIM23-Kanal frei beweglich sind und ungerichtet Brownsche Molekularbewegungen zeigen. mtHsp70 hat im wesentlichen nur eine passive Funktion, indem es die jeweils in der Matrix exponierten Segmente des Vorstufenproteins fixiert und ein Zurückgleiten verhindert. Die Präsequenz wird dann sehr schnell von der Matrixprozessierungspeptidase (MPP) abgespalten und das prozessierte Protein wird im Verlauf mehrerer Reaktionszyklen des mtHsp70 sukzessiv in die Matrix gezogen (Voisine et al., 1999; Voos et al., 1996; Hartl, 1996; Rassow et al., 1990).

1.2.3 Die Funktion des Oxa1

Proteine gelangen auf unterschiedlichen Wegen in die mitochondriale Innenmembran. Die Mitglieder der Familie der Metabolitranslokatoren werden unter Vermittlung des TIM22-Komplexes importiert, andere Proteine, wie das Cytochrom b_2 der Bäckerhefe, werden unter Beteiligung des TIM23-Komplexes aufgenommen. Schließlich wurde für mehrere der mitochondrial kodierten Proteine nachgewiesen, dass sie - unabhängig von diesen Komplexen – mit Hilfe der Oxa1-Translokase in die Innenmembran gelangen (Hell et al., 2004; 2001; 1998; 1997; Stuart et al, 2002; Rojo et al, 1999; Herrmann et al, 1997). Die Oxa1-Translokase kann als Insertionsmaschinerie der mitochondrialen Innenmembran angesehen werden (Ii und Mihara, 2001; Lemaire et al, 2000; Hamel et al, 1997).

Oxa1 (*cytochrom oxidase assembly 1*) ist über fünf membranspannende Segmente in die mitochondriale Innenmembran eingelagert (Abb. 2; Herrmann et al., 1997). Für das Oxa1 von *Neurospora crassa* wurde gezeigt, dass es in der Innenmembran tetramere homooligomere Komplexe bildet (Nargang et al., 2002). In der Innenmembran ist Oxa1 nicht nur an der Assemblierung mitochondrial kodierter Proteine beteiligt, sondern auch an der Biogenese verschiedener kernkodierter Proteine (Stuart, 2002; Hell et al., 2001; 1998; 1997; He und Fox, 1997). So benötigt die Untereinheit 2 der Cytochrom c-Oxidase (Cox2) die Oxa1-Translokase

für die Insertion ihres N-Terminus in die Innenmembran (Hermann, 2004; Hell et al., 1997). Beteiligt ist Oxa1 auch an der Membraninsertion der Untereinheiten Cox1 und Cox3 (Hell et al., 1998). Defekte des Oxa1 führen zu erheblichen Defekten der Atmungskette (Bonney et al., 1994a; Bauer et al., 1994; Altamura et al., 1996), aber auch zu Defekten in der Biogenese der ATP-Synthase (Bonney et al., 2000). Schließlich ist das Oxa1 auch an seiner eigenen Biogenese beteiligt (Hell et al., 1998).

Homologe des Oxa1 wurden auch in Prokaryonten nachgewiesen. Oxa1 und das YidC, welches in *E.coli* für die Insertion mancher Proteine zuständig ist, sind orthologe Proteine (Kuhn et al., 2003). Oxa1 kann somit dem prokaryontischen Erbe der Mitochondrien zugeordnet werden (Kuhn et al., 2003; Beck et al., 2001; Urbanus et al., 2002; Scotti et al., 2000; Sääf et al., 1998; Samuelson et al., 2000; Luirink et al., 2001; Yen et al., 2001). In Chloroplasten wurde das homologe Alb3 gefunden, das an der Biogenese von Proteinen der Thylakoidmembran beteiligt ist (Sundberg et al., 1997; Moore et al., 2000).

In Prokaryonten kann die Insertion von Proteinen in die Plasmamembran entweder über einen Sec-abhängigen oder einen Sec-unabhängigen Mechanismus erfolgen (de Gier und Luirink, 2001). Beim Sec-abhängigen Transport nutzen die Proteine die SecYEG-Translokase, um sich in die Membran einzulagern oder über die Membran zu translozieren (Economou, 1999; Wickner und Leonard, 1996). Ergänzend zur SecYEG-Translokase ist auch das Oxa1-Homolog YidC an der Insertion von Proteinen in die Plasmamembran beteiligt (de Gier und Luirink, 2001; Dalbey und Kuhn, 2000; Samuelson et al., 2000). YidC steht mit der Sec-Translokase in engem Kontakt (Luirink et al., 2001; Houben et al., 2000). Es ist deshalb bemerkenswert, dass in Mitochondrien keine Sec-Maschinerie identifiziert werden konnte (Glick und von Heijne, 1996).

Daten zum Oxa1 aus *S. cerevisiae* wurden erstmals 1994 veröffentlicht (Bonney et al., 1994a; 1994b; Bauer et al., 1994). Oxa1 ist im Zellkern kodiert und wird im Cytosol als Vorstufenprotein von 44,8 kDa synthetisiert. Es hat eine aminoterminal Signalsequenz von 42 Aminosäuren, die in der Matrix vom Prozessierungsenzym MPP abgespalten wird (Herrmann et al., 1997).

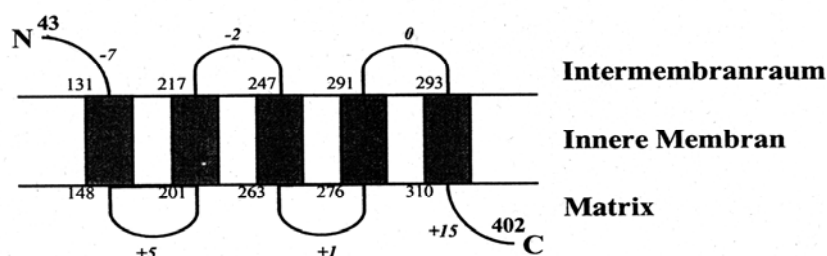


Abb.2: Schematische Darstellung der Topologie des Oxa1 Proteins

1.3 Die Biogenese der Proteinkomplexe in der mitochondrialen Innenmembran

Die meisten Studien zum mitochondrialen Proteintransport konzentrierten sich bislang auf die Frage, wie die kernkodierte Vorstufenproteine von den Mitochondrien aus dem Cytosol aufgenommen werden (Neupert, 1997; Neupert und Herrmann, 2007). Mit dem Import in die Mitochondrien ist die Biogenese der mitochondrialen Proteine allerdings noch nicht beendet. Alle neu importierten Proteine müssen durch geeignete Mechanismen der Sortierung gezielt auf die verschiedenen mitochondrialen Kompartimente verteilt werden, und viele Proteine üben ihre Funktion letztlich als Bestandteile größerer Proteinkomplexe aus. Es ist also zu klären, wie die verschiedenen Proteine in den letzten Schritten ihrer Biogenese zu Proteinkomplexen assembliert werden. In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die Mechanismen der Sortierung und Assemblierung am Beispiel mitochondrialer Innenmembranproteine näher untersucht. Als Modellproteine wurden dabei drei Proteine verwendet, nämlich (1.) die γ -Untereinheit der F_1 -ATPase ($F_{1\gamma}$), (2.) der Dicarboxylat-translokator (*Dicarboxylate carrier*, DIC), sowie (3.) das Protein Oxa1.

1.3.1 Die ATP-Synthase

Mitochondrien, Chloroplasten und Bakterien enthalten ähnlich aufgebaute F_0F_1 -ATP-Synthasen, die in den jeweiligen Zellen den größten Anteil des ATP synthetisieren (Boyer, 1997). Der englische Biochemiker Peter Mitchell veröffentlichte im Jahre 1961 eine chemiosmotische Hypothese zur Funktion dieses Enzyms, die inzwischen in wesentlichen Aspekten bestätigt wurde. Die ATP-Synthase wird von einem Protonengradienten angetrieben, der durch die Atmungskette aufgebaut wird (Mitchell, 1961). Abhängig vom Protonengradienten kommt es in der ATP-Synthase zu Konformationsänderungen, die ausgehend von ADP und Phosphationen eine Synthese von ATP ermöglichen.

Die ATP-Synthase besteht im Wesentlichen aus einem F_0 -Teil und einem F_1 -Teil (Boyer, 1997). Der F_0 -Teil ist in die Innenmembran eingebettet und enthält einen Protonen-Kanal. Der hydrophile F_1 -Teil ragt in die Matrix hinein und enthält drei katalytisch aktive Zentren. Diese werden von insgesamt drei α - und drei β -Untereinheiten gebildet (Abrahams et al., 1994). Der F_1 -Teil lässt sich leicht vom F_0 -Teil abtrennen, verliert dabei aber seine Fähigkeit zur (netto) ATP-Synthese, da die treibende Kraft aus dem Protonengradienten nur in enger Verbindung mit dem F_0 -Teil für die ATP-Synthase zur Verfügung steht. Im Jahre 1994 wurde die erste Röntgenkristallstruktur des F_1 -Teils (ohne die Untereinheiten ϵ , δ), zusammen mit

Teilen der zentralen γ -Untereinheit von der Arbeitsgruppe von John E. Walker veröffentlicht (Abrahams et al., 1994). Die Kristallstruktur zeigt die drei α - und die drei β -Untereinheiten alternierend in einem Ring von etwa 100 Å angeordnet. Die γ -Untereinheit liegt U-förmig in der Mitte des Ringes, wobei in der Kristallstruktur lediglich die langen α -Helices des N- und des C-Terminus der γ -Untereinheit zu erkennen sind. Sie bilden gleichsam die Achse des gesamten Komplexes.

Die ATP-Synthase aus *E. coli* hat die Zusammensetzung $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\varepsilon$ (Boyer, 1997; Yoshida et al., 2001). Die γ - und ε - Untereinheiten bilden die zentrale Verbindung zwischen dem F_0 - und dem F_1 -Teil (Gibbons et al., 2000). Der F_0 -Teil enthält eine ringförmige Struktur, die als Rotor der ATP-Synthase bezeichnet wird. Der Rotor wird in *E. coli* vermutlich aus zwölf c-Untereinheiten gebildet. Jede c-Untereinheit des Rotors kann reversibel ein Proton aufnehmen. Die Funktion des Rotors wird von Wechselwirkungen der c-Untereinheiten mit der a-Untereinheit des F_0 -Teiles bestimmt. Indem durch den Spalt zwischen der a-Untereinheit und dem Rotor Protonen fließen, werden die Protonenbindestellen der c-Untereinheiten besetzt, und der Rotor dreht sich relativ zur a-Untereinheit. Die ε -Untereinheit bildet wahrscheinlich einen Teil des Stiels, der den F_0 -Teil mit dem F_1 -Teil verbindet. Ein zweiter Stiel wird unter Beteiligung der δ -Untereinheit gebildet. Dieser zweite Stiel wird als Stator bezeichnet. Er verbindet die beiden Teile der ATP-Synthase an ihrer Außenseite. Seine Funktion besteht darin, den F_1 -Teil relativ zum F_0 -Teil zu fixieren, während sich die im Rotor verankerte γ -Untereinheit dreht (Gibbons et al., 2000). Die γ -Untereinheit löst bei ihrer Drehung im F_1 -Teil die Konformationsänderungen aus, die letztlich für die Synthese und Freisetzung des ATP benötigt werden (Yoshida et al., 2001; Yasuda et al., 1998).

Nachdem die γ -Untereinheit für die Funktion der ATP-Synthase von zentraler Bedeutung ist, stellt sich die Frage, wie sich die Funktion der γ -Untereinheit näher definieren läßt. So wäre denkbar, dass die γ -Untereinheit letztlich zwei unterschiedliche Funktionen hat, nämlich zum einen (a) eine Funktion in der Übertragung von Konformationsänderungen auf den F_1 -Teil der ATP-Synthase, zum anderen (b) aber auch eine Funktion als Verbindungsstück zwischen dem F_1 -Teil und dem F_0 -Teil. Hat die γ -Untereinheit primär die Aufgabe, Kräfte zu übertragen, oder dient sie womöglich primär der Assemblierung und der Stabilität der ATP-Synthase? Lassen sich diese Funktionen unabhängig voneinander nachweisen? Sind einzelne Segmente der langen α -Helices der γ -Untereinheit in unterschiedlichem Maße an diesen Funktionen beteiligt?

1.3.2 Der Dicarboxylattranslokator (*Dicarboxylate carrier*, DIC)

Der Dicarboxylattranslokator (DIC) gehört zur Familie der Metabolittransporter, die in der inneren mitochondrialen Membran lokalisiert sind (Fiermonte, 1998). Alle Mitglieder dieser Proteinfamilie sind im Zellkern kodiert, werden im Cytosol synthetisiert, und müssen somit von den Mitochondrien aus dem Cytosol aufgenommen werden. Der DIC ist ein integrales Membranprotein, das einen Transport von Malat und anderen Dicarbonsäuren (Dicarboxylaten) im Austausch (Antiport) gegen Phosphationen vermittelt (Zara et al., 2001, Palmieri et al., 1999). Die Gensequenz, die für den Dicarboxylattranslokator (DIC) der Bäckerhefe codiert, umfasst 897 bp und wurde erstmals im Jahre 1996 beschrieben (Kakhniashvili et al., 1997; Lancar-Benba et al., 1996; Palmieri et al., 1996). Es ist das einzige Gen auf dem Hefechromosom XII, das ein Translokatorprotein kodiert. Der DIC der Hefe ist ein Protein von 298 Aminosäuren und hat eine Masse von 32,5 kDa (Bisaccia, 1988). Der DIC des Menschen umfasst 287 Aminosäuren (Fiermonte, 1999). Ähnlich den anderen Metabolittransportern ist der DIC aus drei ähnlichen Modulen aufgebaut, die jeweils zwei membranspannende α -helikale Segmente enthalten.

Die Metabolittransporter der Mitochondrien werden ohne eine N-terminale Präsequenz synthetisiert. An der Zielerkennung ist u.a. der Importrezeptor Tom70 beteiligt, der beim Import typischer Matrix-Proteine keine oder kaum eine Rolle spielt (Neupert, 1997). Da der Import der Metabolittransporter sowohl von ihren N-, als auch von den C-terminalen Aminosäuren unabhängig ist, hat man daraus geschlossen, dass interne Signalsequenzen für den Import in die Mitochondrien entscheidend sind. An der Bindung an den Importrezeptor Tom70 sind neben hydrophoben Segmenten auch hydrophile Abschnitte der Sequenz beteiligt, die positiv geladene Aminosäuren enthalten (Brix et al., 1997; 1999). Für den Prozess der Translokation scheinen hingegen primär die hydrophoben Segmente der Metabolittransporter von Bedeutung zu sein, die unmittelbar an die Tim9/Tim10-Komplexe des Intermembranraumes binden (Curran et al., 2002; Vial et al., 2002).

Zudem enthalten die Metabolittransporter ein konserviertes Sequenzmotiv, P x (D/E) x x (K/R), das sich jeweils an den C-terminalen Enden der ungeradzahligen α -Helices befindet (Nury et al., 2006; Nelson et al., 1998). Das Sequenzmotiv wird allgemein als *Carrier signature* bezeichnet. Es ist naheliegend, eine Beteiligung dieser *Carrier signature* an der Zielerkennung der Metabolittransporter (engl. „*Carrier proteins*“) zu vermuten. So wäre es denkbar, dass die *Carrier signature* entweder an der spezifischen Bindung der neu synthetisierten Metabolittransporter an Tom70 beteiligt ist, oder an der Wechselwirkung

mit den Tim9/Tim10-Komplexen (Sirrenberg et al., 1998; Bauer et al., 2000). Eine experimentelle Bestätigung haben diese Vermutungen allerdings bislang noch nicht gefunden.

1.3.3 Die Biogenese des Oxa1

Verschiedene Aspekte der Biogenese des Oxa1 in der mitochondrialen Innenmembran sind bereits geklärt worden (Neupert und Herrmann, 2007; Hell et al., 1998; Herrmann et al., 1997). Da Oxa1 ein Protein ist, das mit mehreren α -Helices in der Innenmembran verankert ist, könnte man vermuten, dass es auf den gleichen Wegen importiert wird wie die Metabolittranslokatoren. Tatsächlich wird Oxa1 aber ähnlich importiert wie die Proteine der mitochondrialen Matrix. Offenbar wird der Importweg des Oxa1 wesentlich von seiner positiv geladenen Präsequenz bestimmt, die unter Vermittlung des TIM23-Komplexes in die Matrix gelangt und hier vom Prozessierungsenzym MPP abgespalten wird (Herrmann et al., 1997; Frazier et al., 2003). Der TIM22-Komplex ist hingegen am Import des Oxa1 nicht beteiligt.

Ungeklärt blieb in den ersten Studien das Prinzip, nach dem nach Abspaltung der Präsequenz die 5 α -Helices des Oxa1 in der Innenmembran eingelagert werden. Grundsätzlich wären für die Membraninsertion drei Wege denkbar: (1) Die α -Helices könnten vom Intermembranraum aus direkt in die Innenmembran eingelagert werden. (2) Die α -Helices könnten zunächst in die Matrix importiert werden und dann von der Matrix aus in die Innenmembran eingelagert werden. (3) Schließlich wäre auch denkbar, dass die α -Helices zunächst in die Importpore des TIM23-Komplexes gezogen werden, um dann von hier aus seitlich in die Lipidphase der Innenmembran zu gelangen.

In der ersten Studie, die auf diese Alternativen einging (Herrmann et al., 1997) wurde darauf aufmerksam gemacht, dass zusammen mit der Präsequenz auch der N-Terminus des reifen Teiles des Oxa1 in die Matrix gelangt. Erst in einem zweiten Schritt wird der N-Terminus dann nachträglich in den Intermembranraum verlagert. Die Vermutung ist deshalb naheliegend, dass nicht nur der N-Terminus, sondern möglicherweise das gesamte Oxa1 in einem ersten Schritt vollständig in die Matrix gelangt. Die einzelnen Segmente würden dann von hier aus in die Innenmembran eingelagert werden (Herrmann et al., 1997). Die Studie unterstützte somit das Konzept (2).

Es gehört zu den Eigentümlichkeiten des Oxa1-Systems, dass Oxa1 an seiner eigenen Biogenese beteiligt ist. Zumindest wird der N-Terminus des jeweils neu importierten Oxa1 vom endogen bereits vorhandenen Oxa1 in den Intermembranraum transloziert (Hell et al., 1998). Die Biogenese des Oxa1 ist dadurch unmittelbar mit der Funktion des endogenen Oxa1

verbunden. Wesentliche Unterstützung erhielt das Konzept (2) in neueren Studien zur Beteiligung des Oxa1 an der Biogenese mitochondrial kodierter Proteine (Szyrach, 2003; Jia, 2003; Hell et al., 2001). In diesem Fall ist es offensichtlich, dass das endogene Oxa1 die Funktion hat, Substratproteine aus der Matrix aufzunehmen und in die Innenmembran einzulagern.

Die Verwandtschaft der Mitochondrien mit den Bakterien legt es andererseits nahe, nach Ähnlichkeiten in der Biogenese homologer Proteine in Mitochondrien und Prokaryonten zu fragen (Neupert, 1997; Hartl und Neupert, 1990). Studien zur Biogenese des bakteriellen YidC weisen darauf hin, dass YidC zunächst vom Sec-Komplex aufgenommen wird, und die einzelnen α -Helices des Proteins dann nacheinander aus dem Sec-Komplex heraus direkt in die bakterielle Plasmamembran eingelagert werden (Urbanus et al., 2002; 2001; Beck et al., 2001). Es wäre nun denkbar, dass das mitochondriale Oxa1 in ähnlicher Weise mit dem TIM23-Komplex kooperiert wie YidC mit dem Sec-Komplex. Sofern sich eine derartige Ähnlichkeit experimentell bestätigen ließe, gewänne damit allerdings das alternative Modell (3) an Plausibilität.

1.4 Fragestellung der Arbeit

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, den Import und die Assemblierung dreier Proteine der mitochondrialen Innenmembran näher zu untersuchen. Dabei sollten jeweils unterschiedliche Aspekte im Vordergrund stehen:

(1) Die γ -Untereinheit der mitochondrialen ATP-Synthase

Die γ -Untereinheit bildet mit ihren zwei langen α -Helices die Achse, auf der sich der hexamere $\alpha_2\beta_2$ -Komplex der ATP-Synthase dreht. Die γ -Untereinheit spielt eine entscheidende Rolle bei der Energie-Übertragung vom protonengetriebenen Rotor des F_0 -Teils zu den enzymatisch aktiven Zentren des F_1 -Teils. Es sollte nun untersucht werden, in welchem Maße die γ -Untereinheit auch an der Assemblierung der ATP-Synthase beteiligt ist.

(2) Der Dicarboxylattranslokator (DIC)

Der DIC gehört zur Familie der Metabolitranslokatoren der mitochondrialen Innenmembran. Ähnlich den anderen Mitgliedern dieser Proteinfamilie enthält der DIC als charakteristisches Sequenzmotiv eine sogen. *Carrier signature*, P x (D/E) x x (K/R). Über die Funktion dieses Sequenzmotifs war zu Beginn dieser Arbeit kaum etwas bekannt. Die möglichen Funktionen

der *Carrier signature* sollte nun für die Biogenese des DIC möglichst präzise bestimmt werden.

(3) Oxa1

Oxa1 ist insofern ein besonders interessantes Modellprotein, als es nicht nur an der Biogenese anderer mitochondrialer Proteine ist, sondern zudem auch an seiner eigenen Biogenese in der Innenmembran beteiligt ist. Zur Funktion des YidC, eines sehr ähnlichen Proteins wie das Oxa1 in der Plasmamembran von *Escherichia coli*, liegen bereits viele Daten vor, so dass es sich anbot, den Mechanismus der Insertion des Oxa1 in die Innenmembran genauer zu untersuchen, und die Ergebnisse dann mit den Daten zum YidC zu vergleichen.

Der γ -Untereinheit und dem Oxa1 ist gemeinsam, dass es sich um Proteine handelt, zu denen es offensichtlich Verwandte in der Plasmamembran der Prokaryonten gibt. Der Dicarboxylat-translokator ist hingegen ein Protein, zu dem prokaryontische Homologe nicht bekannt sind. Vielleicht ist die Familie der mitochondrialen Metabolittranslokatoren erst im Zusammenhang der Bildung der eukaryontischen Zellen neu gebildet worden, um einen effizienten Stoffaustausch zwischen dem Endosymbionten und der urtümlichen Wirtszelle zu ermöglichen. So war in der vorliegenden Studie für jedes der drei Proteine auf unterschiedliche Weise jeweils neu die Frage zu stellen, inwiefern sich in ihrer Biogenese die Evolution der Mitochondrien aus prokaryontischen Vorläufern widerspiegelt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Acrylamid	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Acrylamidstammlösung	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Agar	Bit Tek™ Difco Laboratories, Detroit MC, USA
Agarose	Fluka Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA
Ammoniumacetat	Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland
Ammoniumchlorid	Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland
Ampicillin	USB, Cleaveland, Ohio, USA
APS	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
ATP	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Bacto-Hefeextrakt	Bit Tek™ Difco Labotatories, Detroit MC, USA
Bacto-Peptone	Bit Tek™ Difco Labotatories, Detroit MC, USA
Bacto-Tryptone	Bit Tek™ Difco Labotatories, Detroit MC, USA
Bicin	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
Bisacrylamid	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Bistris	USB, Cleveland, Ohio, USA
Bradford Reagenz	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, Deutschland
BSA (Sigma A-6003)	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Calciumchlorid-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Coomassie Brilliant Blue	Merck, Darmstadt, Deutschland
DNA-Standard (High Range)	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
Digitonin	Calbiochem-Novabiochem Corporation, La Jolla, CA
DSS	Pierce iotechnology, Inc., Rockford, IL, USA
DTT	Gerbu, Gaiberg, Deutschland

EACA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
ECL-Kit	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
EDTA	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
EGS	Pierce iotechnology, Inc., Rockford, IL, USA
Eisessig	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethanol	eigene Destillation am Institut
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethylenglykol	Riedel-de-Haen AG, Seelze, Deutschland
E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit II	PeqLab Biotechnologie GmbH, Deutschland
Galaktose	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
GFX Micro Plasmid Prep Kit:	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit :	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
Glucose	Merck, Darmstadt, Deutschland
Glycerin	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Glycin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Guanidiniumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Harnstoff	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
HCLaq (37% rauchend)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hefe-Extrakt	Bit Tek™ Difco Laboratories, Detroit MC, USA
Imidazol	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
IPTG	Gerbu, Gaiberg, Deutschland
Isopropanol	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Kaliumacetat	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Kaliumchlorid	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Kaliumdihydrogen- phosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magermilchpulver	Heirler Cenovics GmbH, Radolfzell, Deutschland
Magnesiumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Magnesiumsulfat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Manganchlorid	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA

Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Methionin	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Methionin radioaktiv	ICN Biochemical Research Products, Eschwege, Deutschland
Mops	USB, Cleveland, Ohio, USA
NADH	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Natriumacetat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid	USB, Cleveland, Ohio, USA
di-Natriumhydrogen- phosphat-Dihydrat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogen- Phosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nickel-NTA-Superflow	QUIAGEN, Hilden, Deutschland
PAS	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
PMSF	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg, Deutschland
Polyethylenglycol	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Ponceau S	Boehringer, Mannheim, Deutschland
Proteinstandard	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
Proteinstandard II.	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
QuikChange Kit	Stratagene Cloning Systems, La Jolla, Ca, USA
Raffinose	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Saccharose	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
SDS	Gerbu, Gaiberg, Deutschland
Sequenase Kit	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
S-MBS	Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, USA
Sorbitol	Merck, Darmstadt, Deutschland
TCA	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
TEMED	Aldrich Chemical Company Inc., Milwaukee, USA
TRIS	USB, Cleveland, Ohio, USA
TNT T7 Coupled Reticulo- cyte Lysate System	Promega, Madison, USA
Tricin	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Tris	USB, Cleveland, Ohio, USA

Triton-X-100	Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
Valinomycin	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Yeast Nitrogen Base	Bit Tek™ Difco Laboratories, Detroit MC, USA

2.1.2 Aminosäuren und Nucleobasen

Adeninsulfat:	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Arginin:	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
L-Histidin:	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Isoleucin:	Degussa AG, Konstanz, Deutschland
L-Leucin:	Merck, Darmstadt, Deutschland
L-Lysin:	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
L-Methionin:	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
L-Phenylalanin:	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
L-Serin:	Serva Feinbiochemica, Heidelberg, Deutschland
L-Threonin:	Degussa AG, Konstanz, Deutschland
L-Tryptophan:	Degussa AG, Konstanz, Deutschland
L-Tyrosin:	Merck, Darmstadt, Deutschland
Uracil:	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
L-Valin:	Merck, Darmstadt, Deutschland

2.1.2 Radiochemikalien

³⁵ S-Methionin	ICN Biomedical Research Products, Eschwege, Deutschland
---------------------------	---

2.1.3 Enzyme

DNase	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Lysozym	Fluka Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA
Pfu-Turbo-Polymerase	Stratagene Clonino Systems, La Jolla, Ca, USA
Proteinase K	Sigma
Restriktionsenzyme	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland
RNase 1	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
Sp6-Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

T7-Polymerase	Promega Corporation, Madison, WI, USA
Taq-Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St.Leon-Rot, Deutschland
Zymolyase	WAK-Chemie Medical GmbH, Bad Soden, Deutschland

2.1.4 Antikörper

Anti-Mouse Ig, horseradish peroxidase:	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
Anti-Rabbit	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
Anti-HA-Antibody	Roche Diagnostics Corp., Indianapolis, USA
Anti-His-Antibody	Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA

Antikörper gegen Tim23, Tom40, Tim44, Tim11, AAC und Mge1 wurden von der Arbeitsgruppe von Prof. Nikolaus Pfanner (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt.

2.1.5 Antibiotika

Antibiotika	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml	Fluka Sigma
Chloramphenicol	25 µg/ml	Fluka Sigma
Kanamycin	30 µg/ml	Fluka Sigma

2.1.6 Membranen und weitere Materialien

Chromatographiepapier	Gel-Blotting-Papier, Art.-No. 4926-1, 0,37 mm Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
	Gel-Blotting-Papier, Art.-No. 426994, 1,2 mm Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland
Nitrozellulose-Membranen	- Optitran BA-S 83, Reinforced NC, Schleicher & Schuell GmbH, Dassel, Deutschland - Hybond™ ECL™, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA
PVDF-Membran	Roti® -PVDF, Art.T830.1 Carl Roth GmbH + Co, Karlsruhe, Deutschland
ECL Western blotting	

Detection system	- Amersham Pharmacia Biotech Inc., Cleveland, OH, USA - Perbio, Super Signal® West Pico Chemiluminescence Substrate, Deutschland
Entwickler	Roentgen liquid, Röntgen-Rapid-Entwickler, TETENAL Photowerk GmbH&Co KG, Norderstedt, Deutschland
Fixierer	Roentgen Superfix, Röntgenfixierlösung, TETENAL Photowerk GmbH&Co KG, Norderstedt, Deutschland
Filme	Medical X-Ray, Nr. 79820094, Agfa-Gevaert AG Leverkusen, Deutschland

2.1.7 Geräte

Agarosegelkammer	Owl Separation System Easy Cast Elektrophoresis System Model # B1A
Elektrophoresekammer für Blaue Nativgelelektrophorese	Pharmacia Hoefer, Model SE 600
SDS-Elektrophoresekammer	ZITT-THOMA GmbH, Laborbedarf-Glasbläserei, Freiburg i. Br., Deutschland
Blot-Apparatur	OWL, Semidry Elektrobloetter, Portsmouth, USA
Fluoreszenzspektrometer	JASCO FP 750 Spectrofluorometer
Geltrockner	BIO-RAD, Modell 583, Gel Dryer
Magnetrührer	- Heidolph MR 3001 K - IKAMAG REO
Netzgerät	- Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland - Consort E 865, Belgien
Kältethermostat	Lauda ecoline Re 106
PCR-Geräte	- Perkin Elmer GeneAmp PCR System 2400 - Biometra Tgradient Thermoblock
Phosphorimager	Bio-Image Analyzer, BAS-1500, Fuji Photo Film Co
Photometer	- Pharmacia LKB Ultrospec Plus Spectrophotometer - Perkin Elmer Lambda 15 UV/VIS Spectrophotometer
Sequenziergerät	MWG-Biotech Licor DNA sequencer model 4000L
Taumelschüttler	Heidolph POLYMAX 1040

Thermomixer	Eppendorf, Thermomixer Comfort
Ultraschallgerät	Branson Sonifer 450
Vertikalschüttler	SM 25, Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland
Vortexgerät	Vortex Genie 2 TM
Zentrifugen	- Beckman, Modell J2-21 - Beckman Coulter Avanti TM J-25 - Beckman TL-100 Ultracentrifuge - Hermle ZK 630 Processor - Hermle Z 200M/H - Eppendorf Centrifuge 5417 R - Eppendorf Centrifuge 5415 D
Fluoreszenzspektrometer	JASCO FP 750 Spectrofluorometer

2.1.8 Hefestämme

Stamm	Mutation	Genotyp	Medium	Wachstumstemp.
YPH500	WT	Mata α , ade2-101, his3 Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63,	YPG	30°C
YPH499	WT	Mata α , ade2-101, his3 Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, lys2-8	YPG	23°C
BY4742	WT	Mata α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0 lys2-801	YPD	30°C
BY4742	Y10000	Mata α , his3 Δ 1, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0 lys2 Δ 0	YPD	30°C
MM307	tom6 Δ	Mata α , ade2-101, his3 Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, lys2-801, tom6: URA3	YPD/YPG	30°C

1311	Δ tom70	Mata α , ade2-101, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, lys2-801,tom70:his3	YPG	30°C
Δ oma1	YuR087c	Mata α , his3 Δ 1, leu2- Δ 0, lys2- Δ 0, ura3- Δ 0, Y4R087c:Kan MX4	YPG	30°C
13125Y	Δ ATP1	BY4742 ; Mata α , his3 Δ 1 leu2- Δ 0, lys2- Δ 0, ura3- Δ 0,Y4R087c: Kan MX4	YPD	25 -30°C
16924Y	Δ ATP2	BY4742 ; Mata α , his3 Δ 1 leu2- Δ 0, lys2- Δ 0, ura3- Δ 0,Y4R087c: Kan MX4	YPD	25 -30°C
13176Y	Δ ATP3	BY4742 ; Mata α , his3 Δ 1 leu2- Δ 0, lys2- Δ 0, ura3- Δ 0,Y4R087c :Kan MX4	YPD	25 -30°C
15302Y	Δ ATP10	BY4742 ; Mata α , his3 Δ 1 leu2- Δ 0, lys2- Δ 0, ura3- Δ 0,Y4R087c: Kan MX4	YPD	25 -30°C
17387Y	Δ ATP11	BY4742 ; Mata α , his3 Δ 1 leu2- Δ 0, lys2- Δ 0, ura3- Δ 0,Y4R087c: Kan MX4	YPD	25 -30°C
11245Y	Δ ATP12	BY4742 ; Mata α , his3 Δ 1 leu2- Δ 0, lys2- Δ 0, ura3 Δ 0,Y4R087c :Kan MX4	YPD	25 -30°C
10868Y	Δ ATP13	BY4742 ; Mata α , his3 Δ 1 leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, Y4R087c : Kan MX4	YPD	25 -30°C
11021Y	Δ ATP15	BY4742; Mata α , his3 Δ 1 leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0,Y4R087c: Kan MX4 ura3 Δ 0,Y4R087c : Kan MX4	YPD	25 -30°C
12257Y	Δ Fmc1	BY4742 ; Mata α , his3 Δ 1 leu2- Δ 0, lys2- Δ 0,	YPD	25 -30°C

		ura3- Δ 0, Y4R087c: Kan MX4		
Y13048	Δ Pim1	BY4742; Mata α , his3 Δ 1 leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0 YBL022c: kan MX4	YPD	25 -30°C
Y10148	Yta 10	BY4742; Mata α , his3 Δ 1 leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0 YER017c: kan MX4	YPD	25 -30°C
Y17144	Yta 11	BY4742; Mata α , his3 Δ 1 leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0 YPR024w: kan MX4	YPD	25 -30°C
Y16224	Yta 12	BY4742; Mata α , his3 Δ 1 leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0 YMR089c: kan MX4	YPD	25 -30°C
16151Y	Δ Oxa1	BY4742; Mata α , his3 Δ 1 leu2 Δ 0, lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, Y4R087c: Kan MX4	YPD	25 -30°C
1134	Tim23 His-tag	Mata α , ade2 Δ 0, trp1 Δ 0, his3 Δ 0, leu2 Δ 0, ura3 Δ 0 tim23: His ₆ (-N)	YPG	30°C
1134/1	Oxa1-HA	Mata α , ade2-, trp1-, ura3-, his3-, leu2-, tim23: His ₆ (-N) +His3	YEYPD	30°C
1272	MB3	Mata α , ade2-101 ochre, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, lys2-801 amber, ura3 :lys2	YPD	23°C
1108MB3-46	Δ tim23	Mata α , ade2-101 ochre, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, lys2-801 amber, ura3 :lys2	YPD	23°C
MB29	WT	Mata α , ade2-, trp1-, ura3-, his3-, leu2-	YPG	30°C
1181	Δ tim44	Mata α , ade2 Δ 0, trp1 Δ 0 tim44: lys2 + YC plac111:tim44 (13),	YPD	23°C

		tim23-2		
1055MM307	Δ tom6	Mata α , ade2-101, his3- Δ 200, leu2- Δ 1, ura3-52, trp1- Δ 63, lys2-801, tom6 : URA3	YPG	30°C
1230MB20	WT	Mata α , ade2 Δ 0, trp1 Δ 0, leu2 Δ 0 ,ura3 Δ 0	YPG	23°C

2.1.9 Medien

LB-Medium

Pro 1 l : 15 g Bacto-Trypton, 5 g Hefeextrakt, 10g NaCl; pH 7,5 mit 1 M NaOH einstellen

YEPD-Medium

Pro 1 l : 10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, 20g Glucose; pH 7,5 mit NaOH einstellen

Synthetisches Minimalmedium (SM-Medium)

Pro 1 l : 6,7 g Yeast Nitrogen Base, 20 g Glucose oder 30 ml Glycerin, Aminosäurengemisch nach Tabelle 1, pH 6- 6,5 mit NaOH einstellen

Zusatz	Stammlösung [g/100 ml]	Zugabe Stamm [ml / l Medium]	Endkonzentration [mg/Liter]
Adeninsulfat	0,2	10	20
Uracil	0,2	10	20
L-Tryptophan	1	2	20
L-Histidin	1	2	20
L-Arginin	1	2	20
L-Methionin	1	2	20
L-Tyrosin	0,2	15	30
L-Leucin	1	10	100
L-Isoleucin	1	3	30
L-Lysin	1	3	30
L-Phenylalanin	1	5	50
L-Valin	3	5	150
L-Threonin	4	5	200
L-Serin	8	5	400

Tab. 1: Zugabe von Aminosäuren zum SM-Medium

2.1.10 Plasmide

pFA6a-3HA-His3MX6

Der Vektor wurde beschrieben von Longtine et al. (1998)

UB1, UB2

Die Plasmide wurde freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. Nikolaus Pfanner, Universität Freiburg

2.1.11 Computerprogramme und Internetressourcen

Computerprogramme : Windows XP Professional, XP Home Edition

Office XP, Microsoft

Acrobat 5.0.1., Photoshop 7 (Adobe)

AIDA, Raytest GmbH

Internetressourcen

PubMed pubmed.gov

ExPASy expasy.org

PDB rcsb.org/pdb

SGD yeastgenome.org

Mitoprot ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html

2.2 Methoden

2.2.1. Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Plasmidisolierung

Die Plasmide wurden mit der Hilfe von Reagenzien der Firma Peqlab (E.Z.N.A.R Plasmid Miniprep Kit II) isoliert. Das Prinzip der Isolierung basiert auf der alkalischen Lyse und der anschließenden Adsorption der DNA an einen Glasfaserfilter. Die DNA als eine stark polare Substanz wird von ebenfalls polaren Oberflächen, wie in diesem Fall Siliciumoxid gebunden.

Die DNA kann mit einem Puffer niedriger Ionenstärke eluiert werden. Zur Abtrennung der Salzionen wird die DNA dann aus der Lösung präzipitiert.

TE Puffer

Tris	10 mM	0,121 g
EDTA	1 mM	0,037 g
	H ₂ O ad 100 ml, pH 8,0 mit HCl	

LB-Medium

Bacto-Tryptone	1 %
Bacto-Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	1 %
	LB-Festmedien werden mit 2 % Agar angesetzt

Dem LB-Medium wurde Ampicillin (Endkonzentration 25 µg / ml) zugegeben.

Durchführung:

Die *E.coli*-Bakterien, die das gewünschte Plasmid enthielten, wurden auf einer Platte mit LB-Ampicillin-Medium ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Mit einer der darauf gewachsenen Kolonien wurden 2 ml LB-Flüssigmedium mit Ampicillin (Endkonz.: 25 µg / ml) angeimpft und im Wasserbad etwa 8 Stunden bei 37°C geschüttelt (OD 0,8-1,0). Nach dem Animpfen von 15 ml LB-Amp.-Flüssigmedium mit 20 µl dieser Flüssigkultur wurde über Nacht erneut bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde in JA20-Zentrifugenbecher 10 min bei 5 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Bakterien wurden in 500 µl Lösung I resuspendiert. Nach Überführung der Suspension in ein 2 ml Zentrifugenröhrchen bzw. Eppendorfgefäß wurden 500 µl Lösung II zugegeben und vorsichtig geschwenkt. Das klare Lysat wurde mit 700 µl Lösung III versetzt und mehrmals invertiert, bis sich ein weißes, flockiges Präzipitat bildete. Bei diesem Schritt wurden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt. Anschließend wurde für 10 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf eine Miniprep.-Säule mit Auffanggefäß übertragen und für 1 min bei 10 000 x g zentrifugiert. Die Plasmid-DNA, die sich in diesem Überstand befand, konnte an das Säulenmaterial binden und so zurückgehalten werden. Gewaschen wurde mit 500 µl HB-Puffer und anschließend mit 750 µl DNA-Waschpuffer (mit absolutem Ethanol komplettiert). Bei diesen Waschschrritten wurde jeweils 1 min bei 10 000 x

g zentrifugiert und der Säulendurchfluss wurde verworfen. Um die Säule zu trocknen, erfolgte eine Zentrifugation bei 10 000 x g für 10 min. Anschließend wurde die Säule auf ein neues, steriles Eppendorfgefäß gesetzt und die Plasmid-DNA wurde mit 50-100 µl TE-Puffer eluiert, wobei 1 min bei 10000 x g zentrifugiert wurde. Die frisch isolierte DNA wurde bei -25°C aufbewahrt.

Zur Konzentrationsbestimmung der isolierten Plasmid-DNA wurden 3 µl der Probe mit 147 µl Wasser verdünnt (Verdünnungsfaktor 50). Der DNA-Gehalt wurde spektrophotometrisch bestimmt.

2.2.1.2 Spektrophotometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der DNA-Lösungen wurde spektrophotometrisch bestimmt. Die Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm. Bei doppelsträngiger DNA entspricht eine Extinktion von 1 einer DNA-Konzentration von 50 µg / ml (Sambrook et al., 1989).

Daraus ergibt sich folgende Formel zur Berechnung des DNA-Gehalts:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g/ml}) = 50 \times \text{OD}_{260} \times \text{VF}$$

[DNA] = Konzentration der doppelsträngigen DNA

50 = Multiplikationsfaktor, gültig bei doppelsträngiger DNA

OD_{260} = Absorption bei 260 nm

VF = Verdünnungsfaktor der Probenmenge

Zur Konzentrationsbestimmung der Plasmid-DNA wurden 3 µl von der isolierter DNA genommen und mit 147 µl Wasser verdünnt (Verdünnungsfaktor 50).

2.2.1.3 Herstellung kompetenter *E.coli* - Zellen

Zur Aufnahme von DNA in Zellen (Transformation) müssen diese zunächst kompetent gemacht werden, d. h. man verleiht ihnen die Fähigkeit, Nukleinsäuren aus der Umgebung aufzunehmen. Dies erreicht man durch Behandlung der Zellen mit Cäsiumchlorid oder Rubidiumchlorid. In der vorliegenden Studie wurde Rubidiumchlorid verwendet.

Anlegen einer Vorkultur:

Es wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml über-Nacht-Kultur von *E coli* beimpft und über Nacht bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation in einem sterilen Zentrifugenbecher (5 min. bei 3000 x g) geerntet. Die Zellen wurden in 30 ml TFB1-Puffer resuspendiert und 90 min. auf Eis inkubiert. Es folgt eine Zentrifugation 5 min. bei 2000 x g, danach wurde der Niederschlag in 4 ml eiskaltem TFB2-Puffer aufgenommen. Die Suspension der Zellen wurde auf Eis für 15-60 Minuten inkubiert. Schließlich wurden 100 µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

TFB1-Puffer

RbCl	100 mM
MnCl ₂	50 mM
KAc	30 mM
CaCl ₂	10 mM
Glycerin	15 % (v / v)

pH 5,8 mit HCl einstellen

TFB2-Puffer

MOPS	10 mM
RbCl	10 mM
CaCl ₂	75 mM
Glycerin	15 %

pH 8,0 mit HCl einstellen

2.2.1.4 Herstellung kompetenter Hefezellen

Die Hefezellen wurden von einer Platte in eine 1 ml YEPD- Kultur überimpft und über Nacht bei 30 °C im Schüttler wachsen gelassen. 200µl dieser Kultur wurden morgens in 5 ml frisches YEPD Medium pipettiert. Die Zellen einer logarithmisch wachsenden (OD₆₀₀=0,6) 5 ml YEPD-Kultur wurden in 3 sterilen Eppendorfgefäßen abzentrifugiert (bei 3 000 x g in 5 min.) und mit je 1 ml Lösung A gewaschen. Danach wurden die Zellen in 0,2 ml Lösung A resuspendiert und anschließend bei -80°C gelagert.

Lösung A

Sorbit(ol)	1M
Bicin	10 mM
Ethylenglykol	3 % (v/v)
	pH 8,35 einstellen

2.2.1.5 Transformation von *E.coli*

Unter einer Transformation versteht man das Einschleusen von Plasmid-DNA in kompetente Bakterienzellen. Zur Transformation wurden 100 µl kompetente Bakterienzellen auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µl Plasmid-DNA (0,1-1 µg DNA) versetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 90 Sekunden einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und anschließend für 2 min. auf Eis gestellt. Danach wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Suspension wurde 90 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden dann auf Selektiv-LB-Platten ausplattiert, die das jeweils erforderliche Antibiotikum enthielten. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C gelagert.

2.2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Über Agarosegele lassen sich Nukleinsäuren einer Größe von ca. 100 bp bis zu 50 kb auftrennen, abhängig von der Agarosekonzentration des Gels (0,3 % bis 3 % Agarose). Die Agarosegele enthielten zur Visualisierung der DNA 0.1 Promille Ethidiumbromid.

Herstellung eines Agarosegels:

Für die Elektrophorese wurde die entsprechende Menge Agarose (0.7-1 % w/v) in 1 x TAE-Puffer suspendiert und in einem Mikrowellenherd 2 Minuten aufgekocht. Nachdem die Lösung etwas abgekühlt war, wurde 1 µg/ml Ethidiumbromid zugegeben, und die Agaroselösung wurde in die Gelapparatur gegossen. Abhängig vom verwendeten Kamm konnten Proben von 10-50µl aufgetragen werden.

Auftrennung der DNA-Proben:

Die DNA-Proben wurden mit 6 x *Mass Loading Dye Solution* Probenpuffer (0.09 % Bromphenolblau, 0.09 % Xylen Cyanol FF, 60 % Glycerin, 60 mM EDTA) der Firma MBI Fermentas gemischt und mit Hilfe einer Pipette auf das Agarosegel aufgetragen. Zur Größenbestimmung wurde eine Bahn mit Molekulargewichtgrößenstandard (MassRuler™ DNA Ladder, High Range; Fermentas) benutzt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei ca.

90 V. Die Laufzeit wurde dabei entsprechend der verwendeten Spannung gewählt (ca. 1 Stunde). Die Auswertung des Gels erfolgte auf einem UV-Schirm. Aufgrund der potentiell mutagenen Wirkung starker UV-Strahlung wurde die Exposition der Gele möglichst kurz gehalten.

2.2.1.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Um mit den gewünschten DNA-Fragmenten weiterarbeiten zu können, wurde die DNA aus dem Agarosegel zurückgewonnen. Dies geschah durch Bindung an einem Glasfaserfilter, von dem die DNA anschließend in sauberer Form eluiert wurde. Verwendet wurden die Reagenzien des *GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit* (Amersham). Die Bande wurde unter dem UV-Licht mit einem Skalpell aus dem Gel ausgeschnitten und in ein steriles Eppendorfgefäß überführt. Nach dem Abwiegen zur Bestimmung des Gelgewichts wurden 10 µl *Capture-Buffer* pro 10 mg Gel zugegeben und kurz gemischt. Das Gelstück wurde 15 min bei 60 °C erhitzt und anschließend für eine Minute bei 20 000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine GFX-Säule mit einem geeigneten Auffanggefäß überführt und 30 Sekunden bei 20 000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde zweimal mit 500 µl *Wash-Buffer* gewaschen. Um die gereinigte DNA zu eluieren, wurde der GFX-Filter in ein steriles Eppendorfgefäß eingesetzt und mit 10-50 µl TE-Puffer versetzt. Nach 1 Minute Inkubation bei Raumtemperatur wurde dann 2 min bei 20 000 x g zentrifugiert. Die gereinigten DNA-Fragmente wurden bei -20°C aufbewahrt.

Wasch-Puffer:

Tris	10 mM
	pH 8,0 mit HCL einstellen
EDTA	1 mM
Ethanol	80 % (v/v)

2.2.1.8 PCR (DNA-Polymerase-Kettenreaktion)

Die Methode der PCR wurde eingesetzt um definierte Teile eines DNA-Stranges zu vervielfältigen. Die PCR wurde in 30 bis 50 Zyklen durchgeführt. Allgemein umfasst jeder Zyklus einer PCR drei Schritte. Zunächst werden die beide Stränge der doppelsträngigen DNA durch Erhitzen voneinander getrennt (denaturiert), um kurzen, synthetisch hergestellten

Oligonukleotiden (den sogen. *Primern*) über Basenpaarung eine Anlagerung (*Anneling*) an die Ausgangs-DNA zu ermöglichen.

Zunächst wird die doppelsträngige DNA auf 94-96 °C erhitzt um die Stränge zu trennen. Dabei lösen sich die Wasserstoffbrückenbindungen, die die beiden DNA-Stränge zusammenhalten. Im ersten Zyklus wird die DNA oft für längere Zeit erhitzt um sicherzustellen, dass sich sowohl die Ausgangs-DNA als auch die Primer vollständig voneinander getrennt haben. Nach Trennung der Stränge wird die Temperatur so weit gesenkt, dass sich die Primer an die DNA-Stränge anlagern können. Die Temperatur während dieser Phase hängt von den Primern ab und liegt etwa 2-3 °C unter ihrem Schmelzpunkt, meist zwischen 50 und 65 °C.

Die Temperatur der nun folgenden Elongationsphase hängt von der verwendeten DNA-Polymerase ab (zwischen 68 und 72 °C), die in diesem Schritt benötigte Zeit hängt zum einen von der verwendeten DNA-Polymerase (Taq- bzw. Pfu-Polymerase), zum anderen von der Länge des DNA-Fragments ab, das vervielfältigt werden soll. Der neu synthetisierte DNA-Strang kann dann in einem folgenden Zyklus nach Denaturierung wieder als Vorlage für die für eine weitere Syntheserunde dienen. Theoretisch können ausgehend von einem einzigen DNA-Molekül in 30 Zyklen 2^{30} DNA-Moleküle erhalten werden (Sambrook et al., 1989).

Durchführung:

3 µl	10x Tfu (Taq)-Polymerase-Puffer
2,5 µl	1:10 verdünnte Plasmid-DNA (ca. 5-50 ng)
2 µl	Downstream-Primer (10 pmol/µl)
2 µl	Upstream-Primer (10 pmol/µl)
14,5 µl	H ₂ O _{dd} (30 µl Gesamtvolumen)
5 µl	2 mM dNTP-Gemisch
1 µl	Tfu(Taq)-Polymerase (5 U/µl)

Zur Amplifizierung der DNA wurden die Proben in einem Thermocycler nach folgendem Programm abwechselnd erhitzt und abgekühlt:

3 Minuten	95°C	Erste Denaturierung
-----------	------	---------------------

30 Zyklen:

45 Sekunden	94°C	Denaturierung
-------------	------	---------------

1 Minute	58°C	Primer-Anlagerung (<i>Annealing</i>)
7 Minuten	68°C	Elongation
15 Minuten	68°C	Letzte Elongation

Die Proben wurden im Thermocycler dann automatisch auf 4°C abgekühlt.

2.2.1.9 Homologe Rekombination in *Saccharomyces cerevisiae* (Konstruktion von Oxa1-HA)

Durch homologe Rekombination können einander homologe DNA-Segmente in einer Zelle gegeneinander ausgetauscht werden. Auf diese Weise können DNA-Segmente konstruiert werden, wenn für eine Rekombination *in vitro* keine geeigneten Restriktionsschnittstellen zur Verfügung stehen. Die DNA-Segmente, die man austauschen möchte, sollten 30-40 Basenpaare enthalten, die einander homolog sind (Oldenburg et al., 1997). Im Rahmen der vorliegenden Studie wurde die Methode der Homologen Rekombination eingesetzt, um das Fusionsgen *OXAI-HA* zu konstruieren. (*OXAI-HA* kodiert ein Derivat des Oxa1, das einen sogen. HA-tag enthält.)

Zugrundegelegt wurde ein Plasmid, das ein Oxa1-Wildtyp-Gen enthielt. Es wurde dann eine PCR mit den Primern Oxa1-HA-for/Oxa1-HA-rev durchgeführt (siehe 2.2.1.8):

Oxa1-HA-for:

5'-AAA ATC AAA ATT GTT CAC AAA TCA AAC TTC ATT AAT AAC AAA AAA
CGG ATC CCC GGG TTA ATT AA-3'

Oxa1-HA-rev:

5'-CAT GGG GTC CAG ATT AGG TGC AGT TCA GAC AAT CCT GCA AGA TTT
GAA GAG CTC GTT TAA AT-3'

Danach wurden 1 µg des Plasmides pFA6a-3HA-His3MX6 (dieses enthielt das Markergen *HIS3*) zusammen mit 12,5 µl PCR-Produkt und 5 µl (50 µg) gescherte Lachssperma-DNA in kompetente Hefezellen transformiert (siehe 2.2.1.4). Die Zellen wurden auf Minimalmedium ohne Histidin ausplattiert. Zur Transformation wurde der haploide Hefestamm MB29 verwendet, der das Plasmid YCplac33-*TIM23* [*Bst*E2-*Hind*II + His₆(N)] enthielt (Bömer et al., 1997). Aus Transformanden die auf dem Selektivmedium ohne Histidin gewachsen waren, wurde genomische DNA isoliert. Dann wurde mit den Primern Oxa1-for und Oxa1-rev

und der genomischen DNA eine PCR durchgeführt. Dieses 2156 bp große PCR-Produkt wurde gereinigt (siehe 2.2.1.1) und dann sequenziert (Firma GATC).

Oxa-for:

5`-CGC TTC CC CAC AGA GAA CA-3`

Oxa1-rev:

5`-CTT AGC CAA CAG CAT GGG GTC C-3`

2.2.2 Proteinchemische Methoden**2.2.2.1 Anzucht von *Saccharomyces cerevisiae***

Mit einer *Saccharomyces cerevisiae* Kolonie von einer Stammplatte wurden 50 ml steriles YPD- bzw. YPG-Flüssigmedium in einem 100 ml Erlenmeyerkolben angeimpft und über Nacht bei 30°C und 100-150 rpm geschüttelt. Mit der Übernachtskultur wurden 400 ml YPG-Medium angeimpft und eine weitere Nacht bei 30°C geschüttelt. Es wurden dann 5-6 x 1,6 l Flüssigmedium angeimpft, welches ebenfalls über Nacht bei 30°C geschüttelt wurde. Die Zellen befanden sich nun in der logarithmischen Wachstumsphase ($OD_{600} = 0,4-1,7$) und wurden für die Mitochondrienisolierung verwendet.

2.2.2.2 Zellaufschluss und Mitochondrienisolierung

Für Importversuche *in vitro* wurden Mitochondrien aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert. Die Isolierung erfolgte nach einer Methode von Daum et al. (1982). Hierbei werden die Zellwände durch Behandlung mit Zymolyase labilisiert und durch einen osmotischen Schock aufgebrochen. Die Mitochondrien werden dann durch differentielle Zentrifugation von den übrigen Zellbestandteilen abgetrennet.

YPG-Platten

Bacto-Hefeextrakt	1 %	5 g
Bacto-Peptone	2 %	10 g
H ₂ O		450 ml
	pH 4,8 –5,0 mit HCl konz.	
Agar	2 %	10 g

Glycerin (99%)	3 %	15 ml
----------------	-----	-------

auf 500 ml mit Wasser auffüllen, autoklavieren

YPG-Medium

Bacto-Hefeextrakt	1 %	10 g
Bacto-Peptide	2 %	20 g
H ₂ O		900 ml

pH 4,8 –5,0 mit HCl konz.

Glycerin (99%)	3 %	30 ml
H ₂ O auffüllen auf		1 l

autoklavieren

YPD-Medium

wird wie YPG-Medium angesetzt, anstelle von Glycerin wird jedoch 2 % Glucose zugegeben.

DTT-Stock (1 M) 1,543 g DTT / 10 ml H₂O

DTT-Puffer

TrisSO ₄ pH 9,4	0,1 M
DTT-Stock	10 mM

Sorbit(ol) 2,4 M**TrisSO₄ 100 mM pH 9,4**

Tris	100 mM	6,06 g
H ₂ O	ad 500 ml, pH 9,4 mit H ₂ SO ₄	

TrisHCl 1 M pH 7,4

Tris	1 M	12,1 g
H ₂ O	ad 100 ml, pH 7,4 mit HCl	

EDTA 0,5 M pH 8,0

EDTA	0,5 M	18,6 g
H ₂ O	ad 100 ml, pH 8,0 mit NaOH	

KPi 1 M, pH 7,4

KH ₂ PO ₄	1 M	13,6 g
H ₂ O	ad 100 ml. pH 7,4 mit KOH	

PMSF 200 mM in Ethanol

PMSF	34,8 mg / ml Ethanol
------	----------------------

Zymolyase-Puffer

Sorbitol	1,2 M
Kaliumphosphat (Kpi)	20 mM
	pH 7,4

Homogenisierungspuffer

Sorbitol	0,6 M
Tris	10 mM
EDTA	1 mM
BSA	0,2 %
	Zugabe erst nach pH-Einstellung
PMSF	1 mM
	pH 7,4

Isolierung der Mitochondrien

Die Hefezellen der Übernachtskultur wurden durch eine Zentrifugation für 10 min bei 3000 rpm und 4°C geerntet. Die Zellen wurden in sterilem Wasser gewaschen, in einem Zentrifugenbecher vereinigt und erneut zentrifugiert (5 min / 4000 rpm / 4°C). Es wurde das Nassgewicht bestimmt und die Zellen wurden in DTT-Puffer resuspendiert (2 ml DTT-Puffer / g Zellen). Nach einer Inkubation von 30 min unter Schütteln bei 30°C und anschließender Zentrifugation (5 min / 4000 rpm / 4°C) wurden die Zellen in 1,2 M Sorbitol (100-150 ml) gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Zellen wurden in Zymolyase-Puffer aufgenommen (7 ml / g Zellen) und es wurden 2-3 g Zymolyase zugegeben. Es wurde dann 30-45 min bei 30°C geschüttelt. Der Abbau der Zellwände durch die Aktivität der Zymolyase wurde über die Abnahme der optischen Dichte kontrolliert. Die in diesem Schritt entstandenen Sphäroplasten wurden 5 min bei 4000 rpm abzentrifugiert, in 100-150 ml 1,2 M Sorbitol

aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Die Sphäroplasten wurden vorsichtig in Homogenisierungspuffer (7 ml / g Zellen) suspendiert. In Gegenwart des 0.6 M Sorbitol wurden die Sphäroplasten durch osmotischen Schock aufgebrochen. Das Aufbrechen der Zellen wurde durch eine Homogenisierung mit Hilfe eines 30 ml Dounce-Homogenisators (Braun) unterstützt. Zur Inaktivierung von Proteasen wurde PMSF in einer Endkonzentration von 1mM zugegeben, der Teflon-Stempel des Homogenisators wurde mindestens 10 mal auf und ab bewegt.

Zunächst wurde das Homogenisat 5 min bei 4°C mit 3000 rpm zentrifugiert. Der Niederschlag, in dem sich unaufgeschlossene Zellen befanden, wurde verworfen. Der Arbeitsschritt wurde mit einer Zentrifugation von 5 min und 4000 rpm wiederholt. Der Überstand wurde dann zur Abtrennung der Mitochondrien mit 10000 rpm bei 4°C für 10 min zentrifugiert. Der erhaltene Niederschlag (in dem die Mitochondrien enthalten waren) wurde in SEM-Puffer aufgenommen und es wurde erneut PMSF (Endkonzentration 1 mM) zugegeben. Es wurde 5 min bei 4000 rpm (4°C) zentrifugiert und anschließend der Überstand zur Sedimentation der Mitochondrien erneut 10 min bei 10000 rpm (4°C) zentrifugiert. Die Mitochondrien wurden in 100-200 µl SEM-Puffer aufgenommen und es wurde eine Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt (2.2.2.6). Die Suspension wurde in 50 µl-Aliquote portioniert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.2.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford (1976) bestimmt. Das Prinzip dieses Proteinassays beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blue G-250 an Aminosäurereste der Proteine. Daraus ergibt sich eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm auf 595 nm. Die Extinktion wird bei 595 nm gemessen, wobei die Extinktionsänderung dem Proteingehalt der Lösung proportional ist. Auf der Basis einer Eichgerade mit bekannten Proteinmengen kann die gesuchte Proteinkonzentration ermittelt werden.

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G-250	0,04 %	0,4 g
50% (v / v) Ethanol	10 %	200 ml
85 % (v / v) H ₃ PO ₄	34 %	400 ml
	H ₂ O ad 1 l	

Durchführung:

Das Bradford-Reagenz wurde vor Gebrauch mit H₂O 1 : 5 verdünnt. Für die Eichgerade wurden 0, 3, 5, 10 und 15 µl einer Rinderserumalbumin (BSA)-Standardlösung (1 mg / ml) mit jeweils 1 ml Bradford-Reagenz gemischt und es wurde die Extinktion bei 595 nm gemessen. Für die Konzentrationsbestimmung der Proteinlösung wurden 10 µl entnommen und mit 240 µl Wasser oder SEM-Puffer gemischt. Zu jeweils 10 µl und 20 µl dieser Probe wurden je 1 ml Bradford-Reagenz zugegeben. Schließlich wurde die Absorptionsmessung durchgeführt und der Proteingehalt über den Vergleich mit den Werten der Eichgeraden berechnet.

2.2.2.4 Nachweis des Membranpotentials der Mitochondrien

Das mitochondriale Membranpotential wurde mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes DiSC₃(5) (3,3'-Dipropylthiadicarbocyanid-iodid) untersucht. Der Farbstoff ist positiv geladen und wird von den Mitochondrien aufgenommen, sofern ein hinreichendes Membranpotential aufgebaut ist. Die Fluoreszenz des DiSC₃(5) wird dabei unterdrückt (*quenching*). Bei Zugabe eines Stoffes, der die Mitochondrien entkoppelt, wird der Farbstoff wieder aus den Mitochondrien freigesetzt. Über den Vergleich der Fluoreszenz vor und nach dem Aufheben des Membranpotentials kann das Membranpotential abgeschätzt werden.

Phosphat-Puffer

Sorbitol	0,6 M
BSA (Sigma A-6003)	0,1 %
MgCl ₂	10 mM
EDTA	0,5 mM
KH ₂ PO ₄	20 mM
	H ₂ O ad 100 ml, pH 7,2

Farbstoffe und Wirkstoffe

DiSC ₃ (5)	2 mM in DMSO
KCN	1 M in H ₂ O

Durchführung:

Einstellungen des Fluoreszenzspektrometers:

Temperatur	25°C
Anregung	622 nm
Emission	670 nm
Bandbreite	5
Aufnahmedauer	1200 sec.

3 ml des Phosphatpuffers wurden in eine Küvette pipettiert und im Fluoreszenzspektrometer bei 25°C temperiert. Anschließend wurde die Aufnahme gestartet und es wurden 3 µl DiSC₃(5)-Lösung (Endkonzentration in der Küvette 2 µM) zugegeben. Nach kurzer Zeit war die Fluoreszenz stabil und es wurden 10 µl der Mitochondriensuspension zugegeben. Sofern die Mitochondrien ein Membranpotential hatten, verringerte sich daraufhin die Fluoreszenz. Sobald die Fluoreszenz wieder stabil war, wurden 3 µl 1 M KCN (Konzentration in der Küvette 1 mM) hinzugegeben. Bei hinreichendem Membranpotential stieg die Fluoreszenz wieder deutlich an, wenn das Membranpotential zu gering war wurde hingegen kein Anstieg der Fluoreszenz gemessen.

2.2.2.5 Synthese radioaktiv markierter Vorstufenproteine *in vitro*

Radioaktiv markierte Proteine wurden in Kaninchen-Retikulozytenlysat (Promega) synthetisiert, das ³⁵S-Methionin enthielt.

Reaktionsmischung:

50 µl	Retikulozytenlysat
2 µl	TNT-Reaktionspuffer
1 µl	TNT T7 (T6) -Polymerase
1 µl	Aminosäuremix ohne Methionin
2 µl	³⁵ S-Methionin
1 µl	RNase-Inhibitor
x µl	Plasmid-DNA (1 µg / ml)
	nucleasefreies H ₂ O ad 250 µl

Die Reaktionsmischung wurde 90 min bei 30°C inkubiert. Sie wurde dann bei -80°C aufbewahrt.

2.2.2.6 Import radioaktiv markierter Vorstufenproteine in Mitochondrien

P80 Puffer (BSA-Puffer)

		100 ml
Saccharose	250 mM	8,56 g
Mops	10 mM	0,209 g
KCl	80 mM	0,596 g
MgCl ₂	5 mM	0,102 g
BSA (Sigma)	3 % (w / v)	3 g
H ₂ O ad 100 ml, pH 7,2 mit KOH		

ATP (0,2 M)

ATP (Dinatriumsalz)	12 mg	H ₂ O ad 100 µl
---------------------	-------	----------------------------

NADH (0,1 M)

NADH	7 mg	H ₂ O ad 100 µl
------	------	----------------------------

PMSF (0,2 M)

PMSF	35 mg	Ethanol ad 1 ml
------	-------	-----------------

KPi-Puffer

K ₂ HPO ₄	1 M	pH 7,5 mit KH ₂ PO ₄
---------------------------------	-----	--

SEM-Puffer

Saccharose	250 mM	
EDTA	1 mM	
Mops	10 mM	pH 7,2 mit KOH

EM-Puffer

EDTA	1 mM	
Mops	10 mM	
pH 7,2 mit KOH		

Probenpuffer (Laemmli)

SDS	2 % (w/v)
Glycerin	10 %
Tris/ HCl (pH 6,8)	60 mM
Bromphenolblau	0,02 %
DTT	20 mM; erst kurz vor Verwendung zugegeben (20µl einer 1 M Stammlösung)

Durchführung:

Isolierte Mitochondrien (30 µg Protein) wurden in 100 µl BSA-Importpuffer (P-80) aufgenommen, 1 µl 0.2 M ATP, 2 µl 0.1 M NADH und 2 µl 1 M Kaliumphosphat pH 7.5 wurden hinzu pipettiert, und die Suspension wurde für 5 min bei 25°C inkubiert. Anschließend wurde der Import durch Zugabe des Retikulozytenlysates (2-20 µl) gestartet, welches das gewünschte Vorstufenprotein enthielt. Die Dauer des Imports betrug je nach Importexperiment 5-25 min. Um die Importreaktion zu beenden, wurde die Reaktionsmischung auf in Eis auf 0°C gekühlt und mit 20 µg/ml Proteinase K versetzt. Durch die Proteinase K wurde das nicht importierte Vorstufenprotein hydrolysiert. Nach 10 min wurde die Protease K durch Zugabe von PMSF (Endkonzentration 1 µM) inaktiviert. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugieren der Reaktionsmischung (10 min 20000 x g, 4°C) reisoliert. Der Überstand wurde verworfen und die Mitochondrien wurden durch Resuspendieren in 100 µl SEM-Puffer und erneutes Znetrifugieren gewaschen. Die Mitochondrien wurden in 25 µl Laemmli-Probenpuffer suspendiert und die Proben wurden für 2 Minuten auf 95-100°C erhitzt.

2.2.2.7 Chemische Quervernetzung

Zum Quervernetzen von Translokationsintermediaten wurden die kommerziell erhältliche Quervernetzer Sulfo-MBS, DSS, EGS eingesetzt. Die Translokationsmediate wurden durch Import eines ³⁵S-markierten Vorstufenproteins in isolierte Mitochondrien erzeugt. Zur Abtrennung des freien ³⁵S-Methionins wurden die Mitochondrien durch ein Kissen von S₅₀₀EM zentrifugiert (10 min. 20 000 x g 4°C). Die auf diese Weise sedimentierten Mitochondrien wurden in 200µl SEM Puffer resuspendiert. Zum Quervernetzen wurde eine Suspension der Mitochondrien (30 µg Protein) mit SEM-Puffer auf 900 µl verdünnt. Das Quervernetzungsreagenz Sulfo-MBS (Pierce) wurde kurz vor der Reaktion in SEM gelöst,

und direkt in die Mitochondrienlösung hineinverdünnt (Endkonzentration 5-20 µg/ml). Die nicht wasserlöslichen Quervernetzungsreagenzien DSS und EGS (Pierce) wurden bei Raumtemperatur in DMSO gelöst und die Lösung wurde dann direkt mit der Mitochondriensuspension gemischt. Die Endkonzentration der Quervernetzungsreagenzien lag zwischen 0,1 mM und 1 mM. Nach einer Inkubationszeit von ca. 1 Std. wurde die Quervernetzungsreaktion beendet. Reaktionen des Sulfo-MBS wurden durch Zugabe von 200 µl Glycin und 1 µl Merkaptoethanol pH 7,2 beendet, die Reaktionen des DSS und EGS wurden durch Zugabe von 200 µl 1M Tris pH 7,4 beendet. Die quervernetzten Proteine wurden durch Zugabe von TCA-Fällung präzipitiert (siehe 2.2.2.25).

Verwendete Quervernetzungsreagenzien (*Crosslinker*):

Sulfo –MBS (m-Maleimidobenzoyl-N-Hydroxysulfosuccinimidester)

EGS (Ethylenglycolbissuccinimidylsuccinat)

DSS (Disuccinimidylsuberat)

S₅₀₀EM Puffer

Saccharose (Sucrose) 0,5 M

EDTA 1 mM

MOPS 10 mM

KOH pH = 7,2

HS-Puffer

Sorbitol 0,6 M

HEPES 20 mM

KOH pH = 7,4

2.2.2.8 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Benötigte Lösungen und Reagenzien:

Trenngelpuffer 5 x

Tris 56,7 g

H₂O ad 250 ml, pH 8,8

Sammelgelpuffer 5 x

Tris 18,15 g
H₂O ad 250 ml, pH 6,8

10 % SDS

SDS 10 g H₂O ad 100 ml

Elektrophoresepuffer

1 l / 1 x
Glycin 14,4 g
SDS 1,0 g
Tris 3,0 g
pH 8,3 stellt sich ein

Amoniumpersulfatlösung (APS)

Amoniumpersulfat 0,1 g
in 1 ml H₂O lösen

Acrylamid 30 %

Rotiphorese 30, Acrylamid : Bisacrylamid = 37 : 1

Bodengel

20 %
Acrylamid 30 % 6,7 ml
Wasser 1,1 ml
Trenngelpuffer 2,0 ml
SDS 10 % 0,1 ml
APS-Lösung 100 µl
TEMED 20 µl
benötigt werden 15 ml

Trenngel

	17,5 %	15 %	12,5 %
Acrylamid 30 %	9,7 ml	8,5 ml	6,9 ml
Wasser	3,5 ml	4,7 ml	6,4 ml

Trenngelpuffer	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
SDS 10 %	0,167 ml	0,167 ml	0,167 ml
APS-Lösung	100 µl		
TEMED	20 µl		
	benötigt werden 15 ml		

Sammelgel

Acrylamid 30 %	0,83 ml		
Wasser	3,6 ml		
Sammelgelpuffer	0,5 ml		
SDS 10 %	0,05 ml		
APS-Lösung	50 µl		
TEMED	10 µl		
	benötigt werden 5 ml		

Probenpuffer (Laemmli, 1970)

SDS	2 %	2 g
Glycerin	10 %	10 ml
Tris	60 mM	0.73 g
	H ₂ O ad 95 ml, pH 6,8 mit HCl	
Bromphenolblau	0,02 %	20 mg
Mercaptoethanol	5 %	

Durchführung:

Für die Vorbereitung der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde eine Standardlösung von 30 % Acrylamid / 0,8 % Methylenbisacrylamid (Roth, Karlsruhe) verwendet. Die Konzentration des Trenngels wurde je nach Größe der zu untersuchenden Proteine variiert (10-17.5 %). Die Polymerisation wurde durch Zugabe von APS und TEMED ausgelöst.

Die beiden Glasplatten der Apparatur wurden zusammen mit den seitlichen Abstandshaltern (*Spacer*) in den Gel-Schuh gestellt und es wurden 15 ml der Polyacrylamidlösung für das Bodengel eingefüllt, nachdem die Polymerisation kurz zuvor durch Zugabe von 100 µl Ammoniumperoxidsulfat (APS) und 20 µl TEMED gestartet worden war. Das Bodengel diente in dem verwendeten Elektrophoresesystem lediglich zum Abdichten.

Nach der vollständigen Polymerisation des Bodengels wurde das Trenngel (15 ml) bis ca. 3 cm unter die Oberkante der Glasplatten eingegossen und mit Isopropanol überschichtet. Durch das Überschichten mit Isopropanol wurde eine glatte Oberfläche erhalten. Nach Abgießen des Isopropanols und Spülen mit Wasser wurde schließlich auch das Sammelgel (5 ml) gegossen und der Kamm eingesetzt. Die Glasplatten mit dem auspolymerisierten Gel wurden in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. Nach Einfüllen des Elektrophorese-puffers wurde die Gelelektrophorese bei einer konstanten Stromstärke von 35 mA durchgeführt. Nach dem Einlaufen der Probenfront ins Bodengel (nach ca. 1-1,5 h) war die Elektrophorese beendet.

2.2.2.9 Blaue Nativgelelektrophorese (BN-PAGE)

Zur Blauen Nativgelelektrophorese wurde die von Schägger und von Jagow (1991) etablierte Methode verwendet. In der Regel wurden Gele gegossen, in denen das Acrylamid in einem Konzentrationsgradienten von 4 % bis 16,5 % enthalten war. Der Probenpuffer enthielt in den meisten Fällen Digitonin als Detergenz.

Kathodenpuffer A

		100 ml
Tricin	50 mM	0,896 g
Bistris	15 mM	0,314 g
Serva Blue G	0,02 %	0,02 g
		pH 7,0 stellt sich ein, benötigt werden 500 ml

Kathodenpuffer B

		100 ml
Tricin	50 mM	0,896 g
Bistris	15 mM	0,314 g
		pH 7,0 stellt sich ein, benötigt werden 500 ml

Anodenpuffer

Bistris	50 mM	10,45 g
		pH 7,0 mit HCl, H ₂ O ad 1000 ml, benötigt werden 4 l

Gelpuffer (3x)

EACA	200 mM	2,62 g
Bistris	150 mM	3,14 g
	pH 7,0 mit HCl, H ₂ O ad 100 ml	

AB-Mix

Acrylamid	49.5%	96 g
Bisacrylamid	3 %	3 g
	H ₂ O ad 200 ml	

BN-Probenpuffer

EACA	500 ml	3,27 g
Bistris	100 ml	1,04 g
Serva Blue G	5 %	2,5 g
	pH 7,0 mit HCl, H ₂ O ad 50 ml	

Lysepuffer

Detergenz	x %	x g
Tris	20 mM	0,121 g
EDTA	0,1 mM	10 µl
NaCl	50 mM	0,145 g
Glycerin	10 %	5 ml
	pH 7,0 mit HCl, H ₂ O ad 50 ml	
PMSF	1 mM	250 µl
	vor Anwendung frisch zugeben	

Sammelgel

	4 %
Acrylamid	
<i>(Rotiphorese)</i>	1 ml
H ₂ O	4 ml
Gelpuffer	2,5 ml
APS	50 µl
TEMED	10 µl

Trenngel (9 ml)

	4 %	16,5 %
AB-Mix	0,75 ml	3,05 ml
Gelpuffer	3 ml	3 ml
Glycerin	-	1,8 g
H ₂ O	auf 9 ml auffüllen	
APS	38 µl	30 µl
TEMED	3,8 µl	3 µl

Durchführung:

Je 9 ml der Trenngelmischungen (4 % und 16,5 %) wurden angesetzt und in den Gradientenmischer gefüllt. APS und TEMED wurden in den angegebenen Mengen zugesetzt und die Mischungen wurden gut verrührt. Die die Trenngelmischungen wurden dann aus einer Höhe von etwa 30 cm über einen Schlauch in die Gelkammer gegossen. Zur Vermeidung einer ungleichmäßigen Oberfläche wurde das Trenngel anschließend mit Isopropanol überschichtet. Nach der vollständigen Polymerisation (ca. 45 min) wurde das Isopropanol abgegossen und die Geloberfläche mit Wasser gespült. 9 ml der Sammelgelmischung wurden (nach Zugabe von APS und TEMED) eingefüllt und es wurde sofort der Kamm eingesetzt. Dieser wurde kurz vor dem Auftragen der Proben entfernt.

Die folgenden Arbeitsschritte wurden unter Kühlung (auf Eis) durchgeführt. Für die Proben wurden 7 µl Mitochondriensuspension (Proteinkonzentration 10 mg / ml) in 70 µl Lysepuffer aufgenommen und gut resuspendiert. Die Proben wurden mit 1 mM PMSF versetzt und für 10-30 min inkubiert um die Mitochondrien zu lysieren. Zur Abtrennung der Membranfragmente und unlysierter Mitochondrien folgte eine Zentrifugation für 20 min bei 20 000 x g und 4°C. Der Überstand wurde mit 7 µl BN-Probenpuffer gemischt.

Die Elektrophoreseapparatur wurde mit 4 l Anodenpuffer befüllt und bei 1°C gekühlt. Nach dem Auftragen der Proben wurde das Gel in der Gelkammer mit Kathodenpuffer A (400 ml) überschichtet. Zunächst wurde die Elektrophorese bei 200 V gestartet. Nachdem die Front in das Trenngel eingelaufen war, wurde die Spannung auf 500 V erhöht und der Strom auf 15 mA begrenzt. Der Kathodenpuffer A wurde gegen Kathodenpuffer B ausgetauscht sobald die Front etwa ein Drittel des Trenngels durchquert hatte. Die Elektrophorese erfolgte weiterhin

bei einer konstanten Spannung von 500 V. Als sich die Front etwa 0,5 cm vor dem Ende des Gels befand, wurde die Elektrophorese beendet (6-8 h). Mitunter wurde die BN-Elektrophorese nach dem Wechseln des Kathodenpuffers auch über Nacht durchgeführt. Dazu wurde die Spannung auf 50 A vermindert.

Es wurden folgende Proteine in den genannten Konzentrationen in BN-Probenpuffer gelöst und als Marker verwendet:

- Carb. Anhydr.	29 kDa	6 µl	(Konz. 3 mg / ml)
- BSA	66 kDa	3 µl	(Konz. 10 mg / ml)
- ADH	150 kDa	5 µl	(Konz. 5 mg / ml)
- Amylase	200 kDa	5 µl	(Konz. 4 mg / ml)
- Apoferritin	440 kDa	5 µl	(Konz. 10 mg / ml)
- Thyroglobulin	669 kDa	5 µl	(Konz. 8 mg / ml)

2.2.2.10 Zweidimensionale (2D-)Gelelektrophorese

Eine Elektrophorese ist in zwei Dimensionen möglich (2D-Gelelektrophorese), indem zwei zwei Elektrophoresemethoden kombiniert werden. In dieser Arbeit wurde als erste Dimension die Blaue Nativgelelektrophorese gewählt. Nach dem Lauf wurde die gewünschte Spur ausgeschnitten und in ein normales SDS-Gel eingegossen. Die SDS-PAGE diente dabei der zweiten Dimension der Auftrennung. Die einzelnen Proteine konnten anschließend durch Immunoblot nachgewiesen werden.

Trenngelpuffer 5 x

Tris	56,7 g
	H ₂ O ad 250 ml, pH 8,8

Sammelgelpuffer 5 x

Tris	18,15 g
	H ₂ O ad 250 ml, pH 6,8

10 % SDS

SDS	10 g
-----	------

H₂O ad 100 ml

Elektrophoresepuffer

1 l / 1 x

Glycin	14,4 g
SDS	1,0 g
Tris	3,0 g
	pH 8,3 stellt sich ein

Amoniumpersulfatlösung (APS)

Amoniumpersulfat	0,1 g
	in 1 ml H ₂ O lösen

Acrylamid 30 %

Rotiphorese 30, Acrylamid : Bisacrylamid = 37 : 1

Bodengel

	20 %
Acrylamid 30 %	6,7 ml
Wasser	1,1 ml
Trenngelpuffer	2,0 ml
SDS 10 %	0,1 ml
APS-Lösung	100 µl
TEMED	20 µl
	benötigt werden 15 ml

Trenngel

	17,5 %	15 %	12,5 %
Acrylamid 30 %	9,7 ml	8,5 ml	6,9 ml
Wasser	3,5 ml	4,7 ml	6,4 ml
Trenngelpuffer	3,5 ml	3,5 ml	3,5 ml
SDS 10 %	0,167 ml	0,167 ml	0,167 ml
APS-Lösung	100 µl		
TEMED	20 µl		
	benötigt werden 15 ml		

Sammelgel

Acrylamid 30 %	0,83 ml
Wasser	3,6 ml
Sammelgelpuffer	0,5 ml
SDS 10 %	0,05 ml
APS-Lösung	50 µl
TEMED	10 µl
	benötigt werden 5 ml

2.2.2.11 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Coomassie Blue

Die Polyacrylamidgele können mit einer Färbelösung aus 0,25 % Coomassie Brilliant Blue in Methanol / Eisessig / Wasser (3 : 1 : 6) angefärbt werden. Durch die Bindung des negativ geladenen Farbstoffes an die positiv geladenen Aminosäuren der Proteine werden die Proteinbanden auf dem Gel sichtbar gemacht.

Das Gel wurde in die Färbelösung gelegt, 1 min in der Mikrowelle (600 W) erhitzt und unter vorsichtigem Schwenken etwa 15 min lang gefärbt. Danach wurde diese Lösung abgegossen und durch eine Entfärbelösung ersetzt (Methanol / Eisessig / Wasser (3 : 1 : 6)). Durch erneutes Erwärmen in der Mikrowelle konnte das Entfärben beschleunigt werden. Das Gel wurde in der Entfärbelösung vorsichtig geschüttelt, bis nur noch die Proteinbanden zu sehen waren. Anschließend wurde das Gel entweder fotografisch dokumentiert oder getrocknet. Befanden sich auf dem Gel radioaktiv markierte Proteine, so wurde der Nachweis nach dem Trocknen mittels Autoradiographie durchgeführt.

2.2.2.12 Färbung von SDS-PAGE-Gelen mit Silbersalzen

Neben der routinemäßig angewendeten Färbung von Acrylamid-Gelen mit Coomassie Blue wurde für die Anfärbung von sehr geringen Proteinkonzentrationen eine Silberfärbung nach Ansorge (1985) durchgeführt. Dazu wurde das Gel nach der Elektrophorese über Nacht in 40% Ethanol, 7% Essigsäure in Wasser fixiert. Das gel wurde dann 2 mal für 10 min. mit 10 % Ethanollösung gewaschen. Anschließend wird das Gel für 30 min. in 0,1% AgNO₃ Lösung getaucht. Nach der Färbung wurde das Gel erst in Entwicklerlösung, und nach ausreichender Färbung mit Stopplösung (1 % Essigsäure) geschüttelt.

2.2.2.13 Western-Blotting

Beim Blotten werden die Proteine eines SDS-Gels oder eines Nativgels elektrophoretisch auf eine Membran Übertragen. Der Elektrotransfer erfolgt in einer *Western-Blotting*-Apparatur. Blot-Membranen bestehen aus Nitrocellulose oder aus Polyvinylidendifluorid (PVDF). Nach dem Semi-Dry-Verfahren werden das Gel, die Membran und Filterpapiere zwischen zwei Plattenelektroden in der Blotkammer gespannt. Im elektrischen Feld wandern die Proteine aus dem Gel in die Membran. Beim Transfer von Proteinen aus Gelen der SDS- und 2D-Elektrophorese werden Nitrocellulose-Membranen verwendet. BN-PAGE-Gele wurden in der vorliegenden Studie stets auf PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membranen geblottet.

Blot-Puffer

Tris	20 mM	2,42 g
Glycin	150 mM	11,24 g
SDS	0,02 %	0,2 g
H ₂ O	auf 800 ml auffüllen	
Methanol (techn.)	20 %	200 ml
	pH stellt sich ein	

Ponceau S Lösung

TCA	3 %	7,5 g
Ponceau S	0,3 %	0,75 g
H ₂ O	auf 200 ml auffüllen	

Durchführung:

Zwei dünne und zwei dicke Chromatographiepapiere wurden nach der Größe der Gele zurechtgeschnitten. Zusammen mit den Membranen wurden sie in Blot-Puffer getränkt, wobei die PVDF-Membran zuvor für ca. 2 min mit Methanol benetzt und danach mit viel Wasser ausgespült wurde.

ANODE

- eine Lage dickes Chromatographiepapier
- eine Lage dünnes Chromatographiepapier
- Polyacrylamidgel
- Membran (Nitrocellulose oder PVDF)

- eine Lage dünnes Chromatographiepapier
- eine Lage dickes Chromatographiepapier

KATHODE

Dabei wurde darauf geachtet, dass zwischen den einzelnen Lagen keine Luftblasen zurückblieben. Die Blot-Kammer wurde verschlossen und der Elektrotransfer bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA ($2 \text{ mA} / \text{cm}^2$) für 90-100 min durchgeführt. Die PVDF-Membran wurde danach erneut in Methanol getränkt und mit Wasser ausgewaschen. Die Membranen wurden schließlich 2-5 min in einer Ponceau-Lösung angefärbt und mit deionisiertem Wasser gewaschen, bis ein Proteinmuster zu sehen war. Die Banden des Proteinmarkers wurden markiert und die Membranen entweder getrocknet oder für den Antikörpernachweis vorbereitet.

2.2.2.14 Schwellen von Mitochondrien

Zum Öffnen der mitochondrialen Außenmembran wurden die Mitochondrien (30 μg Protein) in 100 μl 10 mM MOPS pH 7.2 suspendiert und 20 min. bei 0°C inkubiert. Unter diesen Bedingungen dringt Wasser in die mitochondriale Matrix ein, die Mitochondrien schwellen, und die Außenmembran der Mitochondrien wird aufgerissen. Aus den Mitochondrien entstehen dadurch Mitoplasten. In vielen Experimenten wurde bereits während des Schwellens der Mitochondrien Proteinase K zugegeben (40 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Über die Zugänglichkeit verschiedener Markerproteine für die Protease konnte dann bestimmt werden, in welchem Umfang der Intermembranraum der Mitochondrien tatsächlich geöffnet worden war.

2.2.2.15 Carbonatextraktion mitochondrialer Proteine

Die Membranen der Mitochondrien enthalten sowohl in der Membran integrierte Proteine, als auch Proteine, die lediglich mit der Membran assoziiert sind. Zur Unterscheidung wurden Carbonatextraktionen durchgeführt. Der alkalische pH der verwendeten Carbonatlösung führt zu einer Ablösung der assoziierten Proteine, während integrale Membranproteine mit der Membran verbunden bleiben.

Die Mitochondrien wurden in eiskalter 100 mM Natriumcarbonat-Lösung Na_2CO_3 (pH 11,5) resuspendiert und für 30 min bei 0°C inkubiert. Anschließend wurden die Membranen durch Zentrifugation (250 000 x g) abzentrifugiert. Die extrahierten Proteine wurden mit Hilfe von TCA aus dem Überstand präzipitiert.

2.2.2.16 Ultraschallbehandlungen

Zur Präparation mitochondrialer Membranvesikel wurde eine Ultraschallbehandlung durchgeführt. Die Mitochondrien wurden in SEM-Puffer resuspendiert und mit Ultraschall behandelt (30% Intensität, 0°C, 5 x 15 sek). Die Auftrennung in eine Membranfraktion (Niederschlag) und eine lösliche Fraktion (Überstand) erfolgte durch Ultrazentrifugation (45 min., 250 000 x g, 4 °C). Die Proteine wurden aus den Überständen der Zentrifugation mit Trichloressigsäure gefällt.

2.2.2.17 Fällung von Proteinen mit Trichloressigsäure

Proteinhaltige Lösungen wurden mit 7,5 % (w/v) Trichloressigsäure und 0,0125% (w/v) Natriumdesoxycholat für 1 Std. auf Eis inkubiert. Danach wurde für 30 min. bei 20000 x g zentrifugiert. Die Niederschläge wurden zweimal mit Aceton gewaschen, bei 37°C getrocknet und dann durch SDS-PAGE analysiert.

2.2.2.18 Saccharosegradient

Homogenisierungspuffer

Sorbitol 0,6 M
HEPES 20 mM
mit KOH pH 7,4

Puffer B

HEPES 20 mM
EDTA 0,5 mM pH 7,4

Puffer C

HEPES 5 mM
KCl 10 mM
EDTA 0,5 mM
pH 7,4

Puffer D

KCl	10 mM
HEPES	5 mM

Die Mitochondrien wurden zunächst in 150 µl Homogenisierungspuffer resuspendiert. Danach wurden 900 µl Puffer B zugegeben und es wurde für 30 min. inkubiert (um eine Schwellen der Mitochondrien auszulösen). Die Dichte der Lösung wurde vergrößert durch Zugabe von Saccharose auf 0,45 M. Nach 10 min Inkubationszeit wurde die gesamte Probe mit Ultraschall behandelt (siehe 2.2.2.16). Nach kurzem Abzentrifugieren wurde der Überstand nochmals 1 Std. bei 100 000 x g zentrifugiert. Der Niederschlag wurde im Puffer C resuspendiert und auf den Stufengradienten (mit den Stufen 0,85 M; 1,1 M; 1,35 M; 1,5 M Saccharose) aufgetragen. Es folgte eine Zentrifugation für 16 Stunden bei 100 000 g. Danach wurden Fraktionen entnommen und zum Präzipitieren der Proteine wurde TCA zugegeben.

2.2.2.19 Nickel-NTA-Affinitätschromatographie

NTA-Agarose enthält Ni²⁺-Ionen, die über Nitriloessigsäure (NTA) an die Agarose gebunden sind. Vier Bindungsstellen des Ni²⁺ sind dabei von den Carboxylgruppen der NTA besetzt. Die verbleibenden zwei Bindungsstellen, die zunächst mit Wassermolekülen besetzt sind, können durch die Imidazolgruppe eines Histidinrestes ersetzt werden.

Vor Inkubation mit der Proteinlösung wurde das Säulenmaterial mit Lysepuffer äquilibriert. Im Anschluß an den Import eines radioaktiv markierten Vorstufenproteins wurden die Mitochondrien in 100 µl Lysepuffer in Gegenwart von 1% Digitonin resuspendiert und 10 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde 10 Minuten bei 20 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit Trypsininhibitor versetzt und dann für 1 Stunde oder über Nacht in einem Eppendorf-Gefäß bei 4°C vorsichtig geschüttelt (über Kopf gedreht). Nach einer Zentrifugation von 1 min. bei 2 000 x g wurde die Säule 10-mal mit 200 µl Waschpuffer gewaschen, die Überstände wurden aufgehoben. Die Säule wurde dann wiederholt mit Waschpuffer gewaschen, um unspezifisch gebundene Proteine zu eluieren. Zur Eluation der spezifisch gebundenen Proteine wurde ein Waschpuffer verwendet, der 150 mM bzw. 300 mM Imidazol enthielt. Die Überstände wurden aufgehoben, mit Trypsininhibitor versetzt (um die Effizienz der Präzipitation zu verbessern) und die Proteine wurden mit TCA gefällt.

Lysepuffer

Tris	20 mM	0,121g	
EDTA	0,1 mM	10 µl (0,5 M)	
NaCl	50 mM	0,145g	
Glycerin	10%	5 ml	
PMSF	1mM	250 µl (200 mM)	
H ₂ O ad 50ml			
pH = 7 mit HCl einstellen			

Waschpuffer

Lysepuffer mit

Imidazol 50 mM

mit Detergenz 1 % Digitonin

Eluotionspuffer

Waschpuffer mit

A: Imidazol I 150 mM

B: Imidazol II 300 mM

2.2.2.20 Autoradiographie von Gelen und Membranen

Zum Nachweis radioaktiv markierter Proteine wurden die getrockneten Gele auf einen strahlungsempfindlichen Nachweisschirm (Imaging Plate (BAS-IP MS 2040), Fuji Photo Film Co) gelegt. Es wurde 1–3 Tage exponiert und die Signale des Nachweisschirms wurden mit Hilfe eines Phosphorimager^s ausgewertet. Die Quantifizierung der Radioaktivität wurde mit folgenden Computerprogrammen vorgenommen:

- BASReader for Windows 3.1, Vers. 2.11 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH)
- Aida; Vers. 2.0, 1998 (Raytest Isotopenmeßgeräte GmbH)

2.2.3 Immunologische Methoden**2.2.3.1 Immunologischer Nachweis-Enzym Immuno Assay**

Nach einem Western-Blot (siehe 2.2.2.13) können die aufgetrennten und auf die Membran übertragenen Proteine mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen werden: Im Anschluss

an das Blotten wurde die Nitrocellulosemembran aus der Blot-Apparatur entnommen und zunächst für eine Stunde vorsichtig in TBS-Puffer mit 5% Magermilchpulver geschüttelt. Die Membran wurde dann 3 mal 5 Minuten mit 1x TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper, verdünnt in 1 ml 1 x TBS, erfolgte dann entweder eingeschweißt in Plastikfolie über Nacht im 4°C Raum, oder in einem größeren Volumen der Antikörperlösung für 1 Stunde auf einem Kippschüttler.

Die Antikörperlösung wurde dann abgegossen und der Blot wurde 4x für 5 Minuten bei RT auf dem Kippschüttler in 1 x TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in TBS für 1 Stunde bei 4°C, in der Regel ebenfalls eingeschweißt in Plastikfolie. Daraufhin wurde die Antikörperlösung entfernt und der Blot wurde erneut 4x für 5 Minuten mit 1x TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper in TBS für 1 Stunde bei 4°C. Nach Ablauf dieser Inkubationszeit wurde 6 x in TBS gewaschen, und schließlich wurde der Blot mit Hilfe von ECL-Reagenzien ausgewertet.

Die Chemilumineszenzbestimmung (*Enhanced Chemiluminescence detection*, ECL) wurde durchgeführt, um Proteine über einen immunologischen Antigennachweis sichtbar zu machen. Der verwendete sekundäre Antikörper trug eine Peroxidase, welche die Oxidation von Luminol katalysiert. Das dadurch emittierte Licht belichtete einen für Blaulicht empfindlichen Photo-Film. Die Chemilumineszenzreaktion wurde mit Reagenzien des ECL-Detektionssystems der Firma Amersham durchgeführt.

Durchführung:

Die ECL-Lösungen wurden im Verhältnis 1 : 1 gemischt und die Membran darin 5 min geschwenkt. Die Membran wurde daraufhin in eine durchsichtige Folie gelegt, der Film wurde aufgelegt, für 10 min belichtet, und anschließend entwickelt. Er wurde aus der Entwicklerlösung genommen, sobald die Banden zu sehen waren. Nach kurzem Spülen in Wasser wurde der Film 5 min fixiert (Fixierlösung).

TBS-Puffer

Tris	10 mM
NaCl	0,9 % (v/v)

Blocking-Lösung

Magermilchpulver	5% (W/v) in TBS
------------------	------------------

2.2.3.2. Immunfällung

Zur Immunpräzipitation wurden in einigen Experimenten Protein A-überzogene Magnetkügelchen der Firma Miltenyi Biotech benutzt (μ MACSTM Protein A MicroBeads), die nach den Angaben des Herstellers verwendet wurden. In den meisten Experimenten wurde allerdings Protein A-Sepharose (PAS) verwendet.

20 mg PAS wurde in 1 ml Wasser 1 Std. quellen gelassen. Die PAS wurde dann 5-mal mit Triton X-100-Puffer gewaschen. Danach wurde der Ansatz (1 Volumenanteil PAS und 2 Teile Triton X-100-Puffer) mit 5-15 μ l Antiserum 1 Std. bei 0°C geschüttelt (um die Antikörper an das Protein A der PAS zu binden). Die PAS wurde dann 3-mal mit Triton X-100-Puffer gewaschen. Die Lösungen der jeweiligen Antigene wurden 20 min. bei 20 000 x g zentrifugiert um Aggregate abzutrennen und dann zur PAS pipettiert. Es folgte eine Inkubation für eine Stunde bei 0°C (durch langsames Drehen der Röhren über Kopf). Danach wurde die PAS wieder 3-mal mit dem Triton X-100-Puffer gewaschen und schließlich in SDS-haltigem Probenpuffer für 3 min. auf 95°C erhitzt. Nach Abzentrifugieren der PAS wurde der Überstand auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen.

Triton Puffer

Triton X-100	1 %
NaCl	0,3 mM
Tris	10 mM
pH 7,5 mit HCl	

Waschpuffer

Triton X-100	0,5%
in TBS-Puffer	

3. Ergebnisse

3.1 Biogenese der ATP-Synthase

In einem ersten Projekt wurde die Assemblierung der mitochondrialen ATP-Synthase untersucht. Insbesondere sollte dabei die mögliche Funktion der γ -Untereinheit in der Assemblierung der ATP-Synthase bestimmt werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst ein System zum Nachweis der Proteinkomplexe etabliert, die von der ATP-Synthase in den Mitochondrien gebildet werden.

3.1.1. Untersuchung der ATP-Synthase durch Blaue Nativgelelektrophorese

Die vollständig assemblierte ATP-Synthase bildet in der Innenmembran der Mitochondrien Komplexe von ca. 500 kDa. Zum großen Teil bilden diese Komplexe Dimere, die sich als Komplexe von ca. 1000 kDa mit Hilfe der Blauen Nativgelelektrophorese (BN-PAGE) nachweisen lassen (Arnold et al., 1998; Schägger und von Jagow, 1991). Es wurden nun Mitochondrien der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* isoliert, in Gegenwart von 1 % Digitonin lysiert, und auf eine entsprechendes Gradientengel (4%-16%) aufgetragen (Abb. 3):

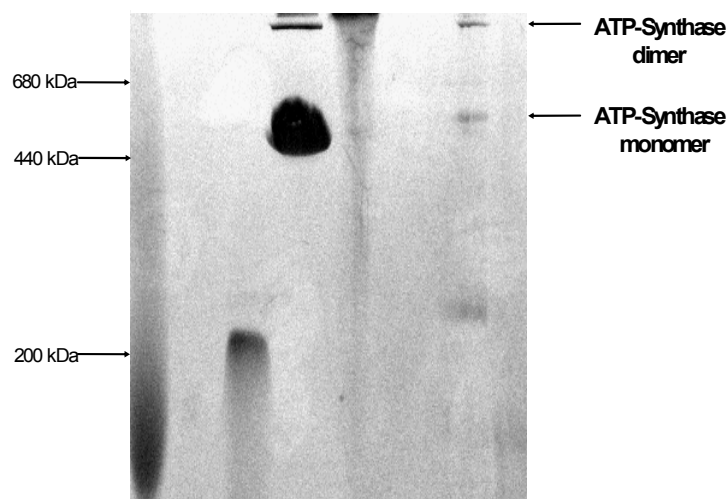


Abb.3: Blaue-Nativgelelektrophorese. Nachweis der ATP-Synthase in Mitochondrien aus einem Hefe-Wildtyp-Stamm. Für die Lyse der Mitochondrien (70 μ g Protein) wurden 70 μ l Lysepuffer verwendet, der 1 % Digitonin enthielt. Zur Hemmung von Proteasen wurde PMSF zugesetzt. Die Lysezeit betrug 20 min. Es folgte eine Zentrifugation (20 min, 14000 rpm, 4°C), anschließend wurde der Überstand mit 7 μ l Probenpuffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Nach der Elektrophorese wurde das Gel mit Coomassie gefärbt.

In parallelen Spuren wurden als Markerproteine BSA (66 kDa), ADH (150 kDa), Amylase (200 kDa), Apoferritin (440 kDa) und Thyroglobulin (669 kDa) aufgetragen. Die technischen Details der Methode sind im Kapitel 2.2.2.8 erläutert.

Komplexe, die durch BN-PAGE aufgetrennt wurden, lassen sich in einer zweiten Dimension durch eine konventionelle SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) weiter analysieren. Eine Auftrennung der mitochondrialen Proteine durch Kombination von BN-PAGE und SDS-PAGE ist in Abb. 4 gezeigt.

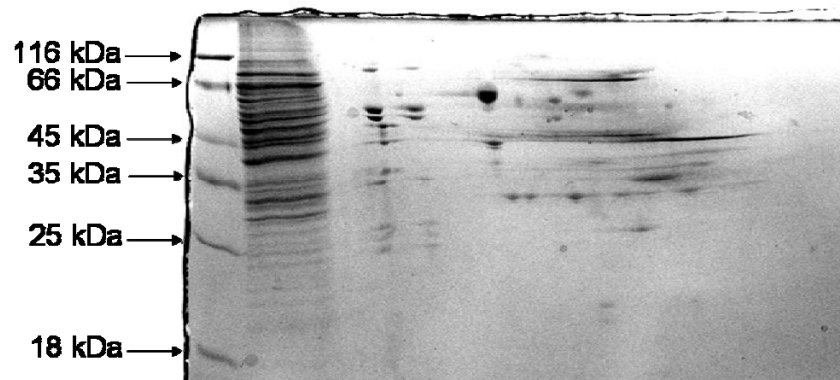


Abb. 4: Zweidimensionale Gelelektrophorese (BN-PAGE/SDS-PAGE) mitochondrialer Proteine. Die mitochondrialen Proteine (70 µg) wurden in Gegenwart von 0.7% Digitonin lysiert und zunächst durch BN-PAGE aufgetrennt. Gezeigt ist das Muster der Polypeptide nach anschließender Auftrennung durch SDS-PAGE.

Proteinkomplexe zeigen in Gegenwart von Detergenzien unterschiedliche Stabilitäten. Ihre Stabilität wird u.a. von der Art der Detergenzien, von der Konzentration der Detergenzien, und von der Ionenstärke bestimmt. Um den Einfluß der Detergenzien auf die Stabilität der ATP-Synthase zu untersuchen, wurden die isolierte Hefe-Mitochondrien in parallelen Ansätzen in Gegenwart von 1% Digitonin bzw. 1% Triton X-100 lysiert (Abb. 5).

Dem Lysepuffer wurde jeweils 1 mM PMSF zugesetzt und die Ansätze der lysierten mitochondrialen Proteine wurden 20 Min bei 0°C inkubiert. Die Proben wurden für 20 Min bei 14000 rpm und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit 7 µl BN-Probenpuffer vermischt und auf das Gel aufgetragen. Als Markerproteine dienten Amylase und Apoferritin. Es zeigte sich, dass die ATP-Synthase und die Komplexe der Atmungskette nach Lyse in Gegenwart von Digitonin (Spur 1) wesentlich leichter auftrennen und identifizieren ließen als nach Lyse durch Triton X-100 (Spur 2). Sowohl die dimeren, als auch die monomeren Komplexe der ATP-Synthase (V_{dimer} bzw. V_{monomer}) sind nachweisbar. Zudem sind Superkomplexe der Atmungskettenkomplexe III und IV sichtbar (III_2IV_2 und III_2IV_1).

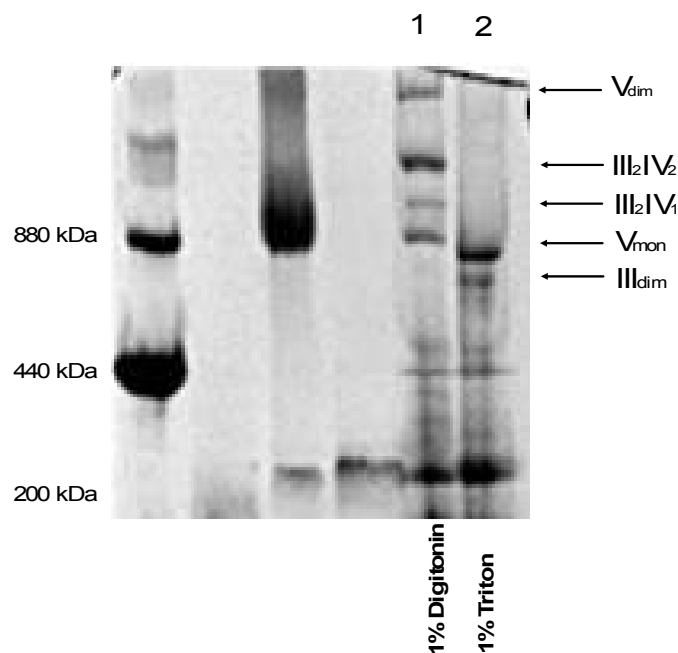


Abb. 5: BN-PAGE mitochondrialere Proteine nach Lyse in Gegenwart von 1% Triton bzw. 1% Digitonin. Pro Spur wurden jeweils 70 μ g mitochondriales Protein eingesetzt. Die Mitochondrien wurden aus einem Hefe-Wildtyp-Stamm isoliert. Als Markerproteine dienten Amylase (200 kDa) und Apoferritin (440 kDa).

Die Zuordnung der einzelnen Banden zu den jeweiligen Komplexen wurde durch SDS-PAGE in der zweiten Dimension bestätigt (Abb. 6). Nach Lyse mit Digitonin ließen sich u.a. die Untereinheiten α , β , und γ des F_1 -Teiles der ATP-Synthase identifizieren (Abb. 6, Teilabbildung a). Nach Lyse in Gegenwart von Triton-X-100 waren die Untereinheiten hingegen wesentlich schlechter aufgetrennt (Abb. 6, Teilabbildung b). In den weiteren Untersuchungen zur ATP-Synthase wurde deshalb bevorzugt Digitonin als Detergenz eingesetzt.

Sogfern Digitonin als zur Lyse der Mitochondrien eingesetzt wurde, ließen sich nach Anfärben der SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie oft weitere Untereinheiten der ATP-Synthase zuordnen (Abb. 7). Nachweisbar waren die Untereinheiten α , β , γ , δ , h, b, d, OSCP, sowie die Untereinheit 9 (Su9). Damit waren nun gute Voraussetzungen für eine Untersuchung der Assemblierung der ATP-Synthase gegeben.

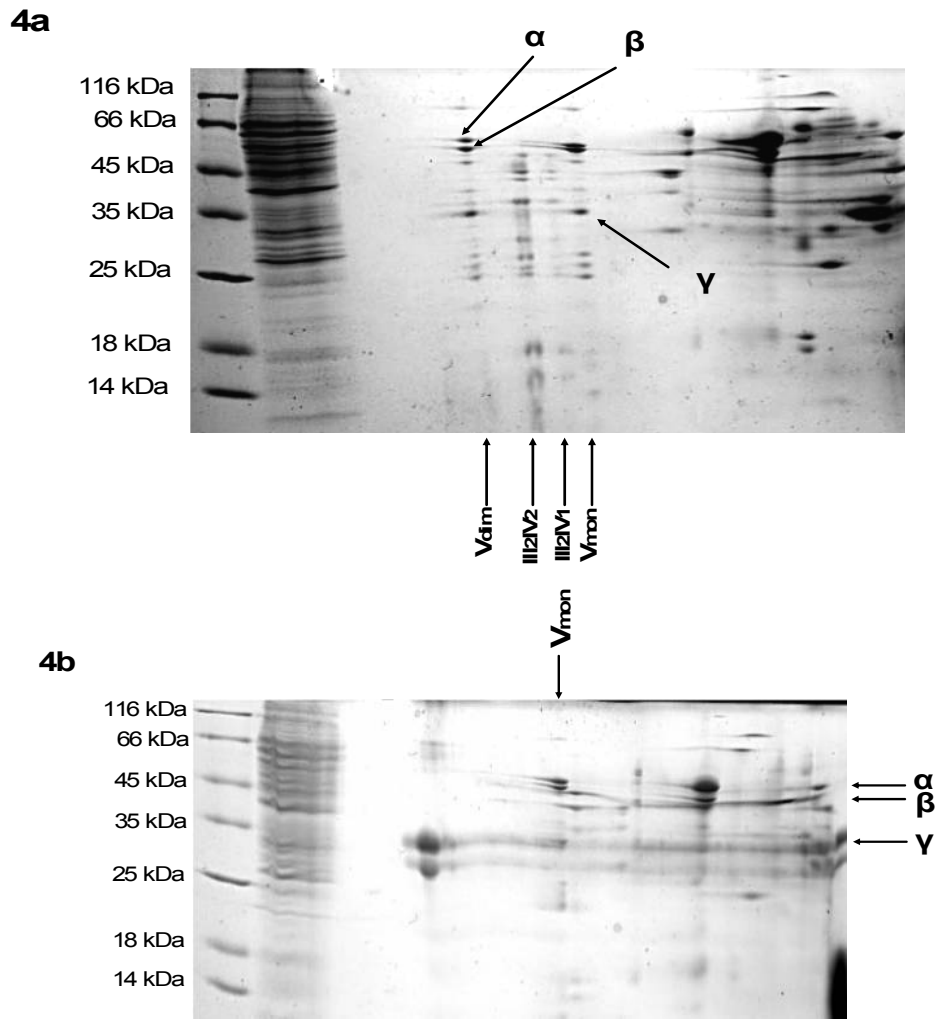


Abb. 6: Zweidimensionale Gelelektrophorese mitochondrialer Proteine (BN-PAGE/SDS-PAGE). Die Komplexe der mitochondrialen Proteine wurden zunächst durch BN-PAGE aufgetrennt, wie in Abb. 5 gezeigt. Einzelne Spuren wurden ausgeschnitten und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt.

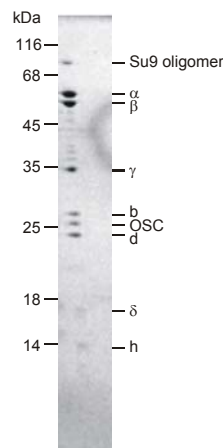


Abb. 7: Untereinheiten der ATP-Synthase.

3.1.2 Nachweis von Defekten in der Assemblierung der ATP-Synthase

In der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wurden in früheren Studien mehrere Gene identifiziert, die Proteine kodieren, die direkt oder indirekt an der Assemblierung der ATP-Synthase beteiligt sind (Ackerman und Tzagoloff, 2005; Devenish et al., 2000). Mutationen in diesen Genen haben oft ausgeprägte Defekte in der Assemblierung der ATP-Synthase zur Folge. Lassen sich derartige Defekte mit Hilfe der BN-PAGE nachweisen? Zur Beantwortung dieser Frage wurden über die Organisation Euroscarf (European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis, Frankfurt) Hefestämme bezogen, in denen einzelne der relevanten Gene deletiert sind. Die Stämme wurden auf Glucose kultiviert, es wurden Mitochondrien isoliert, und die jeweiligen Komplexe der ATP-Synthase wurden durch BN-PAGE analysiert. Die Polyacrylamid-Gele wurden zu diesem Zweck mit Coomassie angefärbt. Zunächst wurde untersucht, welche Konsequenzen sich für die Assemblierung der ATP-Synthase ergeben, wenn eine der hydrophilen Untereinheiten des Enzyms fehlt (Abb. 8a). Parallel zu Mitochondrien aus einem Wildtyp-Stamm (Spur 9) wurden Deletions-Stämme der folgenden Untereinheiten eingesetzt:

Gen	Untereinheit	Spur im BN-PAGE der Abb. 3.1.6a
<i>ATP1</i>	α	1
<i>ATP2</i>	β	2
<i>ATP3</i>	γ	3
<i>ATP15</i>	ε	7

Während sowohl die monomere als auch die dimere Form der ATP-Synthase aus Wildtyp-Stämmen durch BN-PAGE leicht zu identifizieren war, ließ sich die ATP-Synthase in keinem der Deletions-Stämme nachweisen (Abb. 8a). Auch konnten keine definierten Teilkomplexe nachgewiesen werden. Offenbar gilt generell, dass unvollständig assemblierte Komplexe der ATP-Synthase von endogenen Proteasen schnell abgebaut werden. Die Beobachtungen bestätigen Daten aus früheren Studien, in denen ebenfalls gefunden wurde, dass unvollständig assemblierte ATP-Synthasen instabil sind (Ackerman und Tzagoloff, 2005; Devenish et al., 2000).

Parallel wurden Mitochondrien untersucht, die aus Stämmen isoliert worden waren, in denen bestimmte Assemblierungsfaktoren der ATP-Synthase fehlen (Abb. 8a, Spuren 4-6 und Spur 8).

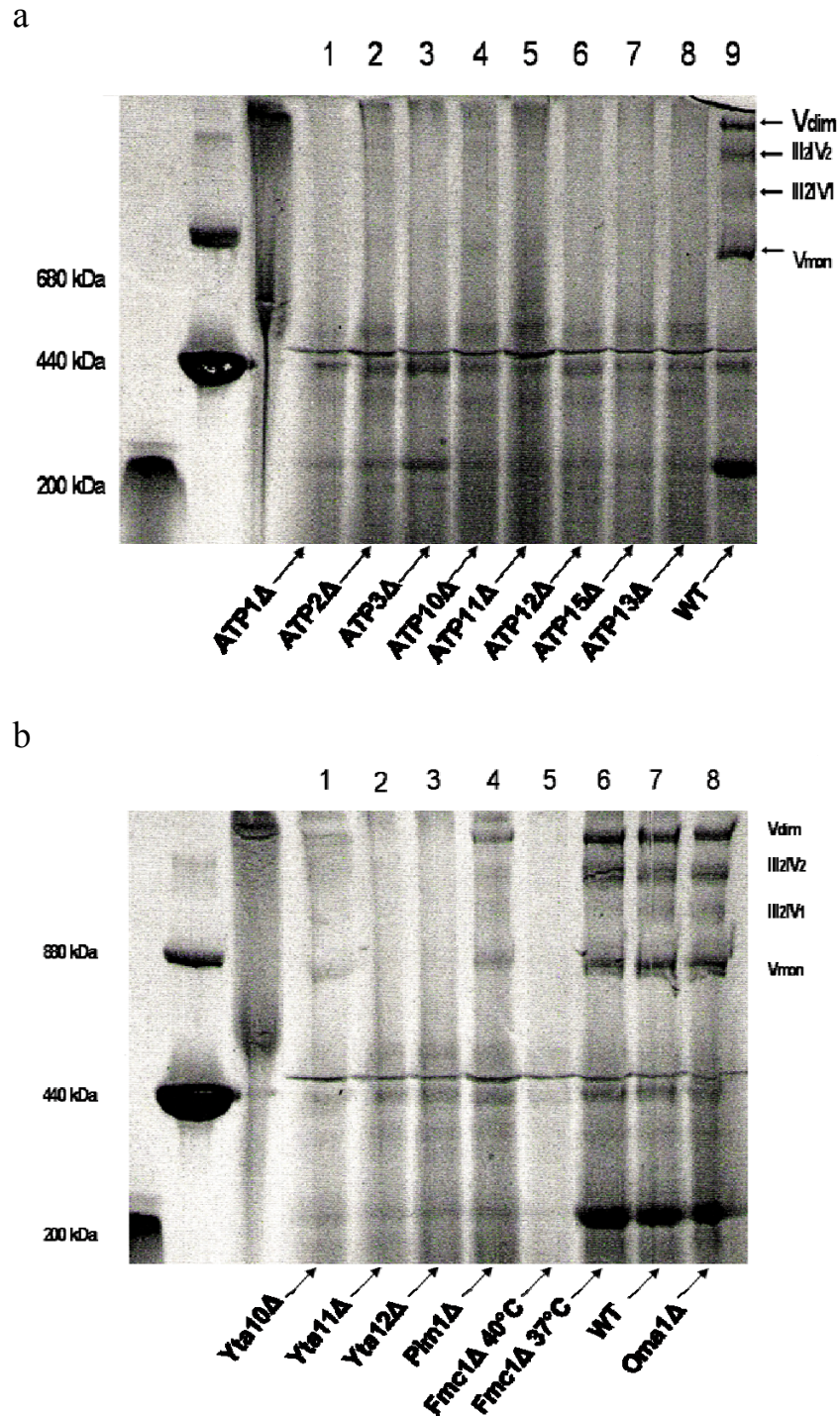


Abb. 8: Assemblierung der ATP-Synthase in verschiedenen Hefe-Stämmen. Zur Isolierung der Mitochondrien wurden die Stämme in Gegenwart von Glucose kultiviert. Die mitochondrialen Proteine wurden in Gegenwart von 1% Digitonin solubilisiert und durch Blaue Nativgelelektrophorese aufgetrennt. Das Polyacrylamid-Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Bezeichnet sind die Komplexe der ATP-Synthase (Komplex V, in monomerer bzw. in dimerer Form), sowie der Atmungskettenkomplexe III und IV. Beide Atmungskettenkomplexe bilden größere Komplexe der Zusammensetzung III₂IV₂ (1 000kDa) bzw. III₂IV₁ (750 kDa). (a) Mitochondrien aus Stämmen, denen einzelne Untereinheiten der ATP-Synthase, oder definierte Assemblierungsfaktoren fehlen. (b) Mitochondrien aus Stämmen, denen einzelne Proteasen fehlen, bzw. denen der Assemblierungsfaktor Fmc1 fehlt.

Im Einzelnen wurden Deletionsstämme der folgenden Gene untersucht:

Gen	Spur im BN-PAGE der Abb. 3.1.6a	Funktion des Proteins in der Assemblierung der ATP-Synthase (Referenz)
<i>ATP10</i>	4	Assemblierung des F ₀ -Teils (Ackerman et al., 1990)
<i>ATP11</i>	5	Assemblierung der β -Untereinheit (Ackerman et al., 1992)
<i>ATP12</i>	6	Assemblierung der α -Untereinheit (Wang und Ackerman, 1998)
<i>ATP13</i>	8	Expression der Untereinheit 9 (Su9) (Ackerman et al., 1991)

In der BN-PAGE der mitochondrialen Proteine dieser Stämme zeigte sich das gleiche Bild wie in der Untersuchung der Mitochondrien, denen einzelne Untereinheiten der ATP-Synthase fehlten. In den Mitochondrien aller dieser Stämme waren keinerlei Komplexe der ATP-Synthase nachweisbar. Offenbar reagieren die Mitochondrien der Hefe auf Störungen der Biogenese ihrer ATP-Synthase sehr empfindlich. Nicht nur das Fehlen einer Untereinheit, sondern bereits eine Störung in der Assemblierung einer der Untereinheiten scheint zu einem vollständigen Verlust der gesamten ATP-Synthase zu führen.

Atp12p, das Produkt des Gens *ATP12*, hat eine Funktion als Assemblierungsfaktor der α -Untereinheit der ATP-Synthase (Ackermann und Tzagoloff, 2005; Wang und Ackerman, 1998). Atp12p kooperiert seinerseits mit dem Protein Fmc1p (Lefebvre-Legendre et al., 2001). Das Protein ist insbesondere bei höheren Wachstumstemperaturen für die Hefe von Bedeutung. Auch für das Gen *FMCI* wurde nun von Euroscarf ein Deletionsstamm bezogen. Sofern der Stamm bei 37°C kultiviert wurde, zeigten die Mitochondrien eine uneingeschränkt intakte ATP-Synthase (Abb. 8b, Spur 6). Wenn der gleiche Stamm hingegen bei 40°C wuchs, lies sich in den Mitochondrien keinerlei ATP-Synthase mehr nachweisen (Abb. 8b, Spur 5). Die Beobachtung zeigt, dass, bei Ausfall dieses Assemblierungsfaktors, bereits geringfügige Änderungen in den Wachstumsbedingungen einen vollständigen Verlust der ATP-Synthase zur Folge haben können.

Yta10, Yta11, und Yta12 sind Proteine der mitochondrialen Innenmembran, die sowohl eine Funktion als Protease, als auch eine Funktion als Chaperone-Protein haben (Arlt et al., 1996). Alle drei Proteine zählen zur Gruppe der ATP-abhängigen Metalloproteasen (AAA-Proteasen, ATPases associated with a number of diverse cellular activities). Yta10 und Yta12 bilden einen gemeinsamen Komplex von 850 kDa (Arlt et al., 1996). Yta11 wurde als strukturell

ähnliches Protein der gleichen Familie identifiziert (Nakai et al., 1995), es ist auch unter dem Namen Yme1 bekannt. Bei der Analyse von Mitochondrien, die aus Deletions-Stämmen der entsprechenden Gene isoliert wurden, zeigte sich, dass alle drei Proteine auch in für die Biogenese der ATP-Synthase von Bedeutung sind. Während in Mitochondrien des *yta10*-Deletions-Stammes nur geringe Mengen der ATP-Synthase nachweisbar waren (Abb. 8b, Spur 1), schienen die Mitochondrien der beiden anderen Deletions-Stämme keinerlei ATP-Synthase zu enthalten (Abb. 8b, Spuren 2 und 3). Der Verlust anderer Proteasen, wie Pim1 und Oma1, zeigte hingegen keine ausgeprägten Effekte (Spuren 4 und 8). Anders als Yta10, Yta11 und Yta12 haben diese Proteasen vermutlich keine Funktion als Chaperon-Proteine und greifen deshalb auch nicht in die Biogenese der ATP-Synthase ein.

3.1.3 Assemblierung neu importierter Untereinheiten

In den Hefe-Stämmen, denen einzelne Gene der Untereinheiten der ATP-Synthase fehlen, lies sich durch BN-PAGE keine ATP-Synthase mehr nachweisen. Um die Assemblierung einzelner Untereinheiten untersuchen zu können, wurde deshalb geprüft, ob radioaktiv markierte Vorstufenproteine, die *in vitro* in isolierte Mitochondrien importiert wurden, anschließend als Bestandteile intakter ATP-Synthase nachweisbar waren.

Als Modellprotein diente in diesen Experimenten zunächst die β -Untereinheit der ATP-Synthase. Die β -Untereinheit, ein Protein von ca. 50 kDa, ist im F_1 -Teil der ATP-Synthase unmittelbar an der Bildung der katalytischen Zentren beteiligt (Abrahams et al., 1994). Um die Biogenese des Proteins in isolierten Mitochondrien untersuchen zu können, wurde die Untereinheit in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin synthetisiert und dann in isolierte Mitochondrien aus einem Hefe-Wildtyp-Stamm (YPH500) importiert (Abb. 9):

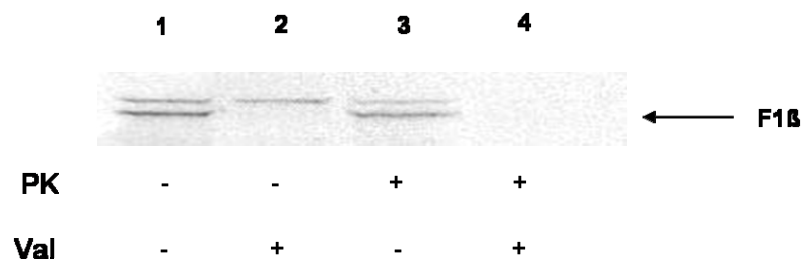


Abb. 9. Import der ^{35}S -markierten Untereinheit $F_1\beta$ in isolierte Mitochondrien. Die Untereinheit wurde in Retikulozytenlysat synthetisiert und dann 5 Min bei 25°C mit isolierten Hefe-Mitochondrien inkubiert. Die Proben 2 und 4 enthielten 1 mM Valinomycin um das Membranpotential zu entkoppeln. Die Mitochondrien der Proben 3 und 4 wurden anschließend bei 0°C für 10 Min mit 20 $\mu\text{g/ml}$ Proteinase K (PK) inkubiert. Die Mitochondrien wurden dann reisoliert und die mitochondrialen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt.

Das Vorstufenprotein wurde Membranpotential-abhängig importiert und dabei zum reifen Protein prezessiert. Um einen Eindruck von der Geschwindigkeit des Imports zu gewinnen, wurde $F_1\beta$ für unterschiedliche Zeiten mit den isolierten Mitochondrien inkubiert (Abb. 10). Es zeigte sich, dass bei längeren Importzeiten bis zu etwa 60% des radioaktiv markierten Proteins importiert wurden. Nach ca. 20 Minuten war die Translokation der importkompetenten Form der Untereinheit abgeschlossen:

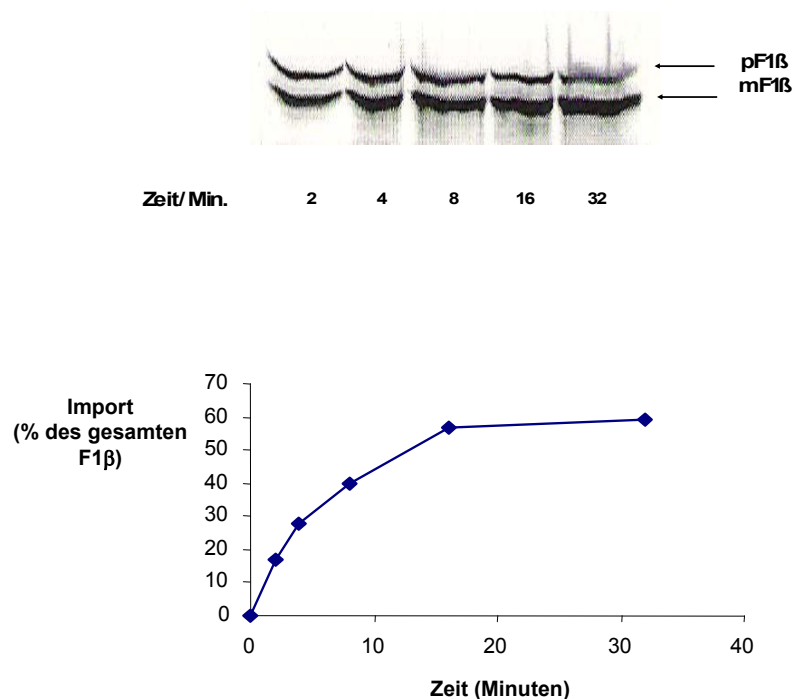


Abb. 10. Importkinetik des $F_1\beta$. Die β -Untereinheit wurde in Retikulozytenlysat synthetisiert und für unterschiedliche Zeiten mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Die Mitochondrien wurden dann mit Proteinase K inkubiert und reisoliert. Im Anschluß an eine SDS-PAGE wurde zur Auswertung ein Phosphorimager verwendet. Die Gesamtmenge an $F_1\beta$, die pro Ansatz eingesetzt worden war, wurde als 100% gesetzt.

Nachdem sich die ^{35}S -markierte β -Untereinheit effizient importieren ließ, wurde geprüft, ob sich durch BN-PAGE ein Einbau der Untereinheit in die endogene ATP-Synthase der Mitochondrien nachweisen ließ. Die Untereinheit wurde in zwei parallelen Ansätzen entweder für 2 oder für 20 Min. bei 25°C importiert. Die Mitochondrien wurden dann mit Proteinase K behandelt, die Proteolyse durch Zugabe von PMSF beendet, und die Mitochondrien wurden reisoliert. Nach Lyse in Gegenwart von 1% Digitonin wurden die mitochondrialen Proteine durch BN-PAGE getrennt (Abb. 11). Nach einer Importreaktion von 20 Min zeigte sich ein Einbau in die monomere Form der ATP-Synthase (Abb. 11, Spur 2). Nach 2 Min war hingegen noch keine Assemblierung erkennbar (Abb. 11, Spur 1).

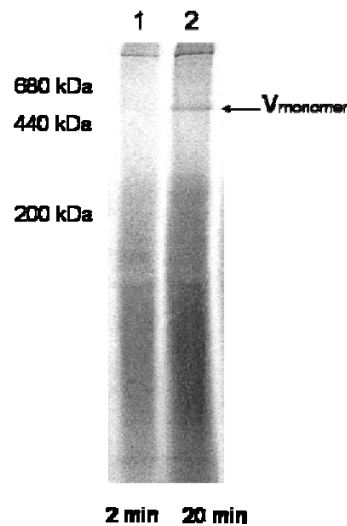


Abb. 11: BN-PAGE der mitochondrialen Proteine nach Import der radioaktiv markierten Unter-einheit $F_1\beta$. Für den Import wurden Mitochondrien (pro Ansatz 30 μg Protein) des Wildtyp- Stammes YPH500 eingesetzt. Die Mitochondrien wurden mit jeweils 6 μl Retikulozytenlysat inkubiert. Die Importreaktion wurde nach 2 Min bei 25°C (Spur 1) bzw. nach 20 Min bei 25°C beendet. Die monomere Form der ATP-Synthase ist als Bande bei ca. 500 kDa nachweisbar (Vmonomer).

Um zu überprüfen, ob nach 2 Min bereits hinreichende Mengen an $F_1\beta$ importiert waren, wurden die Proteinkomplexe der entsprechenden Spur des BN-PAGE durch SDS-PAGE untersucht (Abb. 12). Dabei zeigte sich, dass $F_1\beta$ zwar bereits importiert, aber noch nicht assembliert war:

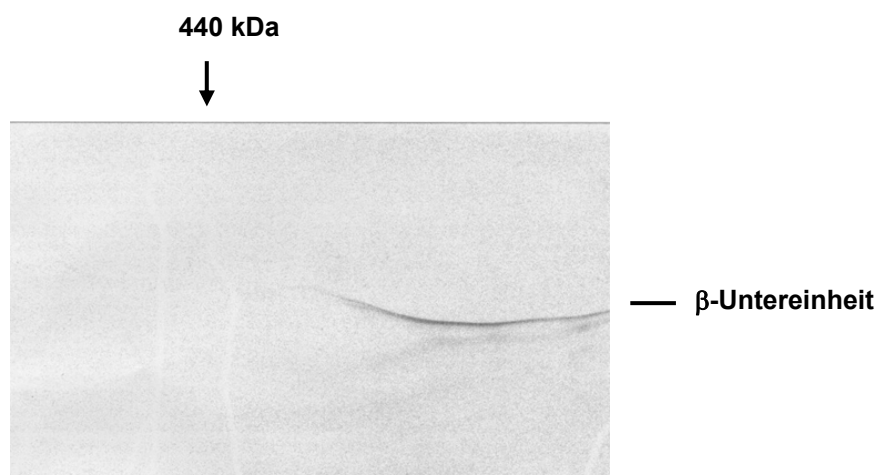


Abb. 12. SDS-PAGE im Anschluß an eine BN-PAGE nach kurzzeitigem Import der radioaktiv markierten β -Untereinheit. Die β -Untereinheit ($F_1\beta$) wurde 2 Min. bei 25°C importiert wie im Experiment der Abbildung 3.1.11, Spur 1.

Das experimentelle System wurde anschließend genutzt, um die Assemblierung der γ -Untereinheit näher zu untersuchen.

3.1.4 Assemblierung der γ -Untereinheit

Die γ -Untereinheit bildet den zentralen Stiel, der die Verbindung zwischen dem F_1 -Teil und dem F_0 -Teil der ATP-Synthase bildet. Die Abschnitte der γ -Untereinheit, die in den F_1 -Teil hinein ragen, bestehen aus zweier antiparallelen α -Helices (Abb. 13; Abrahams et al., 1994). Das Segment, das beide Helices miteinander verbindet, ist im Rotor der ATP-Synthase verankert. Es wurde bereits gezeigt, dass eine ATP-Synthase, der mehrere C-terminale Aminosäuren fehlen, keine dramatischen Auswirkungen auf die Aktivität des Enzyms hat. Auch die Assemblierung der ATP-Synthase scheint nach den bisherigen Untersuchungen kaum beeinträchtigt zu sein (Sokolov et al. 1999, Müller et al. 2002, Hossain et al., 2006). Ähnlich wurde auch für den N-Terminus nachgewiesen, dass mehrere Aminosäuren fehlen können, ohne das Enzym zu inaktivieren (Ni et al., 2005). Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, die Rolle sowohl des C- and auch N-terminus der ATP-Synthase in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* systematisch zu untersuchen.

Zu diesem Zweck wurden Plasmide konstruiert, die verkürzte Versionen der γ -Untereinheit kodieren. Die Plasmide wurden freundlicherweise von Herrn Dr. Panagiotis Papatheodorou in der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt:

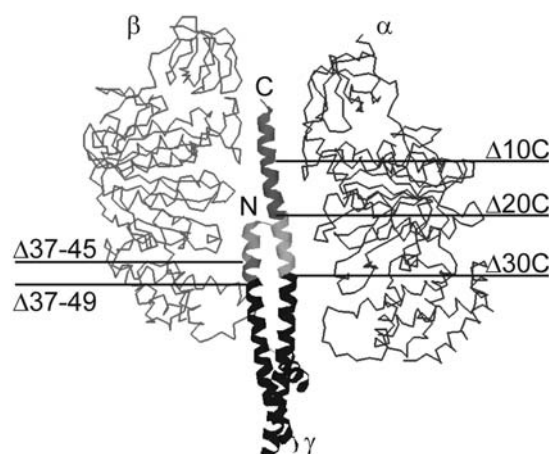


Abb. 13: Schematisch Darstellung des F_1 -Teils der ATP-Synthase (nach Abrahams et al., 1994). Eingezeichnet sind die N- bzw. C-terminalen Segmente, die in den Experimenten der vorliegenden Arbeit verwendeten Konstrukten deletiert waren.

Drei der Deletionen betrafen den C-Terminus der Untereinheit, so dass 10, 20, bzw. 30 Aminosäuren fehlten ($\Delta 10C$, $\Delta 20C$, $\Delta 30C$). Zwei Deletionen betrafen den N-Terminus (Deletion der Aminosäuren 37-45, bzw. 37-49). Dabei wurde berücksichtigt, dass die neu synthetisierte γ -Untereinheit eine Präsequenz von 33 Aminosäuren hat, die im reifen Protein

nicht mehr enthalten ist (Paul et al., 1994). Die verwendete Nomenklatur (37-45, bzw. 37-49) bezieht sich auf das Vorstufenprotein.

Es wurde nun zunächst untersucht, ob die Deletionen einen Einfluß auf den Import der Konstrukte haben. Die Vorstufenproteine wurden in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin synthetisiert und dann in isolierte Hefe-Mitochondrien importiert. Im Vergleich zur authentischen γ -Untereinheit wurden alle Konstrukte mit ähnlicher Importeffizienz importiert (Abb. 14):

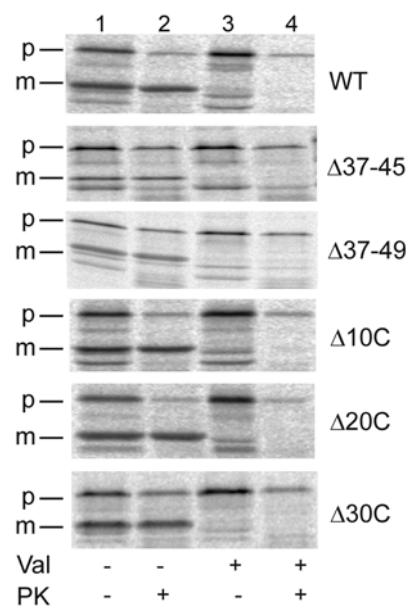
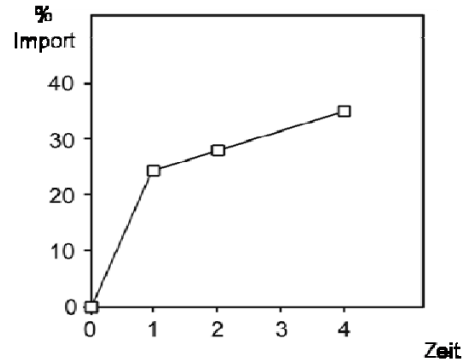


Abb. 14. Import verkürzter Versionen der γ -Untereinheit der ATP-Synthase in Mitochondrien. Die Proteine wurden in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin synthetisiert und 10 Min bei 25°C mit isolierten Hefe-Mitochondrien inkubiert. Die Ansätze 3 und 4 enthielten 2 mM Valinomycin (+ Val) zum Entkoppeln des Membranpotentials. Die Mitochondrien wurden anschließend mit $30\ \mu\text{g} / \text{ml}$ Proteinase K (+ PK) behandelt und durch Zentrifugation reisoliert. Die mitochondrialen Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphorimagers nachgewiesen. p, Vorstufenprotein (*precursor*), m, reifes Protein (*mature protein*).

Um den Import der Proteine besser vergleichen zu können, wurden die Proteine für unterschiedliche Zeiten mit den Mitochondrien inkubiert. Die authentische γ -Untereinheit wurde in Abhängigkeit von der Präparation der Mitochondrien und von der Charge des Retikulozytenlysates innerhalb der ersten 4 Minuten bei 25°C zu ca. 20-40% importiert (Abb. 15a). Daraufhin wurden die verkürzten Versionen parallel zur originalen γ -Untereinheit für 4 Min unter den gleichen Bedingungen importiert. Im direkten Vergleich zeigte sich, dass die

verkürzten Untereinheiten sogar mit etwas höherer Effizienz importiert wurden als die Wildtyp-Version (Abb. 15b):

a



b

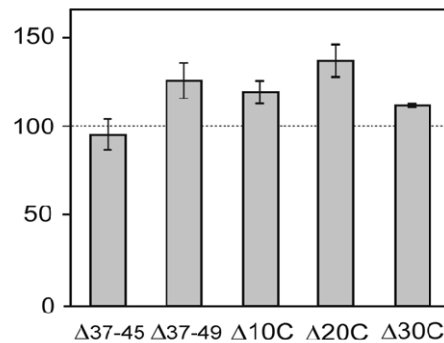


Abb. 15. Importkinetik des $F_1\gamma$ unter Standardbedingungen. Die ^{35}S -markierten Proteine wurden in Retikulozytenlysat synthetisiert und 4 Min. bei 25°C mit isolierten Mitochondrien inkubiert wie in der Lgende zur Abbildung 3.1.2.3 beschrieben. Die relativen Mengen an importierten Protein wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers unter Verwendung des Computer-Programmes Aida-Image-Analyzer bestimmt. A, Import der authentischen γ -Untereinheit; B, relative Importeffizienz der verschiedenen verkürzten Untereinheiten. Die relative Menge der nach 4 Min. importierten unverkürzten γ -Untereinheit wurde als 100% definiert.

Die Importexperimente zeigen, dass weder eine Verkürzung der N-terminalen Segmente der Untereinheit, noch eine Verkürzung der C-terminalen Segmente zu einer Behinderung der Translokation in die Mitochondrien führt. In weiteren Experimenten wurde der Frage nachgegangen, ob die Verkürzungen Defekte in der Assemblierung zur Folge haben.

Der Einbau der γ -Untereinheit in die vollständige ATP-Synthase wurde mit Hilfe der BN-PAGE untersucht. Anders als in den Importexperimenten, zeigten die verkürzten Versionen der γ -Untereinheit dabei erhebliche Unterschiede (Abb. 16):

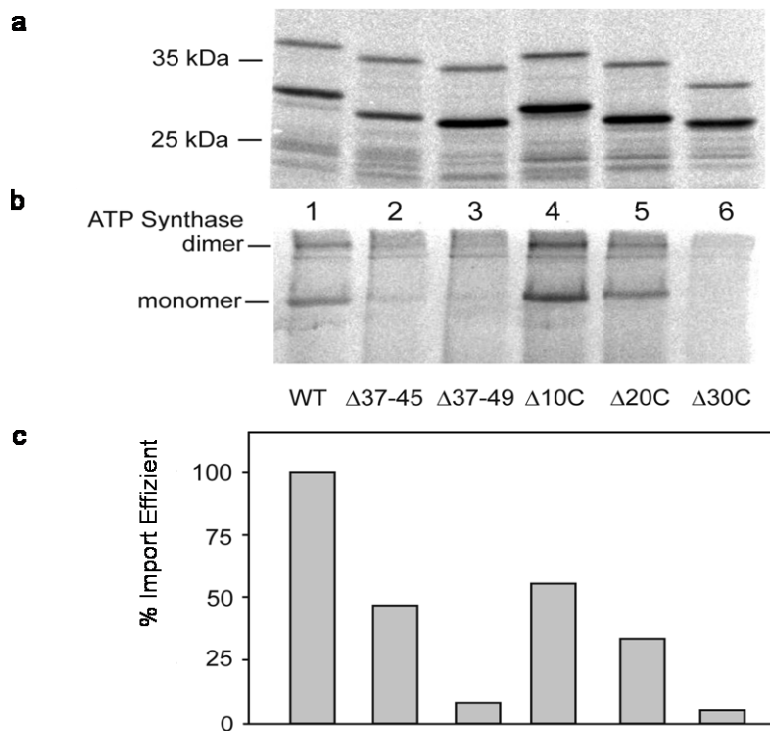


Abb. 16. Assemblierung verkürzter Versionen der γ -Untereinheit in die ATP-Synthase. (a) Import der unterschiedlich verkürzten γ -Untereinheit in isolierte Mitochondrien. Die jeweiligen Vorstufenproteine wurden in Gegenwart von ^{35}S -Methionin in Retikulozytenlysat synthetisiert und 10 Min bei 25°C mit isolierten Hefe-Mitochondrien inkubiert. Gezeigt ist das Muster der Banden nach SDS-PAGE und Auswertung im Phosphorimager. (b) Assemblierung der radioaktiv markierten γ -Untereinheit in der monomeren und dimeren Form der ATP-Synthase. Die Proteinkomplexe wurden durch BN-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht. (c) Relative Effizienz der Assemblierung der Untereinheiten. Die relativen Mengen der importierten Proteine (wie in a gezeigt) wurden in Bezug gesetzt zur relativen Menge der jeweiligen Proteinkomplexe (wie in b gezeigt). Die relativen Mengen der Wildtyp- γ -Untereinheit wurden als 100% gesetzt.

Es zeigte sich, dass die verkürzten γ -Untereinheiten $\Delta 10C$ und $\Delta 37-45$ nur noch etwa halb so effizient in die ATP-Synthase eingebaut wurden wie die Wildtyp-Untereinheit. Die $\Delta 20C$ -Untereinheit wurde nur noch zu etwa 30% eingebaut. Nur geringe Mengen wurden von den weiter verkürzten Untereinheiten $\Delta 37-49$ und $\Delta 30C$ in den Komplexen der ATP-Synthase nachgewiesen. Das quantitative Verhältnis in dem die Konstrukte jeweils in der monomeren relativ zur dimeren Form der ATP-Synthase assembliert waren, zeigte keine signifikanten Unterschiede. In allen Fällen wurden 60-65% der Untereinheit in den Monomeren und 35-40% in den Dimeren gefunden.

Die Unterschiede in der Assemblierung der verschiedenen Konstrukte wurde durch zweidimensionale BN-PAGE/SDS-PAGE bestätigt (Abb. 17):

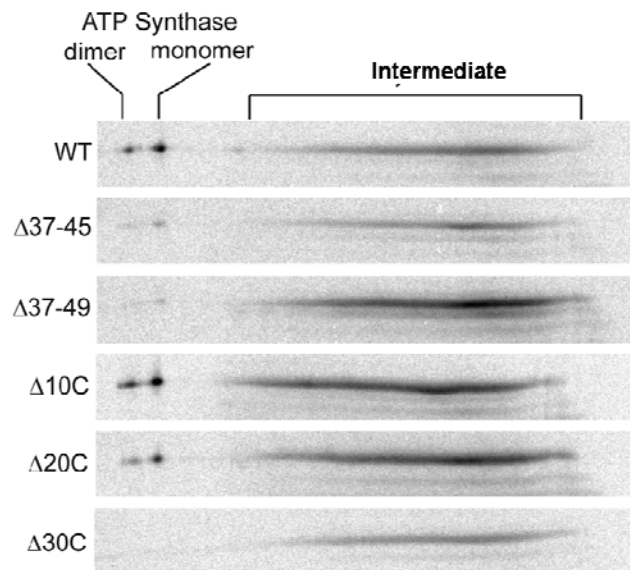


Abb. 17. BN-PAGE/SDS-PAGE zum Nachweis der Assemblierung verkürzter Versionen der γ -Untereinheit. Die radioaktiv markierten Untereinheiten wurden in isolierte Mitochondrien importiert, die Mitochondrien wurden mit Proteinase K behandelt und reisoliert. Die Mitochondrien wurden dann in Gegenwart von Digitonin lysiert und die Proteine zunächst durch BN-PAGE (erste Dimension) und dann durch SDS-PAGE (zweite Dimension) getrennt. Die Verteilung der Radioaktivität wurde dann mit Hilfe eines Phosphorimagers sichtbar gemacht.

Auch im SDS-PAGE (der zweiten Dimension) ließ sich die radioaktiv markierte γ -Untereinheit teils in der dimeren, teils in der monomeren ATP-Synthase nachweisen. Zu einem erheblichen Teil war die neu importierte γ -Untereinheit allerdings auf einen breiten Bereich des Polyacrylamidgeles verteilt, der einer Masse von ca. 66-440 kDa entsprach. Vermutlich handelt es sich dabei um Komplexe, die sich zwischen der γ -Untereinheit und den verschiedenen Chaperoneproteinen und Faltungshelfern der Mitochondrien bilden (in der Abb. 17 als Intermediate der Assemblierung bezeichnet).

Die Experimente zeigen, dass weder die N-, noch die C-terminalen Aminosäuren der γ -Untereinheit für den Einbau in die ATP-Synthase benötigt werden. Wenn mehr als 9, bzw. mehr als 20 C-terminale Aminosäuren fehlen, ist die Assemblierung der Untereinheit allerdings erheblich gestört. Unter den Bedingungen der BN-PAGE lassen sich dann nur noch weniger als 10% der neu importierten γ -Untereinheit als Bestandteile der ATP-Synthase detektieren.

3.2 Biogenese des Dicarboxylattranslokators

Die meisten Proteine der mitochondrialen Innenmembran sind Mitglieder der Familie der Metabolitranslokatoren (*Mitochondrial carrier family*, MCF). Der häufigste und auch am besten charakterisierte Vertreter dieser Proteinfamilie ist der ADP/ATP-Translokator (*ADP/ATP carrier*, AAC). Ein weiteres Mitglied der Familie ist der Dicarboxylattranslokator (*Dicarboxylate carrier*, DIC). Alle Metabolitranslokatoren sind Proteine der mitochondrialen Innenmembran und damit letztlich in der gleichen Membran verankert wie die ATP-Synthase. Gleichwohl folgt die Biogenese der Metabolitranslokatoren im Vergleich zur ATP-Synthase grundsätzlich anderen Prinzipien (Bolender et al., 2008; Neupert, 1997). So wird die γ -Untereinheit der ATP-Synthase nach der Translokation durch die TOM-Pore zunächst unter Vermittlung des TIM23-Komplexes in die Matrix importiert, und hier mit den anderen Untereinheiten zur ATP-Synthase assembliert. Der DIC wird zwar ebenfalls über die TOM-Pore in die Mitochondrien importiert, inseriert dann aber unmittelbar in die Innenmembran. Die Membraninsertion wird vom TIM22-Komplex vermittelt. Komponenten der Matrix sind an der Biogenese des DIC vermutlich nicht beteiligt.

3.2.1 Import des Dicarboxylattranslokators

Seit langem ist bekannt, dass alle mitochondrialen Metabolitranslokatoren eine bestimmte Sequenz enthalten, P x D/E x x K/R, die sogen. *Carrier signature* (Nury et al., 2006; Nelson et al., 1998). Diese befindet sich jeweils am C-terminalen Ende der ungeradzahigen Helices, also an den Enden der Helices H1, H3, und H5. Als die Arbeiten der vorliegenden Studie aufgenommen wurden, war über die Funktion der *Carrier signature* kaum etwas bekannt. U.a. war die Vermutung geäußert worden, dass die *Carrier signature* in der Biogenese der Translokatoren von Bedeutung sein könnte. Konkret war spekuliert worden, dass die *Carrier signature* an der Bindung an die kleinen TIM-Komplexe des Intermembranraumes (Tim9/Tim10) beteiligt sein könnten, die als Chaperon-Proteine den Transport der Metabolitranslokatoren vom TOM-Komplex zum TIM22-Komplex vermitteln (Bauer et al., 2000; Sirrenberg et al., 1998). Diese Hypothese sollte nun experimentell überprüft werden. Der DIC gehört zu den Metabolitranslokatoren, die lediglich in ihren Helices H1 und H5 eine vollständige *Carrier signature* aufweisen. In der zentralen Helix H3 ist zwar eine negativ geladene Seitenkette (D) enthalten, es fehlt aber sowohl das Prolin (P), als auch die positiv geladene Aminosäure (K/R) des P x D/E x x K/R-Motivs. In der Arbeitsgruppe wurden nun

von Herrn Panagiotis Papatheodorou Plasmide konstruiert, die Derivate des DIC kodieren, in denen die Aminosäuren der *Carrier signature* in den Helices H1 (*Carrier signature* CS1) und H5 (*Carrier signature* CS2) gegen Alanine (A) ausgetauscht sind (Abb. 18a).

Es wurden dann parallel vier Proteine in Retikulozytenlysat synthetisiert:

- DIC der originale (Wildtyp) DIC der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*
- DIC_{ΔCS1} Derivat des DIC, in dem die Aminosäuren der *Carrier signature* CS1 gegen Alanine ausgetauscht sind
- DIC_{ΔCS2} Derivat, in dem die Aminosäuren der *Carrier signature* CS2 gegen Alanine ausgetauscht sind
- DIC_{ΔCS1/2} Derivat, in dem die Aminosäuren der *Carrier signature* in CS1 und CS2 gegen Alanine ausgetauscht sind

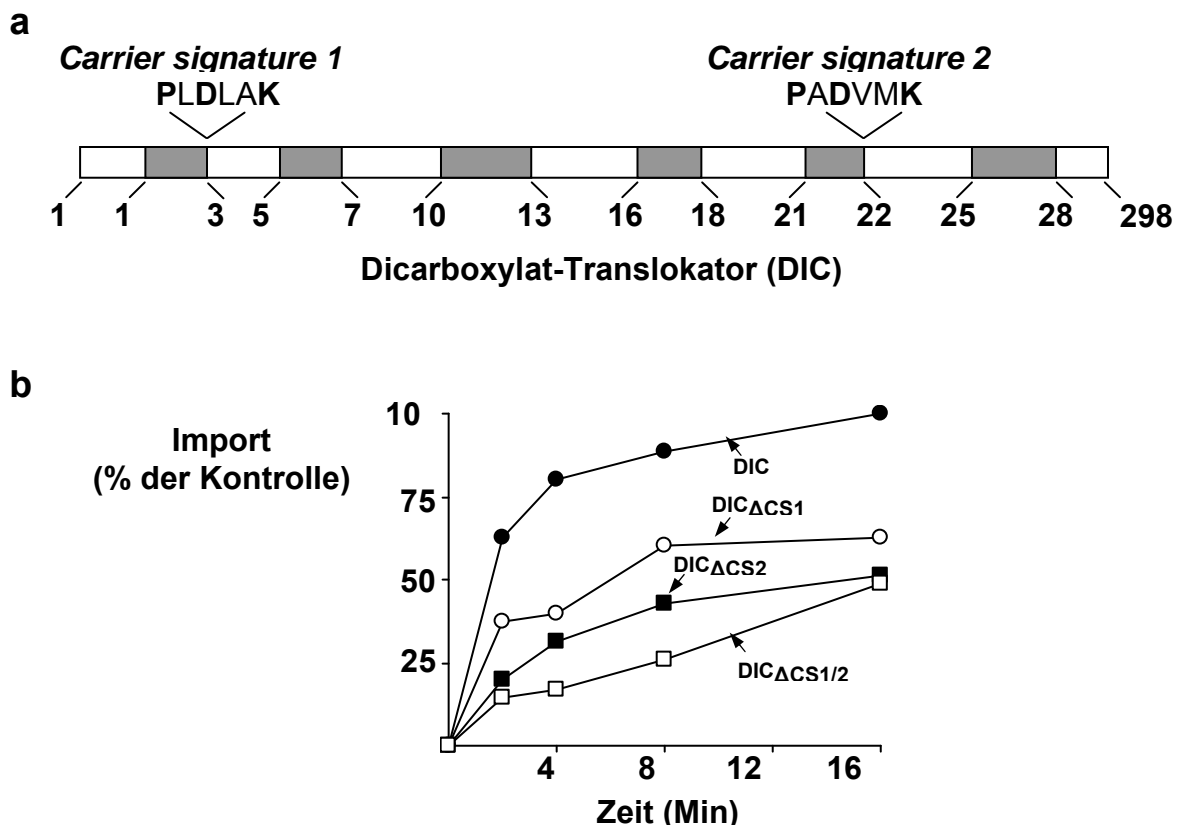


Abb. 18. Import verschiedener Derivate des Dicarboxylattranslokators (DIC, aus der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*) in Mitochondrien. (a) Lokalisation der *Carrier signature* in der Primärstruktur des DIC. (b) Import in Mitochondrien. Die DIC-Derivate wurden in Retikulozytenlysat synthetisiert und mit isolierten Hefe-Mitochondrien inkubiert. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Mitochondrien mit Proteinase K behandelt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und die importierten Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe eines Phosphorimagers. Der höchste Wert wurde als 100% definiert (Kontrolle).

Unter Verwendung verschiedener Präparationen von Hefe-(Wildtyp)-Mitochondrien wurde dann, gemeinsam mit Frau cand. Dipl. Biol. Katrin Baltz, die Importeffizienz der verschiedenen Proteine miteinander verglichen. Ein charakteristisches Ergebnis ist in der Abb. 18b gezeigt. Übereinstimmend wurde in den Importexperimenten gefunden, dass der modifizierte Dicarboxylatranslokator $DIC_{\Delta CS1/2}$, in dem sowohl die *Carrier signature* CS1, als auch die *Carrier signature* CS2 gegen Alanine ausgetauscht ist, wesentlich langsamer in die Mitochondrien importiert wurde als der originale Wildtyp-DIC. Sofern die *Carrier signature* lediglich in der Helix 1 bzw. in der Helix 5 gegen Alanine ausgetauscht war, wurden Importgeschwindigkeiten gefunden, die zwischen den Wildtyp- und den CS1/2-Werten lagen. Generell waren die Effekte für das $\Delta CS2$ -Konstrukt etwas ausgeprägter als für das $\Delta CS1$ -Konstrukt.

Die Importexperimente zeigten erstmals, dass ein Verlust der *Carrier signature* in einem Metabolitranslokator tatsächlich zu einer erheblichen Verlangsamung des Importes führt. Allerdings zeigen die Untersuchungen auch, dass die *Carrier signature* für die Translokation über die mitochondriale Außenmembran nicht essentiell ist. Selbst bei vollständigem Verlust der *Carrier signature* zeigte das Derivat $DIC_{\Delta CS1/2}$ nach einer Importzeit von 16 Minuten immerhin eine Importeffizienz von etwa 50% des Wildtyp-DIC. Drastische Unterschiede wurden nur innerhalb der ersten 5 Minuten der Importreaktion gefunden. Es kann somit geschlossen werden, dass die *Carrier signature* des DIC der Hefe den Import in die Mitochondrien zwar signifikant erleichtert, dass sie aber für den Import nicht essentiell ist.

3.2.2 Chemische Quervernetzung des Dicarboxylatranslokators mit dem Tim9/Tim10-Komplex

Allgemein wird davon ausgegangen, dass der Import sämtlicher Metabolitranslokatoren unter Beteiligung der kleinen Tim-Proteine Tim9 und Tim10 des Intermembranraums abläuft (Bauer et al., 2000). Vermutlich binden die translozierenden Metabolitranslokatoren unmittelbar nach Insertion in die TOM-Pore sofort an die kleinen TIM-Komplexe und werden dadurch im Intermembranraum festgehalten und dann auch in den Intermembranraum hinein gezogen. In diesem Schritt könnte die *Carrier signature* insofern von Bedeutung sein, als die spezifische Anbindung der Metabolitranslokatoren an die Tim-Proteine von der *Carrier signature* vermittelt werden könnte (Bauer et al., 2000; Sirrenberg et al., 1998). Um zu klären, ob der Import des DIC tatsächlich von einer Bindung an die Tim9/Tim10-Komplexe

vermittelt wird, wurde nun versucht, durch chemische Quervernetzung eine direkte Wechselwirkung nachzuweisen.

Der DIC wurde wiederum in Retikulozytenlysat synthetisiert und dann in isolierte Hefe-Mitochondrien importiert. Dabei wurde Valinomycin zugegeben, um das Membranpotential der Mitochondrien aufzuheben. Unter diesen Bedingungen akkumulieren die Metabolit-Translokatoren im TOM-Kanal und im mitochondrialen Intermembranraum (Neupert, 1997). Die Mitochondrien mitsamt den akkumulierten Translokationsintermediaten des DIC wurden dann durch Zentrifugation reisoliert, resuspendiert, und in Gegenwart von Sulfo-MBS als Quervernetzungsreagenz inkubiert. Es ließen sich dann mehrere Quervernetzungsprodukte nachweisen, die allerdings zunächst nicht genauer identifiziert werden konnten (Abb. 19):

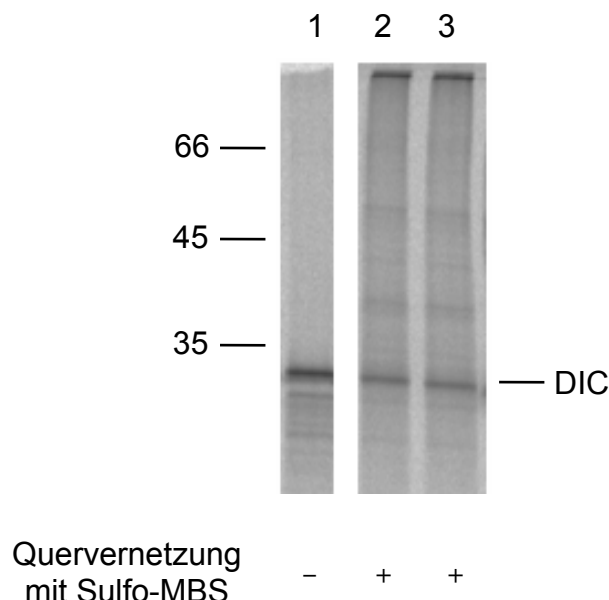


Abb. 19. Quervernetzung des DIC durch Reaktion mit Sulfo-MBS. ^{35}S -markierter DIC wurde in Retikulozytenlysat synthetisiert und dann in Gegenwart von Valinomycin in isolierte Hefe-Mitochondrien importiert. Die Mitochondrien wurden anschließend reisoliert und in SEM-Puffer resuspendiert (jeweils 30 μg Protein in 900 μl). Zu den Proben 2 und 3 wurde Sulfo-MBS zugegeben, die Endkonzentration betrug in beiden Proben 20 μg Sulfo-MBS/ml. Nach einer Inkubationszeit von 60 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 μl 1 M Glycin, pH 7.2, sowie 1 μl Mercaptoethanol beendet, und die Proteine wurden durch Zugabe von Trichloressigsäure präzipitiert. Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und mit Hilfe eines Phosphorimagers nachgewiesen.

Um zu prüfen, ob unter den Quervernetzungsprodukten auch Reaktionsprodukte mit Tim9 oder Tim10 vorhanden waren, wurden anschließend gemeinsam mit Frau Ilaria Palmisano (Institut für Biochemie der Universität Lecce, Italien) Immunfällungen durchgeführt. Es

wurden polyklonale Antiseren verwendet, die entweder spezifisch gegen Tim9 gerichtet waren, oder die sowohl Tim9 und Tim10 erkannten. Die Seren wurden freundlicherweise von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Nikolaus Pfanner (Universität Freiburg) zur Verfügung gestellt. Zur Kontrolle der Spezifität der Immunfällungen wurden Präimmunsere verwendet. In den Experimenten zeigte sich, dass mit Hilfe der Antikörper gegen Tim9 tatsächlich ein Reaktionsprodukt der Quervernetzung präzipitiert werden konnte (Abb. 20, Spur 5). Die Spezifität der Präzipitation wurde durch die Proben mit Präimmunsere bestätigt (Abb. 20, Spuren 3 und 4). Geringe Mengen des radioaktiv markierten DIC ließen sich trotz mehrerer Waschschriffe nicht ganz eliminieren, sie wurden auch in den Proben ohne Sulfo-MBS gefunden (Abb. 20, Spuren 1 und 2). Mit Hilfe des sowohl gegen Tim9, als auch gegen Tim10 gerichteten Antiserums wurden sogar zwei Reaktionsprodukte ähnlicher Größe präzipitiert (Abb. 20, Spur 6).

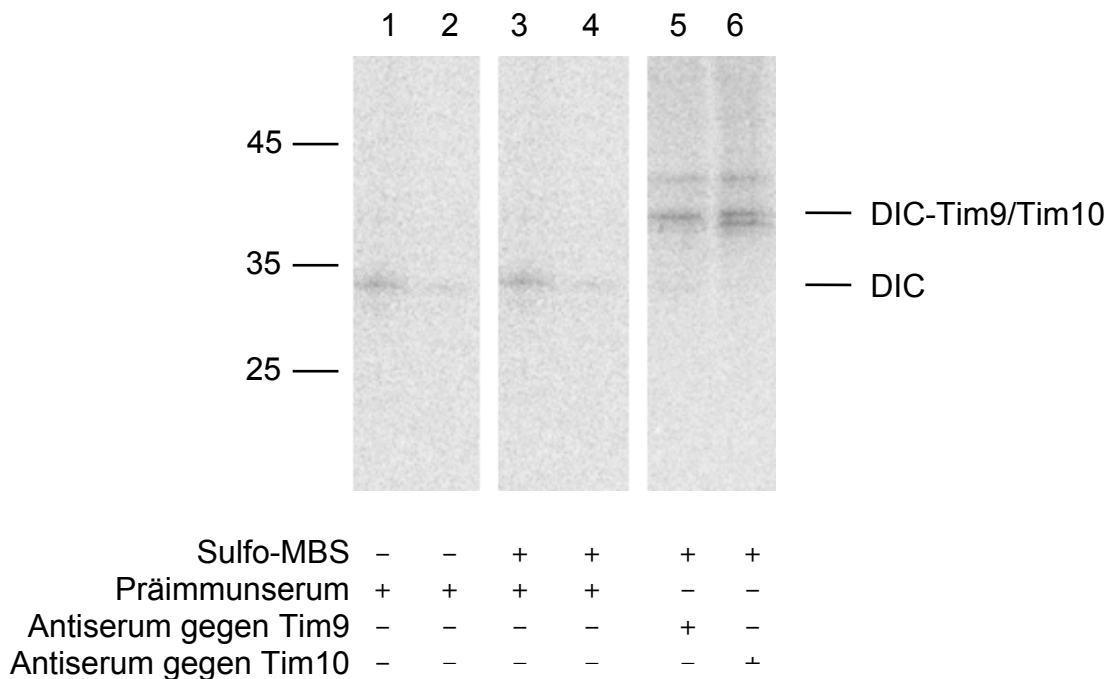


Abb. 20. Immunfällung im Anschluß an eine Quervernetzung des DIC mit Hilfe von Sulfo-MBS. Die Quervernetzung durch Sulfo-MBS wurde durchgeführt wie in dem Experiment von Abb. 3.1.16.

Die Experimente zeigen, dass zumindest ein erheblicher Anteil des DIC während der Translokation an die Tim9/Tim10-Komplexe des Intermembranraums bindet. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse früherer Studien (Brandner et al., 2005; Bauer et al., 2000) kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass der DIC der Hefe ähnlich den anderen mitochondrialen Metabolittranslokatoren unter Vermittlung der Tim9/Tim10-Komplexe in die Mitochondrien importiert wird. Es ist naheliegend zu vermuten, dass die *Carrier signature* bei

der Translokation über die Außenmembran von Bedeutung ist, weil sie an der Wechselwirkung des translozierenden DIC mit den Tim9/Tim10-Komplexen beteiligt ist.

3.4 Biogenese des Oxa1 Proteins

Oxa1 ist ähnlich dem DIC ein Protein, das über mehrere membranspannende α -Helices in die mitochondriale Innenmembran eingelagert ist. Oxa1 ist mit 5 Helices in der Innenmembran verankert, der DIC über 6 Helices. Trotz dieser strukturellen Ähnlichkeit scheinen beide Proteine ihre Ziellmembran auf unterschiedlichen Wegen zu erreichen: Während der DIC unter Vermittlung des TIM22-Komplexes direkt in die Innenmembran inseriert, gelangt das Protein Oxa1 durch den TIM23-Komplex in die Innenmembran (Neupert und Herrmann, 2007). Darüber hinaus lassen mehrere Beobachtungen vermuten, dass Oxa1 im Gegensatz zum DIC nicht vom Intermembranraum her in die Innenmembran inseriert, sondern dass es zunächst vollständig in die Matrix importiert wird (Herrmann et al., 1997). Anschließend wird es unter Beteiligung des bereits in der Innenmembran vorhandenen endogenen Oxa1 in die Innenmembran eingelagert, vermutlich von der Matrix-Seite aus (Neupert und Herrmann, 2007; Hell et al., 1998; Herrmann et al., 1997).

Oxa1 gehört zu den wenigen Komponenten der mitochondrialen Proteinimportmaschinerie, für die sich in Prokaryonten homologe Proteine nachweisen ließen. In *E. coli* wurde mit dem YidC ein Protein gefunden, das sowohl in seiner Struktur, als auch in seiner Funktion große Ähnlichkeiten zum Oxa1 aufweist (van der Laan et al., 2005; Kuhn et al., 2003; Samuelson et al., 2000). Allerdings kooperiert YidC in der Plasmamembran der Bakterien mit dem Komplex SecYEG, für den es in den mitochondrialen Membranen keine homologen Proteine gibt. YidC ist in der Lage, Substratproteine in der Membran unmittelbar vom Sec-Komplex aufzunehmen (Beck et al., 2001; Urbanus et al., 2001; Houben et al., 2000). Es stellt sich deshalb die Frage, ob das mitochondriale Oxa1 auf ähnliche Weise mit dem TIM23-Komplex kooperieren kann.

3.3.1 Membraninsertion der Helices 4 und 5 des Oxa1

Das Oxa1 der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* wird im Cytosol als Vorstufenprotein von 44,8 kDa (401 Aminosäuren) synthetisiert. Die N-terminalen 42 Aminosäuren des Oxa1 bilden eine positiv geladene abspaltbare Präsequenz (Herrmann et al., 1997). Während des Imports in die Mitochondrien gelangt die Präsequenz zunächst – unter Vermittlung des TIM23-Komplexes – in die Matrix (Frazier et al., 2003; Meyer et al., 1997; Herrmann et al., 1997).

Gelangt mit der Präsequenz das gesamte Oxa1 in die Matrix, oder bleibt ein C-terminaler Teil des Proteins mit dem TIM23-Komplex assoziiert?

Um diese Frage zu beantworten, wurde von Sebastian Reif gemeinsam mit Thomas Krimmer (Universität Freiburg) das Fusionsprotein SDO konstruiert, das aus fünf Einheiten besteht (Abb. 21):

- Die N-terminalen 66 Aminosäuren entsprechen der Präsequenz der Untereinheit 9 der ATP-Synthase von *Neurospora crassa* (Subunit 9, Su9).
- Es folgen vier Aminosäuren des reifen Teiles der Untereinheit 9.
- Zwei Aminosäuren (Gly-Ile) dienen als Verbindungsstück.
- Es folgt die vollständige Dihydrofolatreduktase (DHFR) der Maus.
- Der C-Terminus des Fusionsproteins wird von den C-terminalen Aminosäuren 263-402 des Oxa1 der Hefe gebildet.

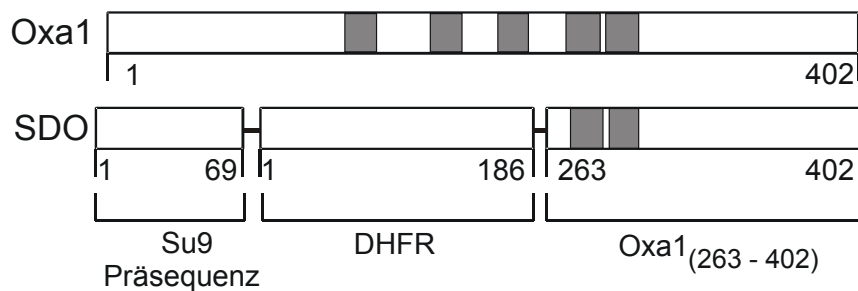


Abb. 21. Domänen des Fusionsproteins SDO (Subunit 9 – DHFR – Oxa1)

Die N-terminalen Su9-DHFR-Domänen sollten eine Translokation des SDO in die mitochondriale Matrix vermitteln. Die Frage war nun, ob der Su9-DHFR-Anteil des Fusionsproteins auch den Anteil des Oxa1 in die Matrix ziehen würde, oder ob dieser Anteil mit der Innenmembran assoziiert bleiben würde. Die Oxa1-Domäne des SDO enthält ein hydrophobes Segment von 34 Aminosäuren (Position 276-310), das nach Einlagerung in die Innenmembran vermutlich die Helices 4 und 5 bildet. Näherhin war somit zu klären, ob diese hydrophoben Segmente in die Matrix gezogen würden, oder ob sie unmittelbar in die Lipidphase der Innenmembran eingelagert werden würden.

Das Konstrukt wurde in Retikulozytenlysat als radioaktiv markiertes Vorstufenprotein synthetisiert, parallel zum authentischen Oxa1 (Abb. 22). Bei Inkubation mit isolierten Mitochondrien wurden beide Vorstufenproteine prozessiert (Abb. 22, Spuren 1 und 2). Die reifen Formen, mSDO und mOxa1, waren gegen von außen zugegebene Proteinase K

geschützt (Spur 2). Der Import ließ sich durch Zugabe von Valinomycin hemmen, die Translokation in die Mitochondrien war offenbar vom Membranpotential abhängig (Spuren 3 und 4):



Abb. 22: Import des Oxa1 und des Fusionsproteins SDO in Mitochondrien. Die Vorstufenproteine wurden in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin synthetisiert und für 10 Min. bei 25°C mit isolierten Hefe-Mitochondrien (Wildtyp YPH500) inkubiert. Die Proben der Spuren 3 und 4 enthielten Valinomycin (Val) zur Aufhebung des Membranpotentials. Die Mitochondrien der Proben 2 und 4 wurden anschließend mit 20 μg / ml Proteinase K (PK) inkubiert. Die Mitochondrien wurden durch Zentrifugation reisoliert und die importierten Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Zur Auswertung wurde ein Phosphorimager verwendet. p, Vorstufenprotein (*Precursor*); m, reifes Protein (*mature protein*).

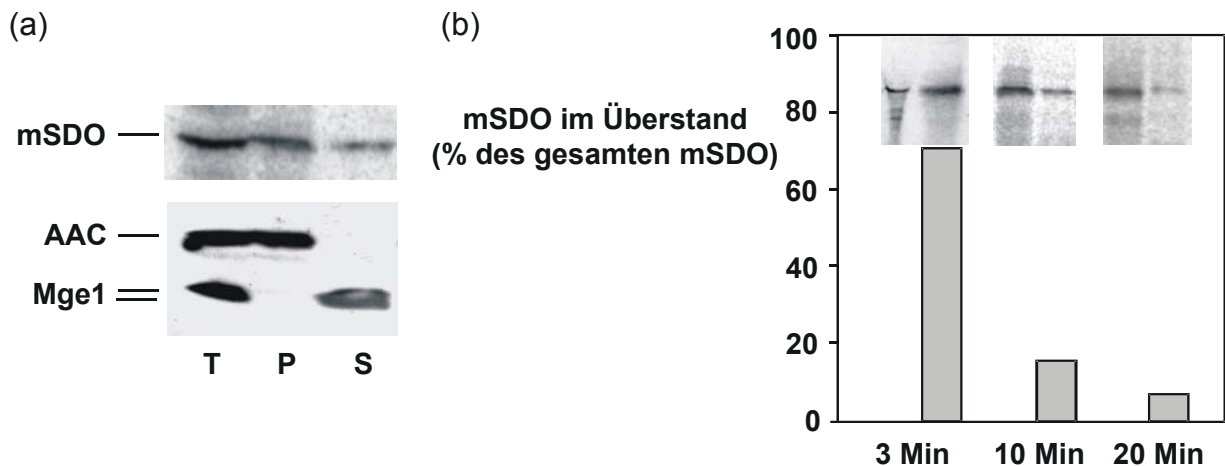


Abb. 23: Carbonatextraktion des SDO nach Import in isolierte Mitochondrien. (a). SDO wurde für 10 Min. in isolierte Hefe-Mitochondrien importiert. Die Mitochondrien wurden mit Proteinase K behandelt, reisoliert, und mit 100 mM Na_2CO_3 extrahiert. Im Anschluß an eine Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf Nitrozellulose übertragen. Die Verteilung der reifen Form des SDO (mSDO) wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers analysiert, die Proteine ADP/ATP Translokator (AAC) und das mitochondriale Homologe des bakteriellen GrpE (Mge1) wurden mit Hilfe spezifischer Antiseren markiert. T, Aliquot der gesamten Probe (*total*), P, Niederschlag (*Pellet*), S, Überstand (*Supernatant*). (b) Carbonatextraktion nach unterschiedlichen Importzeiten. Gezeigt ist die Verteilung des mSDO in Niederschlag und Überstand.

Durch Extraktion mit Carbonat bei pH 11,5 wurde geprüft, ob SDO nach Import in die Mitochondrien in löslicher Form vorlag, oder ob sich Hinweise auf eine Integration in die Innenmembran ergaben (Abb. 23a). Radioaktiv markiertes SDO wurde für 10 Min. bei 25°C in isolierte Mitochondrien importiert, die Mitochondrien wurden anschließend mit Proteinase K behandelt, reisoliert, und in gekühltem 0.1 M Na₂CO₃ (pH 11.5) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 45 Min. bei 0°C wurden die Membranen abzentrifugiert und die extrahierten Proteine durch Zugabe von Trichloressigsäure aus dem Überstand präzipitiert. Die Verteilung des SDO und verschiedener Markerproteine wurde mit Hilfe von SDS-PAGE und anschließender Übertragung der Proteine auf Nitrozellulose untersucht. Der ADP/ATP-Translokator (AAC) wurde ausschließlich in der Membranfraktion gefunden, das lösliche Protein Mge1 wurde ausschließlich im Überstand detektiert. Das prozessierte SDO (mSDO) war hingegen auf beide Fraktionen verteilt.

Die Carbonatextraktion wurde mehrfach wiederholt, wobei das SDO jeweils für unterschiedliche Zeiten importiert wurde (Abb. 23b). Im Anschluß an einen Import von 3 Min. wurde das SDO überwiegend in der löslichen Faktion gefunden. Innerhalb dieser Zeit befand sich das Protein offenbar noch in einer hydrophilen Umgebung und war noch nicht in die Innenmembran eingelagert worden. Wenn die Importreaktion auf mehr als 10 Minuten ausgedehnt wurde, zeigte sich das SDO hingegen zu mehr als 80% in der Membranfraktion.

Die Carbonatextraktionen lassen vermuten, dass das SDO-Protein nach dem Import in die Mitochondrien mehrere Minuten benötigt, um die Lipidphase der Innenmembran zu erreichen. Ähnliche Ergebnisse wurden früher bereits für das authentische Oxa1 veröffentlicht (Herrmann et al., 1997). Es läßt sich somit schließen, dass die hydrophoben Segmente im C-terminalen Teil des Oxa1 nicht in der Lage sind, eine schnelle Insertion in die Innenmembran zu vermitteln.

3.3.2 Assoziation des neu importierten Oxa1 mit Tim23

Die Carbonatextraktionen ließen allerdings die Frage offen, wo sich das SDO befindet, solange die Insertion in die Innenmembran noch nicht erfolgt ist. Das bereits prozessierte SDO kann nicht mehr im Intermembranraum sein, es könnte sich aber noch in der Pore des TIM23-Komplexes befinden, oder vorübergehend in der Matrix akkumulieren. Um diese Alternative klären zu können, wurde ein Assay etabliert, mit dessen Hilfe die Assoziation neu importierter Proteine mit dem TIM23-Komplex nachgewiesen werden konnte.

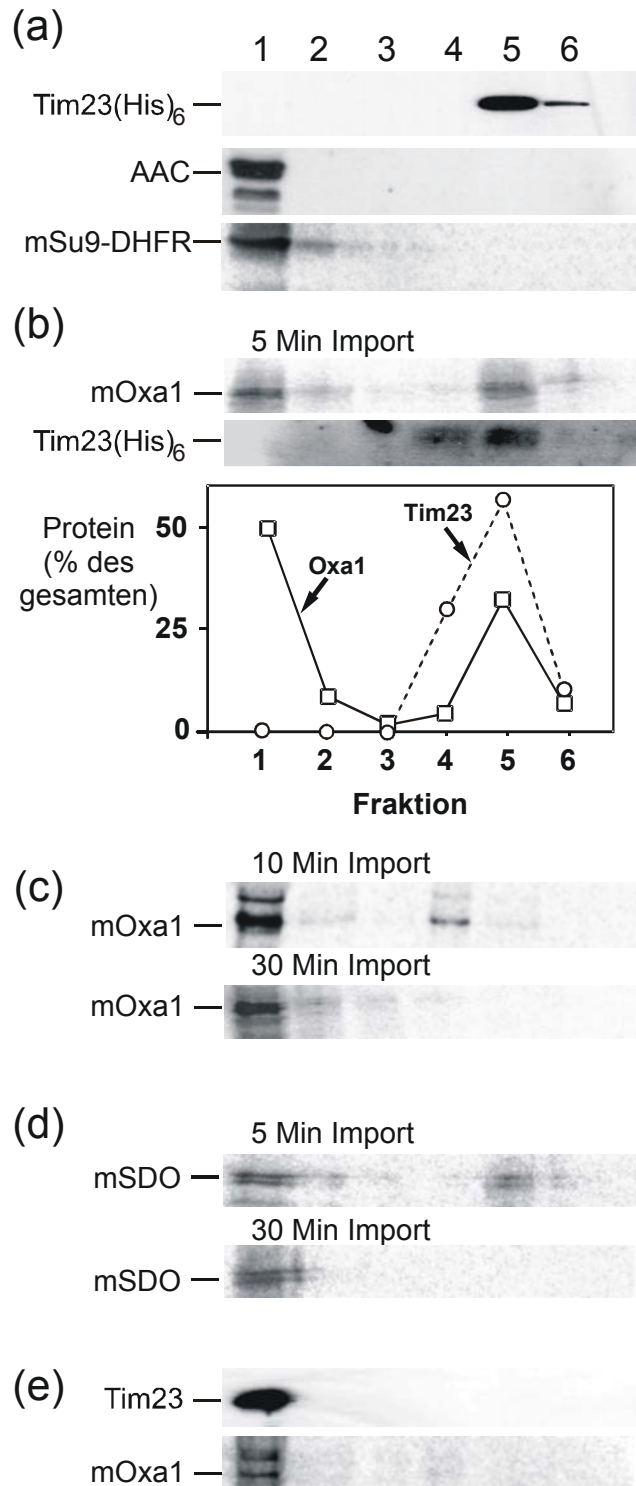


Abb. 24. Elution von Proteinen zusammen mit Tim23(His)₆. (a) Das ³⁵S-markierte Fusionsprotein Su9-DHFR wurde 10 Min. bei 25°C in isolierte Mitochondrien importiert, die Tim23(His)₆ enthielten. Die Mitochondrien wurden dann reisoliert und in Gegenwart von 1% (w/v) Digitonin lysiert. Das Lysat wurde für 60 Min. bei 8°C mit Ni-NTA gemischt. Die Ni-NTA-Matrix wurde in eine kleine Säule überführt und in mehreren Schritten mit Lysepuffer gespült. Die eluierten Proteine wurden durch Zugabe von Trichloressigsäure präzipitiert (Fraktionen 1-4). Zur Elution der Fraktionen 5 und 6 wurde mit Lysepuffer gespült, der zusätzlich 150 bzw. 300 mM

Imidazol enthielt. Die präzipitierten Proteine wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und schließlich auf Nitrozellulose übertragen. Tim23(His)₆ und der ADP/ATP-Translokator (AAC) wurden mit Hilfe spezifischer Antiseren nachgewiesen. Das radioaktiv markierte Su9-DHFR wurde mit Hilfe eines Phosphorimagers detektiert. (b) Das Experiment wurde durchgeführt wie in (a), wobei anstelle von Su9-DHFR ³⁵S-markiertes Oxa1 importiert wurde, die Importzeit betrug 5 Min. Die relativen Mengen des prozessierten Oxa1 (mOxa1) wurden mit Hilfe des Phosphorimagers bestimmt. Die Gesamtmenge an mOxa1 in allen eluierten Fraktionen zusammen wurde als 100% definiert. (c) Verteilung des mOxa1 nach Import für 10 bzw. 30 Min. (d) Verteilung des prozessierten SDO (mSDO) nach Import für 5 Min. bzw. 30 Min. (e) Verteilung des endogenen Tim23 und des radioaktiv markierten Oxa1 nach Import von ³⁵S-markiertem Oxa1 in Wildtyp-Mitochondrien.

Aus einem früheren Projekt war ein Hefe-Stamm verfügbar, in dem das endogene Tim23 mit einem Segment von 6 Histidinen verbunden ist (Bömer et al., 1997). Aus diesem Hefe-Stamm wurden nun Mitochondrien isoliert, die Mitochondrien wurden in Gegenwart von 1% Digitonin lysiert, das Tim23(His)₆ wurde an eine Ni-NTA-Matrix gebunden, und mit einer Lösung von 300 mM Imidazol eluiert (Abb. 24a, Fraktionen 5 und 6). Sofern zuvor die radioaktiv markierten Proteine AAC oder Su9-DHFR in die Mitochondrien importiert wurden, eluierten diese bereits in einer der ersten Fraktionen, eine Assoziation mit dem Tim23(His)₆ war also nicht gegeben, zumindest war weder der AAC noch das Su9-DHFR stabil an das Tim23(His)₆ gebunden.

In die gleichen Mitochondrien wurde dann radioaktiv markiertes Oxa1 importiert, die Importreaktion wurde nach 5 Min. abgebrochen, die Mitochondrien wurden mit Proteinase K behandelt, und es wurde durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie der Tim23(His)₆-Komplex isoliert. Unter diesen Bedingungen eluierte zusammen mit dem Tim23(His)₆-Komplex auch erheblicher Teil des reifen Oxa1 (ca. 40%, vergl. Abb. 24b).

Das Experiment wurde wiederholt und das Oxa1 dabei entweder für 10 Min. oder für 30 Min. importiert (Abb. 24c). Nach einem Import von 10 Minuten eluierte bereits nur noch ca. 20% des reifen Oxa1 mit dem Tim23(His)₆, nach einer Importzeit von 30 Min. wurde keine Assoziation des Oxa1 mit dem Tim23(His)₆ mehr festgestellt. Es kann daraus geschlossen werden, dass das prozessierte Oxa1 unter diesen Bedingungen hinreichend Zeit hatte, den Tim23(His)₆-Komplex zu verlassen. Die Experimente bestätigen den Eindruck, dass in der Biogenese des Oxa1 mehrere Minuten benötigt werden, um den Importkanal zu verlassen und in die Lipidphase der Innenmembran zu inserieren.

Interessanterweise blieb auch das Fusionsprotein SDO mehrere Minuten lang mit dem Tim23(His)₆ verbunden (Abb. 24d). Diese Beobachtung ist insofern bemerkenswert, als der N-terminale Teil des Proteins, das Su9-DHFR, unter den gleichen Bedingungen keinerlei

Assoziation mit dem Tim23(His)₆ gezeigt hatte (vergl. Abb. 24a). Offenbar hält die Oxa1-Domäne das Fusionsprotein in der Importpore zurück, und es ist naheliegend, für diesen Effekt das hydrophobe Segment (276-310) verantwortlich zu machen, das sich in diesem Teil des Oxa1 befindet.

Die Spezifität des Assays wurde durch Kontrollexperimente bestätigt, in denen die Tim23(His)₆-Mitochondrien durch Mitochondrien des entsprechenden Wildtyp-Stammes ersetzt wurden. Dabei wurde weder für das endogene Tim23, noch für neu importiertes radioaktiv markiertes Oxa1 eine Affinität für die Ni-NTA-Matrix gefunden (Abb. 24d).

3.3.3 Komplexbildung des nativen Oxa1 in der Innenmembran

Bildet das Oxa1 in der mitochondrialen Innenmembran der Hefe stabile Komplexe? Ist es womöglich mit dem TIM23-Komplex assoziiert? Da im Labor kein Antiserum gegen Oxa1 zur Verfügung stand, wurde mit Hilfe von Frau Elke Dian ein Hefe-Stamm isoliert, in dem das Oxa1 an seinem C-Terminus mit einer Sequenz verbunden ist, gegen die ein Antiserum kommerziell erhältlich ist. Verwendet wurde ein sogen. HA-tag. Dabei handelt es sich um ein Segment aus einem viralen Hämagglutinin. Das Konstrukt wurde in dem Tim23(His)₆-Stamm zur Expression gebracht. Es wurden dann Mitochondrien isoliert und in Gegenwart von 1% Digitonin lysiert. Nach Auftrennung der Proteine durch BN-PAGE wurde mit einem Antiserum gegen den HA-tag lediglich ein einziger Komplex nachgewiesen (Abb. 25):

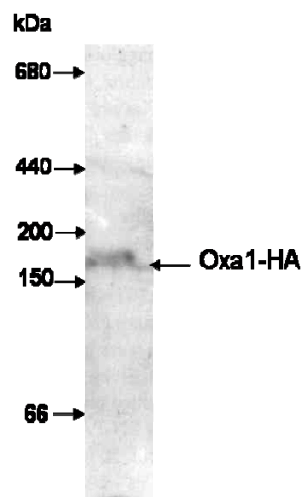


Abb. 25: Nachweis eines Oxa1-Komplexes durch BN-PAGE. Oxa1, das an seinem C-Terminus einen HA-tag trägt, wurde in einem Hefe-Stamm exprimiert, Mitochondrien wurden isoliert, und in Gegenwart von 1 % (w/v) lysiert. Aggregate wurden 20 Min. bei 16.000 g abzentrifugiert, und die Proteine des Überstandes wurden durch BN-PAGE aufgetrennt (4%-16% Gradienten-Gel). Die Proteine wurden anschließend auf eine PVDF-Membran übertragen. Oxa1-HA wurde mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen, der gegen das HA-Peptid gerichtet war.

Die molekulare Masse des Komplexes betrug ca. 160 kDa. In einem weiteren Experiment wurden die Proteine nicht nur durch BN-PAGE, sondern durch kombinierte BN-PAGE/SDS-PAGE in zwei Dimensionen aufgetrennt. Das Oxa1-HA, das im Polyacrylamidgel der zweiten Dimension nachweisbar war, bestätigte die Bildung eines Komplexes von ca. 160 kDa (Abb. 26a). Der Komplex war weder mit dem endogenen TOM-Komplex verbunden (nachgewiesen mit Hilfe eines Antiserums gegen Tom40), noch mit dem TIM23-Komplex (nachgewiesen mit Hilfe eines Antiserums gegen Tim23):

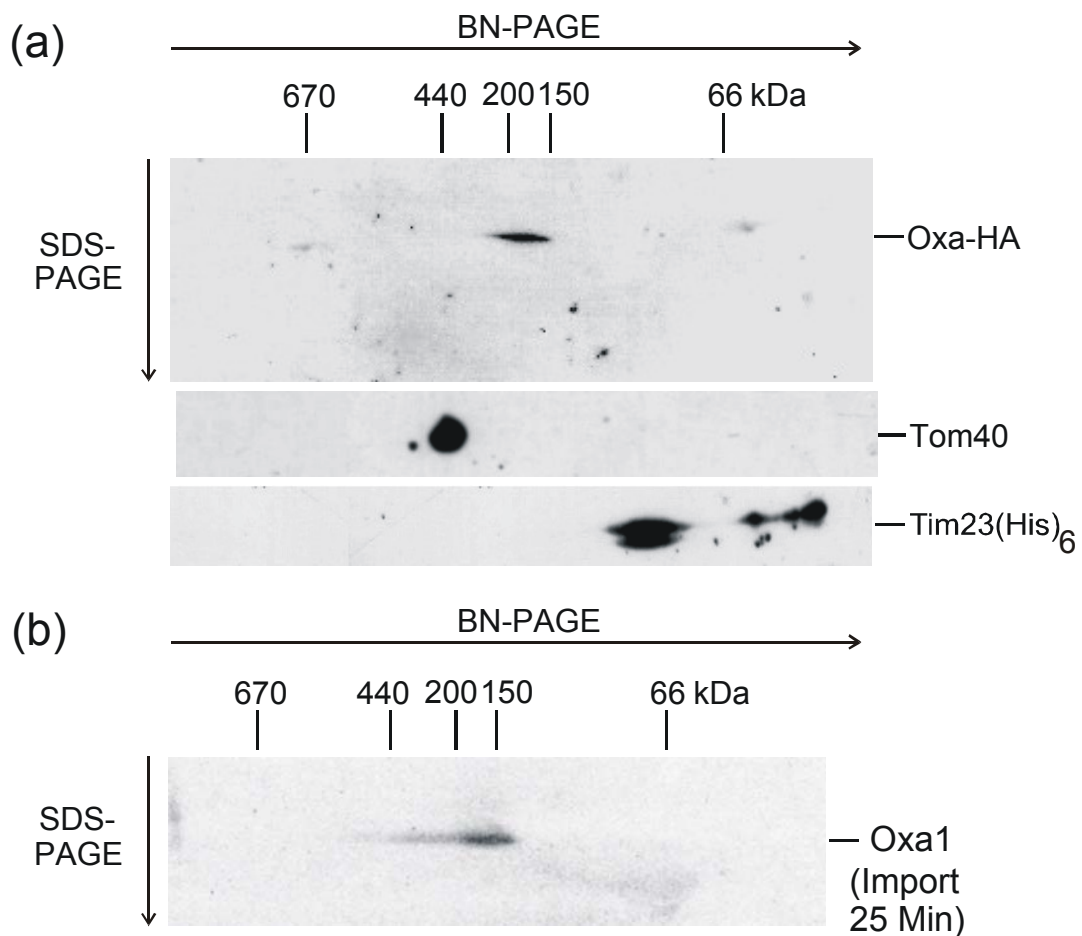


Abb. 26. Charakterisierung der Komplexbildung des Oxa1 durch BN-PAGE/SDS-PAGE. (a) Expression von Oxa1-HA *in vivo*. Oxa1, das C-terminal einen HA-tag enthält, wurde in einem Hefe-Stamm zur Expression gebracht. Es wurden dann Mitochondrien isoliert und diese in Gegenwart von Digitonin lysiert. Die Proteine wurden durch BN-PAGE aufgetrennt (1. Dimension). Eine Spur des Gels wurde ausgeschnitten und die enthaltenen Proteine wurden in einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (2. Dimension). Die Proteine wurden dann auf Nitrozellulose übertragen. Mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden dann das Oxa1 (Antikörper gegen den HA-tag), Tom40, sowie Tim23 markiert. (b) Import von Oxa1 *in vitro*. ³⁵S-markiertes Oxa1 (ohne HA-tag) wurde in Retikulozytenlysat synthetisiert und 25 Min. bei 25°C in isolierte Mitochondrien importiert. Die Proteine der Mitochondrien wurden anschließend durch BN-PAGE/SDS-PAGE in zwei Dimensionen aufgetrennt wie im Experiment der Teilabbildung (a). Zum Nachweis des radioaktiv markierten Oxa1 wurde ein Phosphorimager verwendet.

In unabhängigen Experimenten wurde radioaktiv markiertes Oxa1 für 25 Min. in Wildtyp-Mitochondrien importiert, und unter Verwendung des gleichen Protokolls wurde durch BN-PAGE/SDS-PAGE geprüft, welche Komplexe das radioaktiv markierte Oxa1 bildete. Tatsächlich ließ sich auch für das Oxa1 ohne den HA-tag die Bildung eines 160 kDa-Komplexes nachweisen (Abb. 26b). In einer früheren Studie war für das Oxa1 des Roten Brotschimmels *Neurospora crassa* ein homo-tetramerer Komplex des Oxa1 beschrieben worden (Nargang et al., 2002). Die Daten zum Oxa1 der Hefe lassen darauf schließen, dass auch das Oxa1 der Hefe derartige homo-tetramere Komplexe bildet. Bemerkenswert ist zudem, dass sich in allen diesen Experimenten keinerlei Assoziation des endogenen (reifen und vollständig assemblierten) Oxa1 mit dem TIM23-Komplex nachweisen ließ. Während das bakterielle YidC mit der Sec-Translokase einen stabilen Komplex bildet, scheint das Oxa1 einen von den Translokasen der mitochondrialen Innenmembran unabhängigen Komplex zu bilden.

3.3.4 Funktion des mtHsp70 in der Biogenese des Oxa1

Generell werden Proteine in einem ersten Schritt vom mitochondrialen Membranpotential in die Matrix gezogen. Entscheidend sind dabei die positiven Ladungen der Präsequenzen. Die weiteren Schritte der Translokation sind grundsätzlich vom Membranpotential unabhängig. Die Energiequelle der Translokation ist dann das ATP, das in der Matrix vom mitochondrialen Hsp70, mtHsp70, hydrolysiert wird. Sofern das mtHsp70 defekt ist, können zwar noch die Präsequenzen der Vorstufenproteine importiert werden, eine vollständige Translokation in die Matrix ist hingegen nicht möglich (Bolender et al., 2008; Neupert und Herrmann, 2007). Entsprechend sollte die Translokation der Oxa1-Präsequenz in die Matrix von mtHsp70 unabhängig sein. Ein vollständiger Transport in die Matrix sollte hingegen durch Defekte im mtHsp70 beeinträchtigt oder verhindert werden. Mit der temperatursensitiven Mutante *ssc1-2* stand im Labor ein Hefe-Stamm zur Verfügung, der für Untersuchungen zur Rolle des mtHsp70 in der Biogenese mitochondrialer Protein gut geeignet ist (Voisine et al., 1999; Gambill et al., 1993; Voos et al., 1993).

Das mtHsp70, das vom *ssc1-2* Allel kodiert wird, erlaubt nach Inkubation bei nicht-permissiver Temperatur zwar noch eine Bindung an Vorstufenproteine, zeigt dann aber eine verzögerte Freisetzung. Die neu importierten Proteine bleiben dann länger am mtHsp70 hängen, wodurch ihre Faltung behindert wird (Gambill et al., 1993; Voos et al., 1993). Die aus diesem Stamm isolierten Mitochondrien wurden für 10 Min. bei 37°C inkubiert um den

Phänotyp zu induzieren. Zunächst wurde dann überprüft, ob die beschriebenen Eigenschaften des Phänotyps auch tatsächlich gegeben waren. Zu diesem Zweck wurde das Modellprotein Su9-DHFR importiert, die Mitochondrien wurden durch Zugabe von Triton X-100 vollständig lysiert, und es Proteinase K wurde zugegeben um die Faltung der DHFR-Domäne des Su9-DHFR zu bestimmen (Abb. 27):

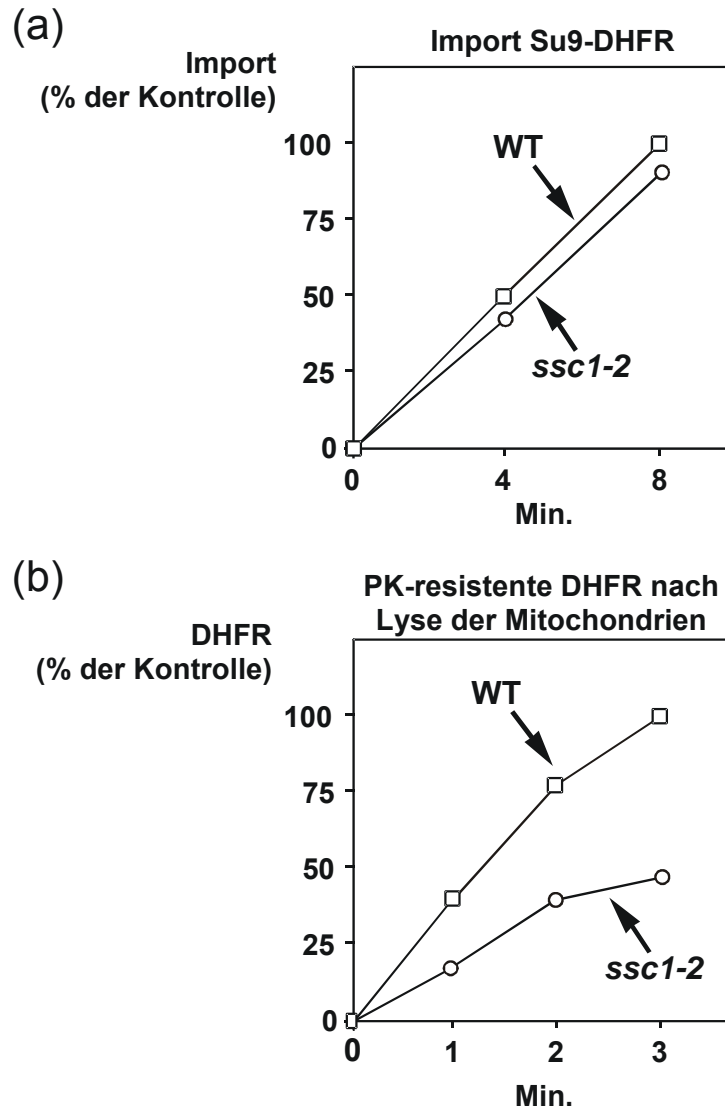


Abb. 27. Import von Su9-DHFR in Mitochondrien der mtHsp70-Mutante *ssc1-2*. (a) Das Fusionsprotein Su9-DHFR wurde in Retikulozytenlysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin synthetisiert und bei 25°C mit isolierten Hefe-Mitochondrien inkubiert. Nach 4 bzw. 8 Min. wurde die Inkubation beendet und die Mitochondrien wurden mit Proteinase K behandelt. Die Mitochondrien wurden reisoliert und die Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die relativen Mengen an importiertem Su9-DHFR wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers bestimmt, der höchste Wert wurde als 100% definiert (Kontrolle). (b) Su9-DHFR wurde importiert wie in (a). Die reisolierten Mitochondrien wurden dann in Gegenwart von 1% (v/v) Triton X-100 lysiert und bei 0°C mit $80\ \mu\text{g/ml}$ Proteinase K inkubiert. Die Protease-resistente DHFR wurde dann mit Trichloressigsäure präzipitiert und durch DSD-PAGE aufgetrennt. Die relativen Mengen an DHFR wurden wiederum mit Hilfe des Phosphorimagers bestimmt, der höchste Wert wurde als 100% definiert (Kontrolle).

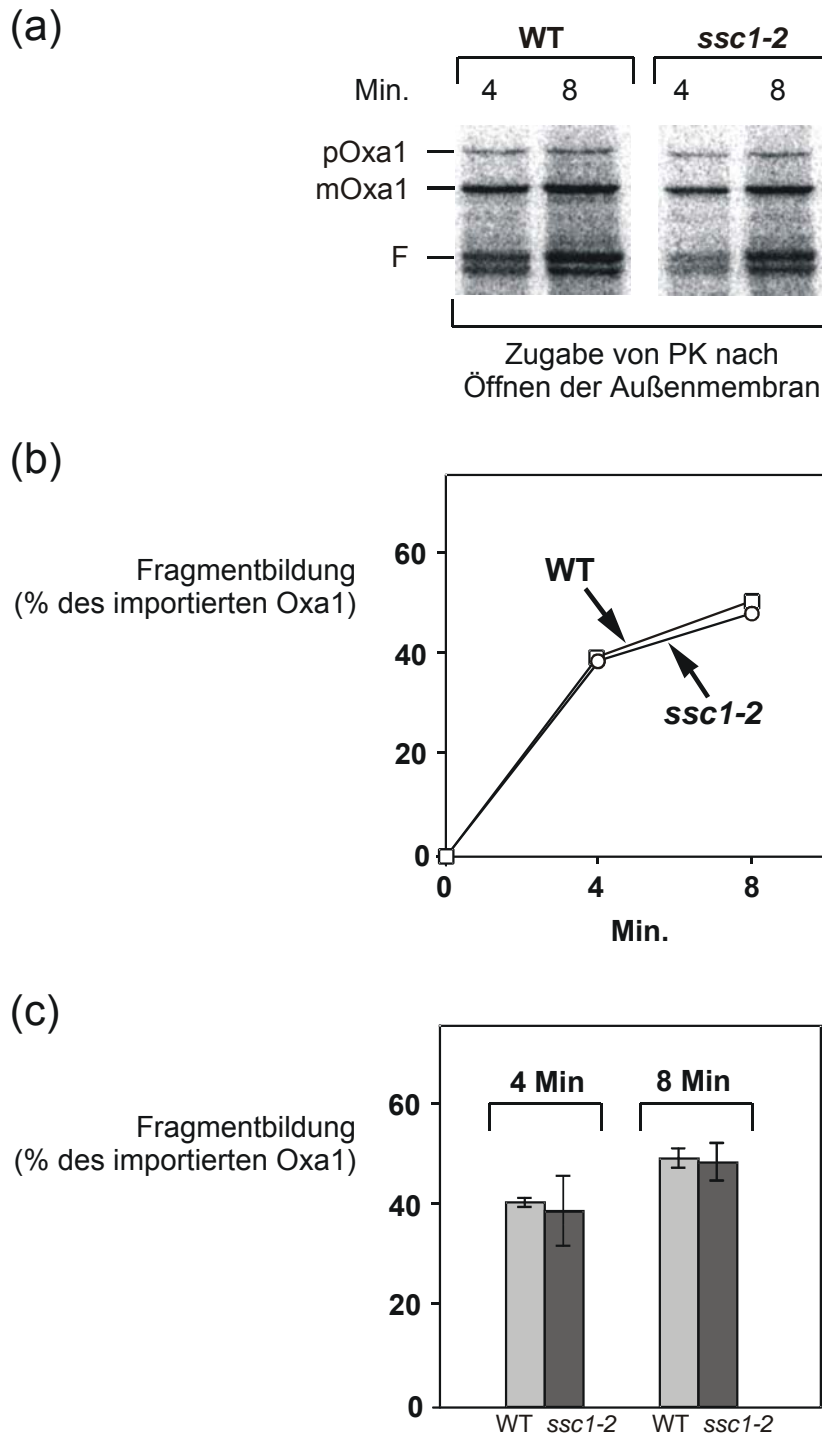


Abb. 28. Zugänglichkeit des Oxa1-N-terminus nach Öffnen der Außenmembran. (a) Radioaktiv markiertes Oxa1 wurde in Retikulozytenlysat synthetisiert und 4 bzw. 8 Min. bei 25°C mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Die Mitochondrien wurden anschließend reisoliert und in 10 mM MOPS, pH 7.2 resuspendiert um die mitochondriale Außenmembran zu öffnen. Um die Zugänglichkeit des N-Terminus des importierten Oxa1 zu testen, wurden die Ansätze mit 40 µg/ml Proteinase K inkubiert. Die entstandenen Mitoplasten wurden abzentrifugiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt. Die relativen Mengen der radioaktiv markierten Polypeptide wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers bestimmt. pOxa1, Vorstufe des Oxa1 (*precursor*); mOxa1, prozessiertes Oxa1 (*mature Oxa1*); F, 30 kDa-Fragment des Oxa1, das bei Abspaltung des N-Terminus erhalten

wird. (b) Quantifizierung der relativen Mengen der ^{35}S -markierten Polypeptide des in (a) gezeigten Experiments. Berechnet wurde die Menge des Fragmentes F in Prozent der gesamten Menge an Protease-geschütztem Oxa1 (pOxa1 + mOxa1 + F). (c) Das in (a) gezeigte Experiment wurde mehrfach wiederholt um Mittelwerte und die jeweiligen Standardabweichungen bestimmen zu können ($n = 3$).

Die DHFR ist ein Enzym, das in entfaltetem Zustand gegenüber Proteasen sehr empfindlich ist, im nativ gefalteten Zustand hingegen resistent (Voos et al., 1993). Die Tests zeigten, dass Su9-DHFR in Wildtyp- und in *ssc1-2* Mitochondrien mit gleicher Geschwindigkeit importiert wurde (Abb. 27a), die Faltung der DHFR-Domäne war hingegen in den *ssc1-2* Mitochondrien deutlich verlangsamt (Abb. 27b).

Die isolierten Mitochondrien hatten somit die erwarteten Eigenschaften. In die Mitochondrien dieser Präparation wurde dann radioaktiv markiertes Oxa1 importiert (Abb. 28a). Oxa1, das korrekt in die Innenmembran eingelagert ist, exponiert im Intermembranraum eine N-terminale Domäne von ca. 90 Aminosäuren. Diese Domäne ist für Proteasen zugänglich, sobald die Außenmembran geöffnet wird. Dabei bleibt vom Oxa1 ein charakteristisches Fragment von ca. 30 kDa übrig (Herrmann et al., 1997; Reif, 2005). Diesem Prinzip folgend wurde nun untersucht, mit welcher Geschwindigkeit sich dieses Fragment nachweisen läßt, nachdem Oxa1 parallel in Mitochondrien des *ssc1-2* Stammes bzw. des entsprechenden Wildtyp-Stammes wurde.

In allen diesen Experimenten zeigte sich, dass die Bildung des 30 kDa-Fragments in den Mitochondrien beider Stämme stets mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgte (Abb. 28b). Nach einem Import von 4 Min. wurde das radioaktiv markierte Oxa1 in den Mitochondrien beider Stämme bei Zugabe von Proteinase K zu etwa 40% zum 30 kDa-Fragment abgebaut. Es wurde dabei die Doppelbande beobachtet, die bereits in früheren Studien beschrieben worden war (Herrmann et al., 1997; Reif, 2005). Der Anteil des Oxa1, der von der Proteinase K zu diesem Fragment abgebaut wurde, nahm mit längeren Importzeiten zu, dabei waren zwischen den *ssc1-2*-Mitochondrien und den Wildtyp-Mitochondrien aber weiterhin keine signifikanten Unterschiede nachweisbar (Abb. 28c).

Diese Befunde lassen darauf schließen, dass das mtHsp70 zumindest an den geschwindigkeitsbestimmenden Schritten der Biogenese des Oxa1 nicht beteiligt ist. Ein Import des vollständigen Oxa1 in die mitochondriale Matrix erscheint damit unwahrscheinlich.

4. Diskussion

In der vorliegenden Studie wurde untersucht, wie drei unterschiedliche Polypeptide in Mitochondrien importiert und assembliert werden. Allen drei Polypeptiden ist gemeinsam, dass sie ihre Funktion letztlich in Proteinkomplexen der mitochondrialen Innenmembran ausüben. Die Untersuchungen galten der γ -Untereinheit der ATP-Synthase ($F_1\gamma$), dem Dicarboxylatranslokator (DIC), und dem Protein Oxa1.

4.1 Assemblierung der mitochondrialen ATP-Synthase

Zunächst wurde die Biogenese der mitochondrialen ATP-Synthase untersucht. Dabei erwies sich die Methode der Blauen Nativgelelektrophorese (BN-PAGE) als sehr hilfreich (Schägger und von Jagow, 1991). So war es möglich, einzelne Untereinheiten der ATP-Synthase in Retikulozytenlysat zu synthetisieren, dabei radioaktiv zu markieren, die Untereinheiten dann in isolierte Mitochondrien zu importieren, und ihren Einbau in die ATP-Synthase durch BN-PAGE zu verfolgen. Die Untersuchungen konzentrierten sich schließlich auf die γ -Untereinheit.

Die γ -Untereinheit ist von den Bakterien bis zum Menschen hoch konserviert. Von den 25 C-terminalen Aminosäuren der γ -Untereinheit der Hefe sind 15 Aminosäuren identisch in der Untereinheit der Rinder erhalten (Paul et al., 1994). Es wäre deshalb zu vermuten, dass bereits geringfügige Veränderungen in der Struktur der Untereinheit einem Verlust ihrer Funktion zur Folge haben sollten. Tatsächlich wurde in verschiedenen Studien zur γ -Untereinheit von Prokaryonten und Chloroplasten gefunden, dass sowohl am N- wie am C-Terminus des Proteins erhebliche Segmente deletiert werden können, ohne die Funktion nachhaltig zu beeinträchtigen (Iwamoto et al., 1990; Sokolov et al., 1999; Hossain et al., 2006). Es ist somit unklar, warum die Struktur der γ -Untereinheit dennoch derart hoch konserviert ist.

In den Experimenten der vorliegenden Studie wurde nun untersucht, in wiefern sich Deletionen an den Enden der γ -Untereinheit auf den Import und auf die Assemblierung in den Mitochondrien auswirken. Es zeigte sich dabei, dass Deletionen von bis zu 30 Aminosäuren zu keiner Verzögerung im Import führten.

Sofern die Assemblierung der γ -Untereinheit in früheren Studien bereits untersucht worden war, hatte sich eine bedeutende Rolle der N- und C-Termini der Untereinheit nicht nachweisen lassen (Sokolov et al., 1999; Ni et al., 2005; Hossain et al., 2006). Für die γ -Untereinheit der Hefe ergaben sich nun die folgenden Ergebnisse: Ein Verlust von 9

Aminosäuren am N-Terminus oder 10 Aminosäuren am C-Terminus reduzierte den Anteil der Untereinheit, der innerhalb von 10 Min. bei 25°C in die Mitochondrien importiert und in den Mitochondrien assembliert wurde, etwa um die Hälfte. Deletionen von mehr als 9 N-terminalen oder mehr als 20 C-terminalen Aminosäuren reduzierten den Anteil der assemblierten Untereinheit um mehr als 90%. Zumindest in der Hefe ist ein intakter N- und C-Terminus der γ -Untereinheit offenbar erforderlich, um eine effiziente Assemblierung zu ermöglichen.

Ältere Daten zur ATP-Synthase von *E. coli* haben gezeigt, dass eine Deletion der 10 C-terminalen Aminosäuren der γ -Untereinheit eine erhebliche Verlangsamung des Wachstums zur Folge hat. Auf Succinat als C-Quelle, also unter Bedingungen, unter denen die Zellen auf die Funktion der ATP-Synthase angewiesen sind (da sie ATP nicht durch Gärung gewinnen können), war die Zelldichte im Vergleich zum Wildtyp um 80% erniedrigt (Iwamoto et al., 1990). Für die ATP-Synthase dieser Zellen wurde in der gleichen Studie eine Reduktion der Enzymaktivität um 86% gefunden. Es war deshalb naheliegend, das reduzierte Wachstum der Zellen unmittelbar auf die reduzierte ATP-Synthase zurück zu führen. Entsprechend war nun aber auch für die Hefe zu erwarten, dass eine Reduktion der Assemblierung der ATP-Synthase um 50% oder 90% mit einem reduzierten Wachstum um 50% oder 90% korrelieren sollte.

Um Daten zur Relevanz der γ -Untereinheit *in vivo* für die Hefe zu erhalten, wurden in der Arbeitsgruppe Hefe-Stämme isoliert und charakterisiert, die eine γ -Untereinheit mit definierten Verkürzungen enthielten (Elke Dian, Panagiotis Papatheodorou und Kerstin Emmrich). Die Mutanten wurden auf Medien getestet, die Glycerin als C-Quelle enthielten, so dass die Stämme auf die Aktivität der mitochondrialen ATP-Synthase angewiesen waren. Überraschend zeigte sich in diesen Tests, dass keiner der Stämme auf Glycerin wachsen konnte. Selbst diejenigen Stämme, in denen nur wenige Aminosäuren der γ -Untereinheit fehlten, zeigten keinerlei Wachstum.

Die endständigen Aminosäuren der γ -Untereinheit sind für die Aktivität der ATP-Synthase verzichtbar (Hossain et al., 2006; Ni et al., 2005; Sokolov et al., 1999), und geringfügige Deletionen an den Enden der Untereinheit haben in der Hefe nur eine Reduktion der Assemblierung um ca. 50% zur Folge. Gleichwohl können die entsprechenden Stämme nicht wachsen. Wie ist dieser Widerspruch erklärbar? In früheren Untersuchungen wurde bereits gefunden, dass Hefe-Stämme, denen die γ -Untereinheit gänzlich fehlt, auf allen Medien extrem langsam wachsen (Smith und Thorsness, 2005; Mueller, 2000). Eigentlich wäre zu erwarten, dass zumindest auf Medien, die eine ATP-Synthase durch Gärung erlauben, eine

gutes Wachstum auch ohne eine intakte γ -Untereinheit möglich sein sollte. Die unerwartet drastischen Konsequenzen eines Verlustes der γ -Untereinheit, auf Glycerin wie auf Glucose, werden über sekundäre Effekte erklärt („*a secondary negative phenotype*“, Mueller, 2000). Wenn die γ -Untereinheit fehlt, scheint der F_0 -Teil der ATP-Synthase intakt zu bleiben und einen Fluß von Protonen zu ermöglichen, der nicht mehr an eine ATP-Synthase gekoppelt ist. Die Mitochondrien sind unter diesen Bedingungen, unabhängig von den jeweiligen Nährmedien, ständig entkoppelt, was für die Zellen lethal ist (Lai-Zhang et al., 1999; Mueller, 2000). Hefezellen können dann nur überleben, wenn sie größere Teile ihrer mitochondrialen DNA eliminieren. Die mitochondriale DNA kodiert in der Hefe drei der Untereinheiten des F_0 -Teiles. Wenn diese Untereinheiten nicht mehr synthetisiert werden, verliert die Zelle damit auch die F_0 -Teile, die für den Verlust des mitochondrialen Membranpotentials verantwortlich waren (Mueller, 2000). Offenbar sind entkoppelnde F_0 -Teile auch die Ursache dafür, dass Hefe-Stämme nicht wachsen können, die eine verkürzte γ -Untereinheit enthalten. Wie in der vorliegenden Studie gezeigt wurde, assemblieren die verkürzten Untereinheiten nur teilweise. Dadurch kommt es in den Zellen vermutlich zu einer Bildung unvollständig assemblierter F_0 -Teile, die zu einer Entkopplung der Mitochondrien führen. Die vollständig assemblierten ATP-Synthasen, die in diesen Stämmen ebenfalls vorkommen, können die Konsequenzen der Entkopplung nicht kompensieren.

Überraschend wurde gefunden, dass die Stämme, die eine verkürzte γ -Untereinheit enthalten, auf Glucose durchaus wachsen können (Kerstin Emmrich, Panagiotis Papatheodorou). Vermutlich wird in Gegenwart von Glucose ein Faktor induziert, der die F_0 -Teile, und also auch den unkontrollierten Protonenfluß blockiert, dazu aber zumindest Teile der γ -Untereinheit benötigt, bei gänzlichem Fehlen der γ -Untereinheit also nicht aktiv ist. Als Glucose-abhängiger Inhibitor der ATP-Synthase ist das IF1-Peptid bekannt (Mueller, 2000).

Ausgangspunkt des Teilprojektes zur Assemblierung der mitochondrialen ATP-Synthase war die paradoxe Situation, dass die N- und C-Termini der γ -Untereinheit für die Aktivität der ATP-Synthase nicht essentiell, gleichwohl aber in der Evolution hoch konserviert sind. Als Ergebnis der Experimente hat sich heraus gestellt, dass zumindest in der Hefe die N- und C-Termini der Untereinheit für die Assemblierung der ATP-Synthase von Bedeutung sind. Vermutlich sind die Enden der Untereinheit auch in anderen Organismen für die Assemblierung von größerer Bedeutung. Bislang wurde dieser Aspekt der Assemblierung allerdings noch nicht systematisch untersucht. Insbesondere fehlte eine Methode, die es

erlaubt, auch geringfügige Assemblierungsdefekte nachzuweisen und quantitativ abzuschätzen. Als derartige Methode hat sich in der vorliegenden Arbeit die Technik der Blauen Nativgelelektrophorese bewährt.

4.2 Biogenese des Dicarboxylattranslokators

Im Gegensatz zur mitochondrialen ATP-Synthase sind zu den mitochondrialen Metabolit-Translokatoren keine prokaryontischen Homologe bekannt. Vermutlich ist diese Proteinfamilie erst im Kontext der Evolution der eukaryontischen Zellen entstanden. Mitochondriale Proteine wie etwa die γ -Untereinheit, die sich aus prokaryontischen Vorläufern entwickelt haben, zeigen oft eine ausgeprägte Sequenzähnlichkeit, die zwischen den verwandten Proteinen nachweisbar ist. Im typischen Fall haben die mitochondrialen Proteine im Zuge der Evolution eine N-terminale Präsequenz erworben, durch die sie sich von den prokaryontischen Homologen unterscheiden (Neupert, 1997; Hartl und Neupert, 1990). Die Präsequenz dient den weitaus meisten neu synthetisierten mitochondrialen Vorstufenproteinen als entscheidendes Zielerkennungssignal. Eigenartigerweise fehlen derartige Präsequenzen den mitochondrialen Metabolittranslokatoren. Die alternativen Zielerkennungssignale, die es den Metabolittranslokatoren dennoch erlauben, vom Cytosol in die mitochondriale Innenmembran zu gelangen, sind bis heute nicht befriedigend geklärt worden. U.a. wurde vermutet, dass die sogen. *Carrier signature*, das hoch konservierte Sequenzmotiv P x (D/E) x x (K/R), in der Zielfindung der Metabolittranslokatoren eine entscheidende Rolle spielen könnte. Insbesondere sollte es während der Translokation über die mitochondriale Außenmembran an der Bindung an die Komplexe der kleinen Tim-Proteine Tim9 und Tim10 im Intermembranraum beteiligt sein (Bauer et al., 2000; Sirrenberg et al., 1998). Dieser Hypothese wurde im Rahmen der vorliegenden Studie nachgegangen.

Als Modellprotein wurde der Dicarboxylattranslokator (*Dicarboxylate carrier*, DIC) der Hefe gewählt. Es wurden mehrere Derivate des Proteins synthetisiert, in denen die Aminosäuren der *Carrier signature* gegen Alanine ausgetauscht waren. (Die dafür benötigten Plasmide wurden in der Arbeitsgruppe von Herrn Panagiotis Papatheodorou zur Verfügung gestellt.) Charakterisiert wurden Derivate des DIC, denen die *Carrier signature* der N-terminalen bzw. der C-terminalen Domäne fehlte (Δ CS1 und Δ CS2), sowie ein Derivat, dem die *Carrier signature* in beiden Domänen fehlte (Δ CS1/2). Die Derivate wurden parallel zum Wildtyp-Protein in isolierte Mitochondrien importiert, und es wurde die Geschwindigkeit bestimmt, mit der die verschiedenen Derivate über die mitochondriale Außenmembran transportiert

wurden. Es zeigte sich, dass der Verlust einer *Carrier signature* bereits zu einem deutlichen Abfall der Importgeschwindigkeit führte, die geringste Importgeschwindigkeit zeigte das Δ CS1/2-Konstrukt. Innerhalb von 5 Minuten wurde von diesem Protein nur etwa $\frac{1}{4}$ so viel importiert wie vom Wildtyp-DIC.

Durch chemische Quervernetzung mit Hilfe von Sulfo-MBS und anschließende Immunfällung mit spezifischen Antisera wurde dann bestätigt, dass der DIC während des Importes in die Mitochondrien an die Proteine Tim9 und Tim10 bindet. Für beide Proteine ist aus anderen Daten bekannt, dass sie im Intermembranraum an translozierende Polypeptide binden und diese über die Außenmembran in den Intermembranraum ziehen (Neupert und Herrmann, 2007; Pfanner und Geissler, 2001). Es konnte damit erstmals experimentell bestätigt werden, dass die *Carrier signature* bei der Translokation eines Proteins über die mitochondriale Außenmembran eine wichtige Rolle spielt. Die Hypothese von Sirrenberg et al. (1998) war somit für den DIC bestätigt worden.

Inzwischen wurde das Projekt in der Arbeitsgruppe fortgeführt, und es wurde die Relevanz der *Carrier signature* auch für den Import des ADP/ATP-Translokators (*ADP/ATP carrier*, AAC; *Adenosine nucleotide translocator*, ANT) untersucht. Dabei wurde überraschend gefunden, dass ein Derivat des AAC ohne die *Carrier signature*-Motive mit der gleichen Geschwindigkeit importiert wurde wie der Wildtyp-AAC (Marina Alber und Panagiotis Papatheodorou, unveröffentlichte Daten). Die Beobachtungen aus den Importexperimenten zum DIC können somit nicht uneingeschränkt verallgemeinert werden. Vielmehr ist davon auszugehen, dass die *Carrier signature* offenbar nur für den Import bestimmter Metabolit-translokatoren von Bedeutung ist.

Inzwischen zeichnet sich ab, dass die *Carrier signature* der Metabolittranslokatoren für die Transportfunktion in der Innenmembran essentiell ist. Sowohl der DIC als auch der AAC können den Transport ihrer Substrate nicht mehr vermitteln, sobald ihnen eines ihrer *Carrier signature*-Motive fehlt (Vincenzo Zara, Alessandra Ferramosca, und Loredana Capobianco, Universität Lecce, Italien). Der Verlust einer der geladenen Aminosäurereste der *Carrier signature* hatte für diese Proteine nach Rekonstitution in Membranvesikeln einen nahezu vollständigen Verlust ihrer Transportfunktion zur Folge. Der Austausch des Prolins in einem *Carrier signature*-Motiv reduzierte die Transportaktivität um etwa die Hälfte.

Entscheidend für den Import neu synthetisierter Metabolittranslokatoren sind vermutlich hydrophobe Wechselwirkungen der sechs hydrophoben Segmente der Metabolit-translokatoren mit hydrophoben Bindestellen der Proteine Tim9 und Tim10 (Curran et al., 2002). Im Fall des DIC wird die Wechselwirkung mit Tim9 und Tim10 durch eine intakte

Carrier signature offenbar erleichtert, aber die neueren Daten zum AAC lassen vermuten, dass die *Carrier signature* in der Biogenese des DIC lediglich von akzessorischer Bedeutung ist. Die treibende Kraft ergibt sich vermutlich auch bei der Translokation des DIC in erster Linie aus den Wechselwirkungen der sechs hydrophoben Segmente des Proteins.

4.3 Biogenese und Funktion des Oxa1

Da Oxa1 unmittelbar an seiner eigenen Biogenese beteiligt ist (Hell et al., 1998), lassen sich aus Beobachtungen zur Biogenese des Oxa1 auch Schlüsse auf die Funktion des reifen Proteins ziehen. Aus den Daten der vorliegenden Studie hat sich für die Topogenese des Oxa1 das folgende Schema ergeben: (1) Nach Import des neusynthetisierten Oxa1 akkumuliert dieses zunächst im TIM23-Komplex. Dieser Schritt ist abhängig vom mitochondrialen Membranpotential. (2) Es wird dann die Präsequenz abgespalten, das reife Oxa1 verlässt langsam den TIM23-Komplex und lagert sich in die Lipid-Phase der Innenmembran ein. (3) Hier bildet Oxa1 schließlich einen homo-tetrameren Komplex von ca. 160 kDa.

Die Daten zum Import in die Mitochondrien des *ssc1-2*-Stammes haben gezeigt, dass die Einlagerung des Oxa1 in die Lipid-Phase der Innenmembran von Wechselwirkungen des translozierenden Oxa1 mit dem mtHsp70 (kodiert von dem Gen *SSC1*) der Matrix unabhängig ist. Oxa1 ist ein Protein, das letztlich mit fünf membranspannenden Segmenten in der Innenmembran verankert ist. Generell aggregieren derart hydrophobe Membranproteine sehr leicht, so dass ein vollständiger Import des gesamten Oxa1 in die Matrix vermutlich nur unter Beteiligung mehrerer mtHsp70-Moleküle erfolgen könnte. In den Mitochondrien der *ssc1-2*-Mutante ist eine effiziente Anbindung von mtHsp70 an neu importierte Proteine zwar möglich, eine anschließende Freisetzung ist hingegen verlangsamt. Dieses wurde im Rahmen der vorliegenden Studie durch Experimente bestätigt, in denen eine Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) in die mitochondriale Matrix importiert wurde. Der Import des Enzyms erfolgte sehr schnell, die anschließende Faltung war aber erheblich verzögert. Da die Membraninsertion des Oxa1 in Mitochondrien der gleichen Präparation nicht beeinträchtigt war, ist es unwahrscheinlich, dass Oxa1 vor seiner Einlagerung in die Innenmembran in größerem Umfang an mtHsp70 gebunden ist. Entsprechend ist es auch unwahrscheinlich, dass Oxa1 vor der Membraninsertion vollständig in der Matrix lokalisiert ist.

Das Schema, das sich damit für die Topogenese des Oxa1 in den Mitochondrien ergeben hat, zeigt wesentliche Übereinstimmungen mit dem Schema der Biogenese des YidC, des Homologen des Oxa1 in den Bakterien. Während Oxa1 zunächst in den TIM23-Komplex

insetiert, akkumuliert YidC zunächst im SecYEG-Translocon (Koch et al., 2002; Urbanus et al., 2002; Beck et al., 2001). YidC verlässt den SecYEG-Komplex dann seitlich und insetiert in der Lipid-Phase der Membran, indem die einzelnen hydrophoben α -Helices des YidC nacheinander den SecYEG-Komplex verlassen und vom assoziierten (bereits in der Membran vorhandenen) YidC in die Lipid-Phase eingelagert werden (Houben et al., 2002; 2004; Beck et al., 2001; Urbanus et al., 2001; van der Laan et al., 2001; Scotti et al., 2000).

Analog wird das neu synthetisierte Oxa1 zunächst im TIM23-Komplex akkumulieren und dann – vermittelt vom endogenen Oxa1 - seitlich in die Lipid-Phase der Innenmembran gelangen. Wesentliche Prinzipien der Topogenese beider Proteine wären damit in der Evolution erhalten geblieben. Es wäre lediglich das SecYEG-Translocon durch den TIM23-Komplex ersetzt worden. Obwohl die 160 kDa-Komplexe des Oxa1 nicht fest mit den TIM23-Komplexen verbunden sind, scheint Oxa1 in ähnlicher Weise mit dem TIM23-Komplex zu kooperieren wie das bakterielle YidC mit dem SecYEG-Translocon.

Interessanterweise werden dem YidC zwei Funktionen zugeschrieben: (a) Zum einen soll es in der beschriebenen Weise direkt mit dem SecYEG-Komplex kooperieren, zum anderen, (b), soll es aber auch unabhängig vom SecYEG-Komplex, als eigenständige Einheit agieren können (Serek et al., 2004). Vermutlich gilt dieses analog auch für das mitochondriale Oxa1. Zum einen kann es offenbar Substratproteine unmittelbar vom TIM23-Komplex übernehmen, zum anderen ist es aber auch in der Lage, gänzlich unabhängig vom TIM23-Komplex zu arbeiten, etwa bei der Insertion mitochondrial kodierter Membranproteine (Szyrach et al., 2003; Jia et al., 2003).

Indem Oxa1 in den TIM23-Komplex insetiert, gelangt in einem ersten Schritt der N-Terminus des Oxa1 in die Matrix. Es gehört offenbar zu den Aufgaben des endogen in der Membran vorhandenen Oxa1, diesen N-Terminus aufzunehmen und durch die Innenmembran hindurch in den Intermembranraum zu verlagern (Rojo et al., 1999; Hell et al., 1998). In diesem Schritt wird also ein Substrat aus der wässrigen Phase der Matrix aufgenommen und über die Membran transloziert, mechanistisch vermutlich gänzlich unabhängig vom TIM23-Komplex. Die Experimente der vorliegenden Arbeit haben aber auch gezeigt, dass die C-terminale Domäne (mitsamt der hydrophoben Helices 4 und 5) des neu importierten Oxa1 unabhängig vom Oxa1-N-Terminus in die Innenmembran gelangen können. Wechselwirkungen mit dem mtHsp70 der Matrix scheinen dabei nicht beteiligt zu sein. Es ist deshalb wahrscheinlich, dass die C-terminale Domäne des Oxa1 nach Verlassen des TIM-Komplexes unmittelbar vom endogenen Oxa1 aufgenommen und in die Innenmembran eingelagert wird, analog zur YidC-vermittelten Insertion Membran-spannender Helices in die Plasmamembran der Bakterien.

4.4 Proteintransport in Mitochondrien und in Bakterien

Die ausgeprägten Ähnlichkeiten, die zwischen den Aminosäuresequenzen mitochondrialer und bakterieller Proteine bestehen, lassen sich durch geeignete Computerprogramme mühelos identifizieren und auch quantifizieren. Wesentlich aufwendiger ist es, die molekularen Mechanismen zu vergleichen, die in der Biogenese und in der Funktion der Proteine eine Rolle spielen. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen zu den drei Modellproteinen $F_1\gamma$, DIC und Oxa1 weisen darauf hin, dass wesentliche Prinzipien der Biogenese und der Funktion in ähnlichem Umfang konserviert sind wie die Primärstrukturen. Diese Beobachtung ist um so erstaunlicher, als sich die Wege der Mitochondrien und der Bakterien bereits vor etwa 2 Milliarden Jahren getrennt haben (Schmidt und Unsicker, 2003). Daten zur Funktion der γ -Untereinheit der ATP-Synthase in *E. coli* hatten ergeben, dass weder der N-, noch der C-Terminus der Untereinheit für die Assemblierung in der ATP-Synthase essentiell sind. Die hier vorgelegten Daten zum homologen Enzymkomplex in Mitochondrien zeigen hingegen, dass die Enden der γ -Untereinheit bei der Einlagerung in die ATP-Synthase durchaus von erheblicher Bedeutung sind. Die Ähnlichkeit der ATP-Synthasen von Bakterien und Mitochondrien scheint damit zunächst in Frage gestellt. Tatsächlich wurde die Rolle der N- und C-Termini in der Assemblierung der γ -Untereinheit in den älteren Studien mit sehr groben Verfahren untersucht. Die vielen Ähnlichkeiten zwischen den ATP-Synthasen von Bakterien und Mitochondrien lassen vermuten, dass sich durch detailliertere Untersuchungen auch für die ATP-Synthasen der Bakterien eine Funktion der N- und C-Termini in der Assemblierung der γ -Untereinheit zeigen lassen würde. Allein über die Funktion bei der Energieübertragung läßt sich die hohe Konservierung der Struktur der γ -Untereinheit in der ATP-Synthase nicht befriedigend erklären. Als Element in der Assemblierung hat sich diese Struktur hingegen in den hier vorgelegten Untersuchungen als essentiell erwiesen.

Der DIC wurde hier als Beispiel für ein Protein einbezogen, für das bakterielle Homologe nicht bekannt sind. Auch die *Carrier signature*, P x (D/E) x x (K/R), deren Funktion hier untersucht wurde, scheint in prokaryontischen Proteinen funktionell nicht von Bedeutung zu sein. Wahrscheinlich ist dieses einer der Gründe, warum die Funktion der *Carrier signature* bislang ungeklärt geblieben ist. Während alle Studien zur ATP-Synthase davon profitieren können, dass es vielfältige Vergleichsmöglichkeiten zwischen den homologen Enzymen in Bakterien, Mitochondrien und Chloroplasten gibt, fehlt den Untersuchungen zu den mitochondrialen Metabolitranslokatoren ein prokaryontisches Modellsystem. Es ist zudem

auffällig, dass die mitochondrialen Metabolitranslokatoren einen in vieler Hinsicht anderen Importweg nehmen als die Proteine, die aus prokaryontischen Vorläufern hervor gegangen sind. Insbesondere ist es auffällig, dass der Mitgliedern der Familie der Metabolitranslokatoren eine Präsequenz fehlt. Die hier vorgelegten Ergebnisse haben für den DIC gezeigt, dass die *Carrier signature* die fehlende Präsequenz teilweise in der Funktion ersetzen kann, denn die Importgeschwindigkeit des DIC wird durch die *Carrier signature* wesentlich erhöht. Es zeichnet sich aber ab, dass die *Carrier signature* primär nicht für die Biogenese der Metabolitranslokatoren essentiell ist, sondern für deren Funktion als reife Proteine in der Innenmembran. Die Spezifität der Zielerkennung wird in der Biogenese der Metabolitranslokatoren offenbar von anderen Sequenzmotiven kodiert.

Die Untersuchungen zur Funktion des Oxa1 wurden wiederum dadurch erleichtert, dass homologe Proteine sowohl in Bakterien als auch in Chloroplasten nachgewiesen wurden. Umfangreiche Studien zur Funktion des bakteriellen Homologen, YidC, haben gezeigt, dass es Substratproteine sowohl aus der wässrigen Phase, als auch vom Sec-Translocon aufnehmen kann. Die Ergebnisse der hier vorgelegten Untersuchungen weisen darauf hin, dass diese Möglichkeiten analog auch für das mitochondriale Oxa1 gegeben sind. Ähnlich wie YidC mit dem Sec-Translocon, kann Oxa1 offenbar mit dem TIM23-Komplex kooperieren, wenn auch ein gemeinsamer stabiler Komplex nicht nachweisbar ist.

Die Endosymbiontenhypothese der Evolution der Mitochondrien und Chloroplasten wurde schon frühzeitig für Untersuchungen zur Biogenese der Proteine der Zellorganelle zugrunde gelegt (Neupert und Hartl, 1990). Die hier zusammen gestellten Ergebnisse zeigen, dass dieses Konzept weiterhin außerordentlich anregend ist, indem es sowohl interessante Fragen aufwirft, als auch in der Erforschung der molekularen Prozesse hilfreiche Leitlinien zur Verfügung stellt.

5. Zusammenfassung

Mitochondrien und Prokaryonten weisen vielerlei Ähnlichkeiten auf, vermutlich sind sie in der Evolution aus gemeinsamen Vorläufern hervor gegangen. So ist zu erwarten, dass sich ausgeprägte Ähnlichkeiten auch in der Biogenese ihrer Proteine nachweisen lassen. In der vorliegenden Studie wurde dieser Vermutung in Untersuchungen zur Biogenese bestimmter Proteinkomplexe der mitochondrialen Innenmembran nachgegangen. Als Modellorganismus diente dabei die Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae*.

(1) Die γ -Untereinheit der ATP-Synthasen ist in Mitochondrien und Prokaryonten hoch konserviert. Aus älteren Untersuchungen ist bekannt, dass Deletionen am N- oder C-Terminus der γ -Untereinheit nur eine überraschend geringe Reduktion der enzymatischen Aktivität zur Folge haben. In der Experimenten der vorliegenden Studie wurde nun gefunden, dass N- und C-Terminus der γ -Untereinheit für eine effiziente Assemblierung in der ATP-Synthase in den Mitochondrien der Hefe essentiell sind. Bei einer Deletion von 9 Aminosäuren am N-Terminus oder 10 Aminosäuren am C-Terminus wurde die γ -Untereinheit effizient in die Mitochondrien importiert. Der Anteil der Untereinheit, der dann innerhalb von 10 Min. bei 25°C assembliert wurde, reduzierte sich aber um etwa die Hälfte. Deletionen von mehr als 9 N-terminalen oder mehr als 20 C-terminalen Aminosäuren reduzierten den Anteil der assemblierten Untereinheit um mehr als 90%. Hefe-Stämme, die eine verkürzte γ -Untereinheit synthetisierten, waren auf Glycerin als Kohlenstoffquelle nicht lebensfähig. Vermutlich sind N- und C-Terminus der Untereinheit in den ATP-Synthasen sowohl der Mitochondrien, als auch in der Prokaryonten für die Assemblierung von größerer Bedeutung als für die Energieübertragung.

(2) Die Metabolitranslokatoren der mitochondrialen Innenmembran sind vermutlich erst im Kontext der Evolution der eukaryontischen Zellen entstanden. Gemeinsam ist den Metabolitranslokatoren das Sequenzmotiv P x (D/E) x x (K/R), das als *Carrier signature* bezeichnet wird. Für ein Mitglied der Proteinfamilie, den Dicarboxylattranslokator, wurde nun gefunden, dass die *Carrier signature* die Biogenese des Proteins wesentlich erleichtert. Insbesondere wird der Transport des neu synthetisierten Proteins vom Cytosol in den Intermembranraum wesentlich beschleunigt.

(3) Das Protein Oxa1 gehört zu einer Proteinfamilie, zu der auch das Protein YidC der Prokaryonten zählt. Sowohl Oxa1, als auch YidC sind Mediatoren der Proteininsertion in ihren jeweiligen Membranen, und in dieser Funktion u.a. an ihrer eigenen Biogenese beteiligt. Eine Reihe verschiedener Experimente zur Biogenese des mitochondrialen Oxa1 hat nun ergeben, dass neu synthetisiertes Oxa1 nach Import in die Mitochondrien wahrscheinlich nicht vollständig in die mitochondriale Matrix transportiert wird. Vielmehr scheint es im TIM23-Komplex, der Proteintranslokase der Innenmembran, zu akkumulieren und dann unmittelbar in die Lipidphase der Membran zu inserieren. Damit zeigt das Oxa1 eine ähnliche Biogenese wie das bakterielle YidC, das zunächst von der SecYEG-Translokase aufgenommen und dann unmittelbar in die Plasmamembran eingelagert wird. Oxa1 und YidC scheinen somit nicht nur in ihrer Struktur, sondern auch in ihrer Biogenese und in ihrer Funktion signifikante Ähnlichkeiten zu haben.

Insgesamt zeigte sich in den Experimenten der vorliegenden Studie, dass sich mitochondriale und prokaryontische Proteine auch nach mehr als zwei Milliarden Jahren getrennter Evolution selbst in molekularen Details ihrer Funktion noch sehr ähnlich geblieben sind.

Summary

Mitochondria and prokaryotes show many similarities and it is a well established notion that they have common ancestors. It is therefore reasonable to expect significant similarities also in the biogenesis of their proteins. This study followed this idea in investigations on the biogenesis of protein complexes in the mitochondrial inner membrane. The yeast *Saccharomyces cerevisiae* served as a model organism.

(1) The γ -subunit of ATP synthases is highly conserved both in mitochondria and in prokaryotes. Previous studies demonstrated that deletions at the N- or C-terminus of the subunit entail only mild reductions in the enzymatic activity, and the reason of the conserved structure was enigmatic. The experiments of this study show that N- and C-terminus of the γ -subunit are essential for an efficient assembly in the ATP synthase. A deletion of 9 residues at the N-terminus or 10 residues at the C-terminus reduced the ratio of the subunit that assembled within 10 min. at 25°C by about 50%. Deletions of more than 9 N- or more than 20 C-terminal residues reduced the share of the assembled subunit by more than 90%. Yeast strains that synthesized a shortened γ -subunit did not grow on glycerole. N- and C-terminus are probably more relevant for assembly of the ATP synthase than for the transmission of energy. It is proposed that this is the case both for mitochondria and for prokaryotes.

(2) The metabolite carrier proteins of the mitochondrial inner membrane were probably newly developed during the evolution of the eukaryotic cells. A common sequence motif of all carrier proteins is the carrier signature, P x (D/E) x x (K/R). The data of this study show that the carrier signature substantially facilitates the biogenesis of the dicarboxylate carrier (DIC). In particular, the translocation of this protein across the mitochondrial outer membrane is significantly accelerated.

(3) The mitochondrial inner membrane protein Oxa1 is a member of a protein family that includes the bacterial protein YidC. Both Oxa1 and YidC act as mediators of protein insertion in their membranes, and both proteins participate in their own biogenesis. In this study, a series of experiments indicates that newly synthesized Oxa1 is not imported into the mitochondrial matrix, but accumulates in the inner membrane TIM23 translocase, for direct integration into the lipid bilayer. Oxa1 thereby shows a similar principle of membrane insertion as prokaryotic YidC. This was previously shown to first accumulate in the SecYEG

translocase and then to directly integrate into the bacterial plasmamembrane. Oxa1 and YidC thus seem to resemble each other both in their structure and in their biogenesis.

In summary, the experiments show that mitochondrial and prokaryotic proteins, after two billion years of separate evolution, have retained surprising similarities, even in molecular details of their function.

6. Literatur

Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., und Endo T. (2000) Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100, 551-560.

Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Luther, R., und Walker J.E. (1994) Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 594-595.

Ackerman, S.H., Martin, J., und Tzagoloff, A. (1990) *ATP10*, a yeast nuclear gene required for the assembly of the mitochondrial F₁-F₀ complex. *J. Biol. Chem.* 265, 9952-9959.

Ackermann, S.H. und Tzagoloff, A. (2005) Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 80, 95-133.

Ackerman, S.H., Domenico, L.G., Gellefors, P., Douglas, M.G., und Tzagoloff, A. (1991) *ATP13*, a nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase. *FEBS Lett.* 278, 234-238.

Ackerman, S.H., Martin, J., und Tzagoloff, A. (1992) Characterization of *ATP11* and deletion of the encoded protein in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 267, 7386-7394.

Adam, A., Endres, M., Sirrenberg, C., Lottspeicht, F., Neupert, W., und Brunner M. (1999) Tim9, a new component of the tim 22;54 translocase in mitochondria. *EMBO J.* 18, 313-319.

Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., und Nussberger, S. (2001) Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.*, 153, 1151-1160.

Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W., und Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.*, 147, 959-968.

- Altamura, N., Capitanio, N., Bonnefoy, N., Papa, S., und Dujardin, G. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* *OXA1* gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase. FEBS Lett. 382, 111-115.
- Attardi, G. und Schatz, G. (1988) Biogenesis of mitochondria. Annu. Rev. Cell Biol. 4, 289-333.
- Arlt, H., Tauer, R., Feldmann, H., Neupert, W., und Langer, T. (1996) The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria. Cell 85; 875-885.
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., und Schägger, H. (1998) Yeast mitochondrial F₁F₀-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer specific subunits. EMBO J. 17, 7170-7178.
- Baker, K.P., Schaniel, A., Vestweber, D. und Schatz, G. (1990). A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. Nature 348, 605-609.
- Bauer, M., Behrens, M., Esser K., Michaelis, G., und Pratje, E. (1994) PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast. Mol. Gen. Genet. 245, 272-278.
- Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W., und Brunner, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. Cell 87, 33-41.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W., und Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. Trends Cell Biol. 10, 25-31.
- Bauer, M.F. und Neupert, W. (2001) Import of proteins into mitochondria: a novel pathomechanism for progressive neurodegeneration. J. Inherit. Metab. Dis. 24, 166-180.
- Beck, K., Eisner, G., Trescher, D., Dalbey, R.E., Brunner, J., Müller, M. (2001) YidC, an assembly site for polytopic *Escherichia coli* membrane proteins located in immediate proximity to the SecYE translocon and lipids. EMBO Rep. 2, 709-714.

- Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. und Brunner, M. (1995) The Tim complex mediates preprotein translokation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell* 81, 1085-1093.
- Bisaccia, F., Indiveri, C., und Palmieri, F. (1988) Purification and reconstitution of two anion carriers from rat liver mitochondria: the dicarboxylate and the 2-oxoglutarate carrier. *Biochim. Biophys. Acta.* 2, 229-240.
- Blobel, G. (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 77, 1496-1500.
- Blom, J., Kübrich, M., Rassow, J., Voos W., Dekker, P.J., Maarse, A.C., Meijer, M., und Pfanner, N. (1993) The essential yeast protein MIM44 (encoded by MPI1) is involved in an early step of preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.*, 13, 7364-7371.
- Blom, J., Dekker, P.J., und Meijer, M. (1995) Functional and physical interactions of components of the yeast mitochondrial inner-membrane import machinery (MIM). *Eur. J. Biochem.* 232, 309-314.
- Bolender, N., Sickmann, A., Wagner, R., Meisinger, C., und Pfanner, N. (2008) Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep.* 9, 42-49.
- Bömer, U., Meijer, M., Maarse, A.C., Hönlinger, A., Dekker, P.J.T., Pfanner, N., und Rassow J. (1997) Multiple interactions of components mediating preprotein translocation across the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 16, 2205-2216.
- Bonnefoy, N., Chalvet, F., Hamel, P., Slonimski, P.P., und Dujardin, G. (1994a) *OXA1*, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis. *J. Mol. Biol.* 239, 201-212.
- Bonnefoy, N., Kermorgant, M., Groudinsky, O., Minet, M., Slonimski, P.P., und Dujardin, G. (1994b) Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional

complementation of an *oxa1*-mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 11978-11982.

Bonnefoy, N., Kergamont, M., Groudinsky, O., und Dujardin, G. (2000) The respiratory gene *OXA1* has two fission yeast orthologues which together encode a function essential for cell viability. Mol. Microbiol. 35, 1135-1145.

Borst, P. und Grivell, L.A. (1978) The mitochondrial genome of yeast. Cell 15, 705-723.

Boyer, P.D. (1997) The ATP synthase – a splendid molecular machine. Annu. Rev. Biochem. 66, 717-749.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analyt. Biochem. 72, 248-254.

Brandner, K, Rehling, P, und Truscott, K.N. (2005) The carboxyl-terminal third of the dicarboxylate carrier is crucial for productive association with the inner membrane twin-pore translocase. J. Biol. Chem. 7, 6215-6221.

Brix, J., Dietmeier, K., und Pfanner, N. (1997) Differential recognition of preproteins by the purified cytosolic domains of the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70. J. Biol. Chem. 272, 20730-20735.

Brix, J., Rüdiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., und Pfanner, N. (1999) Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein. J. Biol. Chem. 274, 16522-16530.

Chacinska, A., Rehling, P., Guiard, B., Frazier, A.E., Schulze-Specking, A., Pfanner, N., Voos, W., und Meisinger, C. (2003) Mitochondrial translocation contact sites: separation of dynamic and stabilizing elements in formation of a TOM-TIM-preprotein supercomplex. EMBO J. 22, 5370-5381.

- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W., und Koehler, C.M. (2002) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* 21, 942-953.
- Dalbey, R.E., und Kuhn, A. (2000) Evolutionarily related insertion pathways of bacterial, mitochondrial, and thylakoid membrane proteins. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 16, 51-87.
- Daum, G., Gasser, S.M., und Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b_2 by isolated yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 257, 13075-13080.
- de Gier J.W. und Luirink J. (2001) Biogenesis of inner membrane proteins in *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* 40, 314-322.
- Dekker, P.J., Keil, P., Rassow, J., Maarse, A.C., Pfanner, N., und Meijer, M. (1993) Identification of MIM23, a putative component of the protein import machinery of the mitochondrial inner membrane. *FEBS Lett.*, 330, 66-70.
- Devenish, R.J., Prescott, M., Roucou, X., und Nagley, P. (2000) Insights into the ATP synthase assembly and function through the molecular genetic manipulation of subunits of the yeast mitochondrial enzyme complex. *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 428-442.
- Dietmeier, K., Honlinger, A., Bomer, U., Dekker, P. J., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Kubrich, M., und Pfanner, N. (1997) Tom5 functionally links mitochondrial preprotein receptors to the general import pore. *Nature* 388, 195-200.
- D'Silva, P.R., Schilke, B., Walter, W., und Craig, E.A. (2005) Role of Pam16's degenerate J domain in protein import across the mitochondrial inner membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 12419-12424.
- Economou, A. (1999) Following the leader: bacterial protein export through the Sec pathway. *Trends Microbiol.* 7, 315-320.

Endres, M., Neupert, W., und Brunner, M. (1999) Transport of the ADP/ATP carrier of mitochondria from the TOM complex to the TIM22.54 complex. *EMBO J.* 18, 3214-3221.

Emelyanov, V.V. (2001) Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Biosci. Rep.* 21, 1-17.

Emtage, J.L. und Jensen, R.E. (1993) MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J. Cell. Biol.* 122, 1003-1012.

Fiermonte, G., Dolce, V., Arrigoni, R., Runswick, M.J., Walker, J.E., und Palmieri, F. (1999) Organization and sequence of the gene for the human mitochondrial dicarboxylate carrier: evolution of the carrier family. *Biochem. J.* 344, 953-960.

Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N. und Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 440, 325-331.

Frazier, A. E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H. E., Bilanchone, V., Cumsky, M. G., Truscott, K. N., Pfanner, N., und Rehling, P. (2004) Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11, 226-233.

Frazier, A.E, Chacinska, A., Truscott, K.N, Guiard, B., Pfanner, N., und Rehling, P. (2003) Mitochondria use different mechanisms for transport of multispinning membrane proteins through the intermembrane space. *Mol. Cell. Biol.* 23, 7818-7828.

Frey, T.G. und Mannella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319-324.

Gambill, B.D., Voos, W., Kang, P.J., Miao, B., Langer, T., Craig, E.A., und Pfanner, N. (1993) A dual role for mitochondrial heat shock protein 70 in membrane translocation of preproteins. *J. Cell Biol.* 123, 109-117.

Gärtner, F., Voos, W., Querol, A., Milla, B.R., Craig, E.A., Cumsky, M.G. und Pfanner, N. (1995) Mitochondrial import of subunit Va of cytochrome c oxidase characterized with yeast mutants. *J. Biol. Chem.* 270, 3780-3795.

Geissler, A., Chacinska, A., Truscott, K.N., Wiedemann, N., Brandner, K., Sickmann, A., Meyer, H.E., Meisinger, C., Pfanner, N., und Rehling, P. (2002) The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel. *Cell* 111, 507-518.

Gibbons, C., Montgomery, M.G., Leslie, A.G., und Walker, J.E. (2000) The structure of the central stalk in bovine F₁-ATPase at 2.4 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* 7, 1055-1061.

Glick, B.S. und von Heijne, G. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack a bacterial-type sec machinery. *Protein Sci.* 5, 2651-2652.

Gray, M.W., Burger, G., und Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283, 1476-1481.

Guo, Y., Cheong, N., Zhang, Z., De Rose, R., Deng, Y., Farber, S.A., Fernandes-Alnemri, T., und Alnemri, E.S. (2004) Tim50, a component of the mitochondrial translocator, regulates mitochondrial integrity and cell death. *J. Biol. Chem.* 279, 24813-2425.

Hamel, P., Sakamoto, W., Wintz, H., und Dujardin, G. (1997) Functional complementation of the oxa1-yeast mutation identifies an *Arabidopsis thaliana* cDNA involved in the assembly of respiratory complexes. *Plant J.* 12, 1319-1327.

Hartl, F.U. und Neupert, W. (1990) Protein sorting to mitochondria: evolutionary conservations of folding and assembly. *Science* 247, 930-938.

Hartl, F.U. (1996) Molekulare chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381, 571-580.

He, S. und Fox, T.D. (1997) Membrane translocation of mitochondrially coded Cox2p: distinct requirements for export of N and C termini and dependence on the conserved protein Oxa1p. *Mol. Biol. Cell* 8, 1449-1460.

Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1998) Oxa1p, an essential component of the N-tail protein export machinery in mitochondria. *Biochemistry* 95, 2250-2255.

Hell, K., Herrmann, J., Pratje, E., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1997) Oxa1p mediates the export of the N- and C-termini of pCoxII from the mitochondrial matrix to the intermembrane space. *FEBS Letters* 418, 367-370.

Hell, K., Neupert, W. und Stuart, R.A. (2001) Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA. *EMBO J.* 20, 1281-1288.

Herrmann, J.M., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1997) Insertion into the mitochondrial inner membrane of a polytopic protein, the nuclear encoded Oxa1p. *EMBO J.* 9, 2217-2226.

Herrmann, J.M. und Neupert, W. (2000) Protein transport into mitochondria. *Curr. Opin. Mikrobiol.* 3, 210-214.

Herrmann, J.M. und Bonnefoy, N. (2004) Protein export across the inner membrane of mitochondria: the nature of translocated domains determines the dependence on the Oxa1 translocase. *J. Biol. Chem.* 279, 2507-2512.

Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. und Pfanner, N. (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* 395, 516-521.

Hoogenraad, N.J. und Ryan, M.T. (2001) Translocation of proteins into mitochondria. *IUBMB Life* 51, 345-350.

Horwich, A. (1990) Protein import into mitochondria and peroxisomes. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2, 625-633.

Houben, E.N., Scotti, P.A., Valent, Q.A., Brunner, J., de Gier, J.L., Oudega, B., und Luirink, J. (2000) Nascent Lep inserts into the *Escherichia coli* inner membrane in the vicinity of YidC, SecY and SecA. FEBS Lett. 476, 229-233.

Hönlinger, A., Bömer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K., und Pfanner, N. (1996) Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. EMBO J. 15, 2125-2137.

Hossain, M.D., Furuike, S., Maki, Y., Adachi, K., Ali, M.Y., Hug, M., Itoh, H., Yoshida, M., und Kinosita, K. Jr. (2006) The rotor tip inside a bearing of a thermophilic F₁-ATPase is dispensable for torque generation. Biophys J. 90, 4195-4203.

Hwang, S., Jascur, T., Vestweber, D., Pon, L., und Schatz G. (1989) Disrupted yeast mitochondria can import precursor proteins directly through their inner membrane. J. Cell Biol. 109, 487-493.

Ii, M. und Mihara, K. (2001) Insertion of mitochondrial DNA-encoded F₁F₀-ATPase subunit 8 across the mitochondrial inner membrane *in vitro*. J. Biol. Chem. 276, 24704-24712.

Iwamoto, A., Miki, J., Maeda, M. und Futai, M. (1990) H⁺-ATPase γ subunit of *Escherichia coli*. Role of the conserved carboxy-terminal region. J. Biol. Chem. 265, 5043-5048.

Jia, L., Dienhart, M., Schrapf, M., McCauley, M., Hell, K., und Stuart, R.A. (2003) Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1. EMBO J. 22, 6438-6447.

Kakhniashvili, D., Mayor, J.A., Gremse, D.A., Xu, Y., and Kaplan, R.S. (1997) Identification of a novel gene encoding the yeast mitochondrial dicarboxylate transport protein via overexpression, purification, and characterization of its protein product. J. Biol. Chem. 272, 4516-4521.

Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S., und Jensen, R.E. (1997) The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. J. Cell Biol. 139, 1663-1675.

Kerscher, O., Sepuri, N.B., und Jensen, R.E. (2000) Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol. Biol. Cell* 11, 103-116.

Koch, H.G., Moser, M., Schimz, K.L., und Müller, M. (2002) The integration of YidC into the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* requires the signal recognition particle, SecA and SecYEG. *J. Biol. Chemistry* 277, 5715-5718.

Koehler, C.M., Jarosck, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J., und Schatz, G. (1998a) Import of mitochondrial carriers mediated by essential proteins of the intermembrane space. *Science* 279, 369-373.

Koehler, C.M., Merchant, S., Oppliger, K., Schmid, K., Jaros, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. und Tokatlidis, K. (1998b) Tim9p, an essential partner subunit of Tim10p for the import of mitochondrial carrier proteins. *EMBO J.* 17, 6477-6486.

Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberg, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne T., Schatz, G. und Or, E. (2000). Tim 18p, a new subunit of the Tim22 complex that mediates insertion of imported proteins into the yeast mitochondrial inner membrane. *Mol. Cell. Biol.* 20, 1187-1193.

Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R., Dalbey, R.E. (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* 13, 510-516.

Kübrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P.J., Blom, J., Meijer, M., und Pfanner N. (1994) The polytopic inner membrane Proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS Lett.* 349, 222-228.

Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R und Dalbey, R.E. (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperons facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* 13, 510-516.

Künkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., und Neupert W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93, 1009-1019.

Lai-Zhang, J., Xiao, Y. und Mueller, D.M. (1999). Epistatic interactions of deletion mutants in the genes encoding the F₁-ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 18, 58-64.

Lancar-Benba, J., Foucher, B. und Saint-Macary, M. (1996) Characterization, purification and properties of the yeast mitochondrial dicarboxylate carrier (*Saccharomyces cerevisiae*). *Biochimie* 78, 195-200.

Lemaire, C., Hamel, P., Velours, J., und Dujardin, G. (2000) Absence of the mitochondrial AAA protease Yme1p restores F₀-ATPase subunit accumulation in an *oxa1* deletion mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 275, 23471-23475.

Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H., Velours, J. Slonimski, P.P., di Rago, J.P. (2001) Identification of a nuclear gene (*FMCI*) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F₁-ATPase in heat stress conditions. *J. Biol. Chem.* 276, 6789-6796.

Li, Y., Dudek, J., Guiard, B., Pfanner, N., Rehling, P., und Voos, W. (2004) The presequence translocase-associated protein import motor of mitochondria. Pam16 functions in an antagonistic manner to Pam18. *J Biol Chem.* 279, 38047-38054.

Longtine, M.S., McKenzie, A. 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., und Pringle, J. R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.

Luirink, J., Samuelson, T., und de Gier, J.W. (2001) YidC/Oxa1p/Alb3: evolutionarily conserved mediators of membrane protein assembly. *FEBS Lett.* 501, 1-5.

Maarse A.C., Blom J., Grivell L.A., Meijer M. (1992) MPI1, an essential gene encoding a mitochondrial membrane protein, is possibly involved in protein import into yeast mitochondria. *EMBO J.* 11, 3619-3628.

Margulis, L. 1981. Symbiosis in Cell Evolution. W.H. Freeman, San Francisco.

- Meisinger, C., Sickmann, A., und Pfanner, N. (2008) The mitochondrial proteome: from inventory to function. *Cell* 134, 22-24.
- Meyer, W., Bömer, U., und Pratje, E. (1997) Mitochondrial inner membrane bound Pet1402 protein is rapidly imported into mitochondria and affects the integrity of the cytochrome oxidase and ubiquinol-cytochrome c oxidoreductase complexes. *Biol. Chem.* 378, 1373-1379.
- Mitchell, P. (1961) Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144-148.
- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W., und Hell, K. (2003) Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* 22, 816-825.
- Moore, M., Harrison, M.S., Peterson, E.C., und Henry, R. (2000) Chloroplast Oxa1p homolog albino3 is required for post-translational integration of the light harvesting chlorophyll-binding protein into thylakoid membranes. *J. Biol. Chem.* 275, 1529-1532.
- Moro, F., Sirrenberg, C., Schneider, H.C., Neupert, W. und Brunner M. (1999) The Tim17/23 preprotein translokase of mitochondria: composition and function in protein transport into matrix. *EMBO J.* 18, 3667-3675.
- Mueller, D.M. (2000) Partial assembly of the yeast mitochondrial ATP synthase. *J. Bioenerg. Biomembr.* 32, 391-400.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 51 Pt 1, 263-273.
- Müller, M., Pänke, O., Junge, W., und Engelbrecht, S. (2002) F₁-ATPase, the C-terminal end of subunit γ is not required for ATP hydrolysis-driven rotation. *J. Biol. Chem.* 277, 23308-23313.

- Nakai, T., Yasuhara, T., Fujiki, Y., und Ohashi, A. (1995) Multiple genes, including a member of the AAA family, are essential for degradation of unassembled subunit 2 of cytochrome *c* oxidase in yeast mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 15, 4441-4452.
- Nargang, F.E., Preuss, M., Neupert, W., und Hermann, J.M. (2002) The Oxa1 protein forms a homooligomeric complex and is an essential part of the mitochondrial export translokase in *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 277, 12846-12853.
- Nelson, D.R., Felix, C.M., und Swanson, J.M. (1998) Highly conserved charge-pair networks in the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol.* 277, 285-308.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 863-917
- Neupert, W. and Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 3, 555-565.
- Neupert, W. und Herrmann, J.M. (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 723-749.
- Ni, Z.-L., Dong, H., und Wei, J.-M. (2005) N-terminal deletion of the γ subunit affects the stabilization and activity of chloroplast ATP synthase. *FEBS J.* 272, 1379-1385.
- Nury, H., Dahout-Gonzalez, C., Trezeguet, V., Lauquin, G.J., Brandolin, G., and Pebay-Peyroula, E. (2006) Relations between structure and function of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Annu. Rev. Biochem.* 75, 713-741.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W. und Brunner, M. (2002). The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J.* 21, 3659-3671.
- Oldenburg, K.R., Vo, K.T., Michaelis, S. und Paddon, C. (1997) Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Res.* 25, 451-452.

- Palmieri, L., Palmieri, F., Runswick, M.J., und Walker, J.E. (1996) Identification by bacterial expression and functional reconstitution of the yeast genomic sequence encoding the mitochondrial dicarboxylate carrier protein. *FEBS Lett.* 399, 299-302.
- Palmieri, L., Vozza, A., Hönlinger, A., Dietmeier, K., Palmisano, A., Zara, V., Palmieri, F. (1999) The mitochondrial dicarboxylate carrier is essential for the growth of *Saccharomyces cerevisiae* on ethanol or acetate as the sole carbon source. *Mol. Microbiol.* 2, 569-577.
- Paschen, S.A., und Neupert, W. (2001) Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* 52, 101-112.
- Paul, M.-F., Ackermann, S., Yue, J., Arselin, G., Velours, J., und Tzagoloff, A. (1994) Cloning of the yeast ATP3 gene coding for the γ -subunit of F₁ and characterization of *atp3* mutants. *J. Biol. Chem.* 269, 26158-26164.
- Pfanner, N., Douglas, M.G., Endo, T., Hoogenraad, N. J., Jensen, R. E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz U.K., und Schore, G. C. (1996) Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem. Sci.* 21, 51-52.
- Pfanner, N., Craig A.E., und Hönlinger A. (1997) Mitochondrial preprotein translocase. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13, 25-51.
- Pfanner, N. und Geissler, A. (2001) Versality of the mitochondrial protein import machinery. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2, 339-349.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Koray, C., Hixon, K.K., Mottaz, H.M., Zischka, H., Veffing, M., Herman, Z.S., Davis R.W., Meitinger, T., Oefner P.J., Smith, R., D. und Steinetz, L.M. (2004) Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol.* 2: E160.
- Rassow, J. und Pfanner, N. (1991) Mitochondrial preproteins en route from the outer membrane to the inner membrane are exposed to the intermembrane space. *FEBS Lett.* 293, 85-88.

Rassow, J., Maarse, A.C., Krainer, E., Kübrich, M., Müller, H., Meijer, M., Craig, E.A. und Pfanner, N. (1994) Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *J. Cell Biol.* 127, 1547-1556.

Rassow, J. und Pfanner, N. (1995) Molekular chaperones and intracellular protein translokation. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 126, 199-264.

Rassow, J., Dekker, P.J., van Wilpe, S., Meijer, M., und Soll, J. (1999) The preprotein translocase of the mitochondrial inner membrane: function and evolution. *J. Mol. Biol.* 286, 105-120.

Rassow, J., Hartl, F.U., Guiard, B., Pfanner, N., und Neupert, W. (1990) Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state. *FEBS Lett.* 275, 190-194.

Rehling, P., Wiedemann, N., Pfanner, N., und Truscott, K.N. (2001) The mitochondrial import machinery for preproteins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 36, 291-336.

Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kühlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N., und Pfanner, N. (2003) Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* 299, 1747-1751.

Reif, S. (2005) Untersuchungen zur Funktion des Tim44/mtHsp70-Komplexes bei der Membraninsertion und Oligomerisierung mitochondrialer Proteine. Dissertation, Medizinische Fakultät der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W. und Stuart, R.A. (1998) Sorting of D-lactate dehydrogenase to the inner membrane of mitochondria. Analysis of topogenic signal and energetic requirements. *J. Biol. Chem.* 273, 8040-8047.

Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W., und Stuart, R.A. (1999) N-terminal tail export from the mitochondrial matrix. *J. Biol. Chem.* 274, 19617-19622.

Ryan, K.R., Menold, M.M., Garrett, S., und Jensen, R.E. (1994) *SMS1*, a high-copy suppressor of the yeast *mas6* mutant, encodes an essential inner membrane protein required for mitochondrial protein import. *Mol. Biol. Cell* 5, 529-538.

Sääf, A., Monné, M., de Gier, J-W., und von Heijne, G. (1998) Membrane topology of the 60-kDa Oxa1p homologue from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 273, 30415-30418.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual*. 2. Auflage. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samuelson, J.C., Chen, M., Jiang, F., Möller, I., Wiedmann, M., Kuhn, A., Phillips, G.J., und Dalbey, R.E. (2000) YidC mediates membrane protein insertion in bacteria. *Nature* 406, 637-641.

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 5463-5467.

Schatz, G., und Dobberstein B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* 271, 1519-1526.

Schägger, H. und von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* 199, 223-231.

Schmidt, R.F. und Unsicker, K. (2003) *Lehrbuch Vorklinik. Teil A: Anatomie, Biochemie und Physiologie der Zelle*. Deutscher Ärzte-Verlag, Köln.

Scotti, P.A., Urbanus, M.L., Brunner, J., de Gier, J-W.L., von Heine, G., van der Does, C., Driessen, A.J.M., Oudega, B., und Luirink, J. (2000) YidC, the *Escherichia coli* homologue of mitochondrial Oxa1p, is a component of the Sec translocase. *EMBO J.* 19, 542-549.

Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfish, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 13207-13212.

Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W., und Brunner, M., (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 38, 582-585.

Sirrenberg, C., Endres, M., Fölsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W., und Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* 391, 912-915.

Smith, C.P. und Thorsness, P.E. (2005) Formation of an energized inner membrane in mitochondria with a γ -deficient F_1 -ATPase. *Eukaryotic Cell* 4, 2078-2086.

Sokolov, M., Lu, L., Tucker, W., Gao, F., Gegenheimer, P.A., und Richter, M.L. (1999) The 20 C-terminal amino acid residues of the chloroplast ATP synthase g subunit are not essential for activity. *J. Biol. Chem.* 274, 13824-13829.

Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R.R., und Kühlbrand, W. (2008) Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* 27, 1154-1160.

Stojanovski, D., Johnston, A.J., Streimann, I., Hoogenraad, N.J., und Ryan, M.T. (2003) Import of nuclear-encoded proteins into mitochondria. *Exp. Physiol.* 88, 57-64.

Stuart, R. (2002) Insertion of protein into the inner membrane of mitochondria: the role of the Oxa1 complex. *Biochim. Biophys. Acta.* 1592, 79-87.

Sundberg, E., Slagter, J.G., Fridborg, I., Cleary, S.P., Robinson, C. und Coupland, G. (1997) *ALBINO3*, an Arabidopsis nuclear gene essential for chloroplast differentiation, encodes a chloroplast protein that shows homology to proteins present in bacterial membranes and yeast mitochondria. *Plant Cell* 9, 717-730.

Szyrach, G., Ott, M., Bonnefoy, N., Neupert, W., und Herrmann, J.M. (2003) Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria. *EMBO J.* 22, 6448-6457.

Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meier, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N. und Wagner, R. (2001) A presequence-and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat. Struct. Biol.* 8, 1074-1082.

Ungermann, C., Neupert, W., und Cyr, D.M. (1994) The role of Hsp70 in conferring unidirectionality on protein translocation into mitochondria. *Science* 266, 1250-1253.

Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W. und Cyr, D.M. (1996) The $\Delta\Psi$ -and Hsp70/MIM44-dependent reaction cycle driving early steps of protein import into mitochondria. *EMBO J.* 15, 735-744.

Urbanus, M.L., Scotti, P.A., Fröderberg, L., Saaf, A., de Gier, J.W., Brunner, J., Samuelson, J.C., Dabley, R.E., Oudega, B., und Luirink, J. (2001) Sec-dependent membrane protein insertion: sequential interaction of nascent FtsQ with SecY and YidC. *EMBO Rep.* 2, 524-529.

Urbanus M.L., Fröderberg L., Drew D., Björk P., de Gier J-W.L., Brunner J., Oudega B., Luirink J. (2002) Targeting, insertion, and localization of *Escherichia coli* YidC. *J. Biol. Chem.* 277, 12718-12723.

van der Laan, M., Chacinska, A., Lind, M., Perschil, I., Sickmann, A., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N., und Rehling, P. (2005) Pam17 is required for architecture and translocation activity of the mitochondrial protein import motor. *Mol. Cell. Biol.* 25, 7449-7458.

van der Laan, M., Nouwen, N.P. und Driessen, A.J. (2005) YidC-an evolutionary conserved device for the assembly of energy-transducing membrane protein complex. *Curr. Opin. Microbiol.* 8, 182-187.

van Wilpe, S., Ryan, M.T., Hill, K., Maarse, A.C., Meisinger, C., Brix, J., Dekker, P.J., Moczko, M., Wagner, R., Meijer, M., Guiard, B., Hönlinger, A., und Pfanner, N. (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature*, 401, 485-489.

Vial, S., Lu, H., Allen, S., Savory, P., Thornton, D., Shehhan, J., und Tokatlidis, K. (2002) Assembly of Tim9 and Tim10 into a function chaperone. *J. Biol. Chem.* 277, 36100-36108.

Voisine, C., Craig, E.A., Zufall, N., von Ahsen, O., Pfanner, N., und Voos W. (1999) The protein import motor of mitochondria: unfolding and trapping of preproteins are distinct and separable functions of matrix Hsp70. *Cell* 97, 565-574.

Voos, W., Gambill, D., Guiard, B., Pfanner, N., und Craig, E.A. (1993) Presequence and mature part of preproteins strongly influence the dependence of mitochondrial protein import on heat shock protein 70 in the matrix. *J. Cell Biol.* 123, 119-126.

Voos W., von Ahsen O., Müller H., Guiard B., Rassow J., und Pfanner N. (1996) Differential requirement for the mitochondrial Hsp70-Tim44 complex in unfolding and translocation of preproteins. *EMBO J.* 15, 2668-2677.

Wang, Z.G. und Ackerman, S.H. (1998) Mutational studies with Atp12p, a protein required for assembly of the mitochondrial F₁-ATPase in yeast. Identification of domains important for Atp12p function and oligomerization. *J. Biol. Chem.* 273, 2993-3002.

Wang, Y. und Weiner, H. (1994) Evaluation of electrostatic and hydrophobic effects on the interaction of mitochondrial signal sequences with phospholipid bilayers. *Biochemistry* 33, 12860-12867.

Webb, C. T., Gorman, M.A., Lazarou, M., Ryan, M. T., und Gulbis, J.M. (2006) Crystal structure of the mitochondrial chaperone Tim9, Tim10 reveals a six-bladed alpha propeller. *Mol. Cell* 1, 123-133.

Whatley, F.R. (1981) The establishment of mitochondria: *Paracoccus* and *Rhodopseudomonas*. *Ann. N Y Acad. Sci.* 361, 330-340.

Wickner, W. und Leonard, M.R. (1996) *Escherichia coli* preprotein translocase. *J. Biol. Chem.* 271, 29514-29516.

Wiedemann, N., Pfanner, N., und Ryan, M.T. (2001) The threemodules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J.* 5, 951-960.

Yaffe, M.P. (1999) The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* 283, 1493-1497.

Yamamoto, H., Esaki, M., Kanamori, T., Tamura, Y., Nishikawa, S., und Endo, T. (2002) Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes. *Cell* 111, 519-528.

Yano, M., Hoogenraad, N., Terada, K., und Mori, M. (2000) Identification and functional analysis of human Tom22 for protein import into mitochondria. *Mol. Cell. Biol.* 20, 7205-7213.

Yasuda, R., Noji, H., Kinosita, K. Jr, Yoshida, M. (1998) F₁-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps. *Cell* 7, 1117-1124.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. und Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning. A laboratory manual.* Second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Yen, M.R., Harley, K.T., Tseng, Y.H., und Saier, M.H. Jr. (2001) Phylogenetic and structural analyses of the oxa1 family of protein translocases. *FEMS Microbiol. Lett.* 204, 223-231.

Yoshida, M., Muneyuki, E. und Hisabori, T. (2001) ATP synthase – a marvellous rotary engine of the cell. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2, 669-677.

Zara V, Palmisano I, Rassow J, Palmieri F. (2001) 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.* 5, 965-971.

7. Anhang

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

ADH	Alkoholdehydrogenase
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
Amp	Ampicillin
Amy	Amylase
Apo	Apoferritin
APS	Ammoniumperoxidsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AS	Aminosäure
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)imino-tris(hydroxymethyl)methan
BSA	Rinderserumalbumin
Bp	Basenpaare
C	Cytosin
Cam	Chloramphenicol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTPs	Didesoxyribonukleotidtriphosphate
dGTP	Desoxyguanidintriphosphat
DHFR	Dihydrofolatreduktase
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSS	Disuccinimidylsuberat
DTT	Dithiothreitol
EACA	e-Amino-Caprinsäure
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EIA	Enzyme-Immuno-Assay
EGS	Ethylen Glycol-bis(Succinimidylsuccinat)
EtOH	Ethanol
G	Guanin
Hepes	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure

Hsp	Hitzeschockprotein
H ₂ O ₂	Bidestilliertes Wasser
Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
Kan	Kanamycin
kb	Kilobasen
Kpi	Kaliumphosphat
L	Liter
LB	Luria-Broth
MOPS	3-(N-Morpholino-)Ethansulfonat
MP	Magermilchpulver
MPP	Mitochondriale Processierungspeptidase
NADH	Nicotinamiddinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
Nm	Nanometer
OD	Optische Dichte (Extinktion)
PAS	Protein A Sepharose
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered saline
PCR	Polymeraseketten-Reaktion
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonucleinsäure
Ponceau S	3-Hydroxy-4-(2-sulfo-4-(4-sulfophylazo))2,7-Naphtalindisulfonsäure
Rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
PVDF	Polyvinylidendifluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SEM	Sucrose EDTA MOPS-Puffer
SM	Selektivmedium
S-MBS	m-Maleinimidobenzoyl-sulfo-N-hydroxysuccinimidester
TAE	Tris/Acetat/EDTA-Puffer

TBE	Tris/Borat/EDTA-Puffer
TBS	Tris buffered saline
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris/EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tricin	N-Tris-(hydroxymethyl)-methyl-glycin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TX-100	Triton X-100
UV	Ultraviolettes Licht
WT	Wildtyp
YEPD	Yeast-Peptide-Dextrose
YPEG	Bacto-Yeast/Bacto-Peptone/Ethanol/Glycerin
YPG-Medium	Yeast extract-Peptide-Glycerin-Medium
YPD-Medium	Yeast extract-Peptide-Glucose-Medium

Lebenslauf

Olga Randel, geb. Majorosova

geboren am 8.1.1974 in Presov, Slowakei

1980-1988 Grundschule in Presov

1988-1992 Gymnasium in Presov

1992-1997 P.J. Safarika-Universität Kosice, Studiengang Biologie, Magister

13.5.1997 Staatsexamina zum Magistertitel

1995-1997 Magisterarbeit zum Thema „Durchseuchung der Zecken *Ixodes ricinus* mit *Borrelia burgdorferi* in der Stadt Kosice und Umgebung“

12.3.1998 Heirat mit Denis Randelj (Randelj, seit 2005)

Ab 1.4.2001 Mitarbeiterin in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Joachim Rassow,
Institut für Mikrobiologie der Universität Hohenheim,
seit Mai 2002 als Doktorandin

3.1.2004 Geburt des Sohnes Tristan Thimothei

7.7. 2005 Geburt der Tochter Olina Elisabeth

Ende 2006 Abschluß der experimentellen Arbeiten an der Universität Hohenheim

Ab 17.9.2007 Angestellte bei Berlin-Chemie AG

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Originalveröffentlichungen:

Reif, S.*, Randelj, O.*, Domanska, G., Dian, E.A., Krimmer, T., Motz, C. und Rassow, J. (2005) Conserved mechanism of Oxa1 insertion into the mitochondrial inner membrane. J. Mol. Biol. 354, 520-528. (* Both authors contributed equally to this work.)

Zara, V., Ferramosca, A., Capobianco, L., Baltz, K.M., Randel, O., Rassow, J. Palmieri, F. und Papatheodorou, P. (2007) Biogenesis of yeast dicarboxylate carrier: the carrier signature facilitates translocation across the mitochondrial outer membrane. J. Cell Sci. 120, 4099-4106.

Dian, E.A., Papatheodorou, P., Emmrich, K., Randel, O., Geissler, A., Kölling, R., Rassow, J. und Motz, C. (2008) Role of γ -subunit N- and C-terminus in assembly of the mitochondrial ATP synthase in yeast. J. Mol. Biol. 377, 1314-1323.

Buchbeiträge:

Randelj, O., Rassow, und Motz, C. (2007) Separation of proteins by blue native electrophoresis. Methods Mol. Biol. 390, 417-428.

Posterpräsentationen:

Papatheodorou, P., Ferramosca, A., Randelj, O., Zara, V., und Rassow, J. (2005) Biogenesis of rat mitochondrial citrate carrier (pCIC). International Symposium PROTEIN SORTING, Veranstaltung des SFB 388, Freiburg, 6.-8. März 2005.

Papatheodorou, P., Ferramosca, A., Randelj, O., Zara, V., und Rassow, J. (2005) Biogenesis of rat mitochondrial citrate carrier (CIC): Presequence binding to Tom20 inhibits membrane translocation. 17. Faltertage, organisiert von Prof. Dr. Rainer Jaenicke, Wittenberg, 8.-10. April 2005.

Danksagung

Mein Dank gilt an dieser Stelle den Menschen, die mich an meinem Weg begleitet haben, mich unterstützt haben und mir geholfen haben diese Arbeit zu beenden.

Herrn Prof. Dr. Joachim Rassow danke ich für die Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe, für die Überlassung des Themas, sowie für die Unterstützung, die ich während der Zeit in seinem Labor erfahren habe. Sehr dankbar bin ich ihm auch für die Geduld, mit der er nach dem Abschluß der experimentellen Arbeiten das Verfassen der vorliegenden Dissertation begleitet hat, und mit der er die Endversion, mit philologischer Akribie, noch einmal durchgesehen hat.

Herrn Prof. Dr. Arthur Pfitzner danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferates zur vorliegenden Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Andreas Kuhn, sowie bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitsgruppen seines Institutes bedanke ich mich für die Möglichkeit, verschiedene Geräte zu benutzen, ohne die viele wichtige Experimente nicht hätten durchgeführt werden können.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei der Kommission der Universität Hohenheim, die mir durch die Vermittlung eines Stipendiums des Landes Baden-Württemberg, die Fertigstellung der Dissertation sehr erleichtert hat.

Für die Einführung in die Technik der Blauen Nativgelelektrophorese und für die Hilfe bei der Planung und Auswertung der Experimente bedanke ich mich bei Herrn Dr. Christian Motz. Sehr dankbar bin ich ihm auch für seine hilfreichen Kommentare und Korrekturvorschläge zu den ersten Entwürfen der Dissertation. Für die vielfältige Hilfe bei der Aufrechterhaltung des gesamten Laborbetriebes bedanke ich mich bei Frau Elsa Seibel. Für eine Reihe sehr glücklicher Kooperationen, teils vor Ort, teils über große Distanzen hinweg, bedanke ich mich bei Katrin Baltz, Elke Dian und Panagiotis Papatheodorou (Universität Hohenheim), Andreas Geissler, Thomas Krimmer und Sebastian Reif (Universität Freiburg), Kerstin Emmrich (Ruhr-Universität Bochum), sowie Herrn Prof. Dr. Vincenzo Zara (Universität Lecce, Italien) und seinen Mitarbeiterinnen Loredana Capobianco, Alessandra Ferramosca, und Ilaria Palmisano. Besonders bedanken möchte ich mich schließlich bei Grazyna Domanska, mit der ich drei Jahre lang das Labor teilen durfte. Mit

ihrer molekularbiologischen Kompetenz, wie mit ihrer unbeirrbaren Solidarität und Zuversicht, hatte sie einen wesentlichen Anteil daran, dass ich in dieser Zeit jeden Tag sehr gerne in das Labor gegangen bin.

Mein Dank gehört auch meinen Eltern, den Menschen, die mich immer unterstützt haben, mir geholfen haben und immer an mich geglaubt haben.

Widmen möchte ich diese Arbeit meinen beiden Kindern,
Tristan Thimothei, geboren am 3. Januar 2004,
und Olina Elisabeth, geboren am 7. Juli 2005.

Erklärung

Hiermit versichere ich, Olga Randel, Doktorandin der Fakultät für Naturwissenschaften der Universität Hohenheim, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt, und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe, und dass ich wörtlich oder inhaltlich übernommene Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Hohenheim, den