

**Molekularer Aufbau und Funktion von
Kontaktstellen zwischen Innenmembran und
Außenmembran der Mitochondrien**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Fakultät für Biologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Max Harner
aus
Aichach

München
2012

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere hiermit an Eides statt, dass die vorgelegte Dissertation von mir selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt ist.

München, den

(Max Harner)

Dissertation eingereicht am:

| | |
|------------------|------------------------------|
| 1. Gutachter: | Prof. Dr. Jürgen Soll |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Jörg Nickelsen |
| Sondergutachter: | Prof. Dr. Dr. Walter Neupert |

Mündliche Prüfung am: 23.03.2012

Inhaltsverzeichnis

| | | |
|-------|--|----|
| 1 | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | Mitochondrium – Überblick..... | 1 |
| 1.2 | Mitochondriale Ultrastruktur | 2 |
| 1.2.1 | Crista Junctions | 3 |
| 1.2.2 | Funktionen mitochondrialer Architektur..... | 4 |
| 1.3 | Mitochondriale Dynamik - Fusion und Teilung..... | 6 |
| 1.4 | Kontaktstellen zwischen der Innenmembran und Außenmembran von Mitochondrien... | 9 |
| 1.4.1 | Permanente Kontaktstellen..... | 9 |
| 1.4.2 | Transiente Kontaktstellen..... | 12 |
| 1.4.3 | Unterscheidung von permanenten und transienten Kontaktstellen | 15 |
| 1.5 | Zielsetzung | 16 |
| 2 | Ergebnisse..... | 17 |
| 2.1 | Etablierung eines Markerproteins zur Identifizierung von Kontaktstellen der mitochondrialen Außen- und Innenmembran..... | 17 |
| 2.2 | Die Lokalisation der GFP-Domäne des Fusionsproteins GFP-Tim23 | 17 |
| 2.2.1 | Topologie von GFP-Tim23 bestimmt die Lebensfähigkeit der Zellen..... | 22 |
| 2.2.2 | Die Topologie von GFP-Tim23 ist entscheidend für die Funktionalität der mitochondrialen Protein-Tanslokasen | 25 |
| 2.2.3 | Die laterale Freisetzung aus der TOM-Pore ist sequenzabhängig..... | 29 |
| 2.3 | Identifizierung von Kontaktstellenproteinen..... | 34 |
| 2.3.1 | Identifikation von Fcjl als erstes Kontaktstellenprotein | 36 |
| 2.3.2 | Identifikation des Kontaktstellenproteoms mittels SILAC | 38 |
| 2.3.3 | Der mitochondriale Kontaktstellen-Komplex | 43 |
| 2.3.4 | Topologie der Kontaktstellenproteine | 46 |
| 2.3.5 | Submitochondriale Lokalisierung | 48 |
| 2.3.6 | Phänotypen der Mcs-Deletionsmutanten..... | 52 |
| 2.3.7 | Interaktion der Kontaktstellenproteine mit Proteinen der mitochondrialen Außenmembran | 56 |
| 3 | Diskussion..... | 60 |
| 3.1 | Die Lokalisation der GFP-Domäne des Fusionsproteins GFP-Tim23 ist abhängig von der Wachstumstemperatur | 60 |
| 3.1.1 | GFP-Tim23:37°C führt zu vermindertem Zellwachstum aufgrund von vermindertem Proteinimport | 62 |
| 3.1.2 | Laterale Freisetzung aus der TOM-Pore in die Außenmembran ist möglich..... | 63 |

| | | |
|--------|---|----|
| 3.1.3 | Insertionsmechanismus in die mitochondriale Außenmembran..... | 64 |
| 3.2 | Der MICOS-Komplex..... | 66 |
| 3.2.1 | MICOS ist wichtig für die mitochondriale Architektur und die Funktion von Mitochondrien | 69 |
| 3.2.2 | Mitochondriale Architektur und mögliche molekulare Funktionen..... | 71 |
| 3.2.3 | Relevanz der Ergebnisse aus den Experimenten in Hefe für höhere Eukaryoten ... | 72 |
| 4 | Zusammenfassung | 75 |
| 5 | Summary..... | 78 |
| 6 | Material und Methoden..... | 80 |
| 6.1 | Molekularbiologische Methoden | 80 |
| 6.1.1 | Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i> | 80 |
| 6.1.2 | Isolierung von genomischer DNA aus <i>S.cerevisiae</i> | 81 |
| 6.1.3 | Konzentrationsbestimmung von DNA | 81 |
| 6.1.4 | Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion..... | 81 |
| 6.1.5 | Agarosegelelektrophorese | 82 |
| 6.1.6 | Reinigung von PCR-Produkten | 82 |
| 6.1.7 | Restriktionsverdau..... | 82 |
| 6.1.8 | Ligation | 83 |
| 6.1.9 | Klonierungsstrategien..... | 83 |
| 6.1.10 | Verwendete Plasmide | 86 |
| 6.1.11 | Herstellung elektrokompenter <i>Escherichia coli</i> (<i>E.coli</i>) | 87 |
| 6.1.12 | Transformation von <i>E.coli</i> | 88 |
| 6.1.13 | Transformation von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>S.cerevisiae</i>) | 88 |
| 6.1.14 | Genetische Manipulation von <i>S.cerevisiae</i> | 89 |
| 6.1.15 | Verwendete <i>S.cerevisiae</i> -Stämme | 92 |
| 6.2 | Proteinbiochemische Methoden..... | 92 |
| 6.2.1 | Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford | 92 |
| 6.2.2 | Trichloressigsäure-Präzipitation von Proteinen..... | 93 |
| 6.2.3 | SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)..... | 93 |
| 6.2.4 | Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) | 94 |
| 6.2.5 | Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran | 94 |
| 6.2.6 | Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran | 95 |
| 6.2.7 | Synthese von radioaktiv markiertem Vorstufenprotein..... | 95 |
| 6.2.8 | Autoradiographie und densitometrische Quantifizierung..... | 96 |
| 6.2.9 | Affinitätschromatographie von getagten Proteinen..... | 96 |

| | | |
|--------|---|-----|
| 6.3 | Zellbiologische Methoden..... | 98 |
| 6.3.1 | Kultivierung von <i>E.coli</i> zur Expression von MBP-(Δ 1-13)Ybr262c | 98 |
| 6.3.2 | Kultivierung von <i>S.cerevisiae</i> | 98 |
| 6.3.3 | Austausch von Plasmiden in <i>S.cerevisiae</i> mittels 5-Fluororotsäure (5-FOA)..... | 99 |
| 6.3.4 | Analyse des Wachstumsphänotyps von <i>S.cerevisiae</i> | 99 |
| 6.3.5 | Gewinnung von mitochondrialem Rohextrakt–„Mitochondrien-Schnell-Präparation“ | 100 |
| 6.3.6 | Isolierung von Mitochondrien aus <i>S.cerevisiae</i> | 101 |
| 6.3.7 | Bestimmung der Topologie von mitochondrialen Proteinen durch Proteasebehandlung | 102 |
| 6.3.8 | Bestimmung der Membranassoziation von mitochondrialen Proteinen durch alkalische Extraktion | 102 |
| 6.3.9 | Import von Vorstufenprotein in Mitochondrien | 103 |
| 6.3.10 | Subfraktionierung von Mitochondrien | 104 |
| 6.3.11 | Quantitative massenspektrometrische Analyse von mitochondrialen Vesikeln (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture/SILAC) | 105 |
| 6.3.12 | Fixierung von Hefezellen | 106 |
| 6.3.13 | Elektronenmikroskopie..... | 108 |
| 6.4 | Immunologische Methoden..... | 109 |
| 6.4.1 | Herstellung von polyklonalen Antikörpern | 109 |
| 6.4.2 | Affinitätsreinigung von Antikörpern..... | 110 |
| 6.4.3 | Immundekoration von Proteinen mit spezifischen Antikörpern..... | 111 |
| 6.4.4 | Immundetektion von Proteinen mit käuflich erworbenen Antikörpern..... | 112 |
| 6.5 | Medien | 112 |
| 6.5.1 | <i>E.coli</i> -Medien | 112 |
| 6.5.2 | <i>S.cerevisiae</i> -Medien | 113 |
| 6.6 | Chemikalien und Geräte..... | 114 |
| 6.6.1 | Chemikalien und Verbrauchsmaterialien | 114 |
| 6.6.2 | Geräte | 116 |
| 7 | Literaturverzeichnis | 119 |
| | Abkürzungsverzeichnis | 131 |

1 Einleitung

1.1 Mitochondrium – Überblick

Das Mitochondrium ist eines einer Vielzahl von Organellen in der eukaryotischen Zelle. Verglichen mit anderen Organellen zeichnet es sich, wie auch Plastiden, durch zwei grundlegende Besonderheiten aus. Zum einen sind Mitochondrien von zwei Membranen umgeben, die als Außenmembran und Innenmembran bezeichnet werden. Zum anderen besitzen Mitochondrien ihr eigenes genetisches Material (Nass und Nass, 1963). Diese Eigenschaften werden durch die Endosymbiontentheorie erklärt. Dieser Theorie zufolge entstanden Mitochondrien durch Endozytose eines aerob lebenden α -Proteobakteriums durch eine anaerobe Archaeen-Zelle (Margulis, 1971) (Gray, 1992). Von allen bisher sequenzierten bakteriellen Genomen konnte mittlerweile das Genom von *Rickettsia prowazekii* als das identifiziert werden, das den verschiedenen mitochondrialen Genomen am ähnlichsten ist (Andersson et al., 1998). Obwohl die Größe der mitochondrialen Genome unterschiedlicher Organismen erheblich variiert, ist allen die drastische Verkleinerung im Vergleich zu bakteriellen Genomen gemein. Dies ist auf Verlust von redundanten Genen und auf horizontalen Gentransfer vom Endosymbionten zum Wirt zurückzuführen (Burger et al., 2003; Scheffler, 2001).

Das menschliche mitochondriale Genom kodiert für dreizehn, das der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* für lediglich acht Proteine. Diese Proteine stellen, abgesehen von einem ribosomalen Protein, ausschließlich Untereinheiten der Atmungskette und der ATP-Synthase dar (Anderson et al., 1981; Foury et al., 1998). Das mitochondriale Proteom hingegen besteht aus 1000-2000 Proteinen. Der weitaus größte Teil muss daher nach Synthese im Cytosol importiert werden. Dies geschieht mit Hilfe von komplex aufgebauten Importmaschinerien (Mokranjac und Neupert, 2009). Nichts desto trotz können eine funktionstüchtige Atmungskette und ATP-Synthase nur ausgebildet werden, wenn die mitochondriale DNA (mtDNA) intakt vorhanden ist. Es müssen also Mechanismen vorhanden sein, die zum einen die Vererbung der mtDNA und zum anderen eine Art von Qualitätssicherung darstellen. Der genaue Mechanismus der Vererbung der mtDNA ist noch unbekannt. Es konnte jedoch ein Zusammenhang von Vererbung und Qualitätssicherung mit den mitochondrialen Fusions- und Teilungsapparaten gezeigt werden (Chen et al., 2007)

(Detmer und Chan, 2007; Parone et al., 2008; Tatsuta und Langer, 2008). Somit besteht eine direkte Verbindung zwischen mitochondrialer Morphologie, dem Aussehen des mitochondrialen Netzwerkes auf lichtmikroskopischer Ebene, und Funktion.

Ein ähnlicher Zusammenhang konnte für ein Protein gezeigt werden, das für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Architektur, oder mit einem anderen Ausdruck, mitochondriale Ultrastruktur, essentiell ist, Fcj1. Unter diesen beiden simultan verwendeten Begriffen versteht man, im Gegensatz zur Morphologie, die Erscheinung bzw. den Aufbau von Mitochondrien auf suborganellärer Ebene, erkennbar im Elektronenmikroskop. Fcj1 ist das Hefe-Homolog von Mitofilin und essentiell für die Bildung oder Aufrechterhaltung der Crista Junctions (CJ). Verlust dieser Strukturen führt zu Verlust der mitochondrialen DNA und damit einhergehend zu einer Verringerung der respiratorischen Kompetenz (Rabl et al., 2009).

In Anbetracht des offensichtlichen Zusammenhangs zwischen Funktion und mitochondrialer Morphologie bzw. Architektur wird im Folgenden auf die Mechanismen, die diesen zugrunde liegen, näher eingegangen.

1.2 Mitochondriale Ultrastruktur

Neben dem im Lichtmikroskop sichtbaren Netzwerk erkennt man im Elektronenmikroskop die komplexe Ultrastruktur von Mitochondrien. Bemerkenswerterweise kann man innerhalb der Innenmembran weiter zwischen der inneren Grenzmembran (inner boundary membrane/IBM) und der Cristamembran (CM) unterscheiden. Die IBM grenzt hierbei direkt an die Außenmembran an, wohingegen die CM Ausstülpungen der Innenmembran in die Bereich der Matrix darstellt. Somit lassen sich aufgrund dieser einzigartigen Architektur folgende mitochondrialen Subkompartimente unterscheiden: Matrix, Intermembranbereich (intermembrane space/IMS) und Intracristalbereich (intracristal space/ICS). Die Gestalt dieser Subkompartimente, die durch die verschiedenen Membranen definiert wird, wird als mitochondriale Architektur oder Ultrastruktur bezeichnet. Die komplexe Struktur der Innenmembran wurde erstmals durch Palade und Sjöstrand beschrieben (Palade, 1952, 1953; Sjostrand, 1953), die anhand ihrer Ergebnisse allerdings unterschiedliche Modelle für die mitochondriale Architektur vorschlugen. Auf Palade geht das „baffle-Model“ zurück. In diesem Modell „durchkreuzen“ (engl. to baffle) Einstülpungen der Innenmembran den Matrixraum. Diese werden als „cristae mitochondriales“ bezeichnet und sollen auf einer Seite abgeschlossen auf der anderen Seite hingegen direkt mit der IBM verbunden sein. Die

Verbindung zwischen IMS und ICS zeichnet sich in diesem Modell durch eine sehr bereite Öffnung aus. Im Gegensatz hierzu schlug Sjöstrand das „Septa-Model“ vor. Er interpretiert die Innenmembraneinstülpungen als Septen, die den Matrixraum komplett überspannen und beidseitig Verbindung zur IBM aufweisen. 1966 identifizierten Daems und Wisse die Verbindungen zwischen IBM und CM als enge tubuläre Strukturen, die „pediculi cristae“ (lat. Cristae-Füßchen) (Daems und Wisse, 1966). Mittels Elektronentomographie wurden die Ergebnisse von Daems und Wisse bestätigt und die Strukturen als Crista Junctions bezeichnet (Mannella et al., 1994; Perkins et al., 1997).

1.2.1 Crista Junctions

Der molekulare Aufbau von Crista Junctions ist immer noch weitgehend unklar. Neuere Veröffentlichungen geben aber erste Hinweise auf Proteine als Schlüsselfiguren. So wurde mit Mitofilin ein Protein in Säugerzellen identifiziert, das essentiell für die mitochondriale Ultrastruktur ist (John et al., 2005). Mitofilin ist ubiquitär vorhanden, doch beschränkt sich die Konservierung hauptsächlich auf die C-terminale Domäne (Rabl et al., 2009). Dies könnte auf funktionelle Relevanz dieser Domäne hindeuten.

John und Kollegen beschrieben Mitofilin als ein mitochondriales Innenmembranprotein, das den C-Terminus in den IMS präsentiert. Nach Herunterregulation dieses Proteins in HeLa-Zellen konnten keine Crista Junctions mehr beobachtet werden. Die somit entstandenen Crista-Vesikel waren stapelförmig angeordnet (John et al., 2005). Dieselbe Topologie und derselbe ultrastrukturelle Phänotyp konnte für das Hefehomolog, Fcj1 (Formation of Crista Junction protein 1), beobachtet werden. Quantitative Untersuchungen von elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Mitochondrien einer *FCJI*-Deletionsstammes ergaben die Abwesenheit von Crista Junctions. Interessanterweise konnte hier das Lumen der Crista-Vesikel als ICS identifiziert werden.

Weitere Anzeichen für den direkten Einfluss von Fcj1 auf Crista Junctions lieferte zum einen seine submitochondriale Lokalisation. Immuno-Elektronenmikroskopie (Immuno-EM) zeigte eine Anreicherung von Fcj1 an den CJ. Noch wesentlich überzeugendere Ergebnisse aber brachte Analyse der Auswirkung der Überexpression. Diese führte, im Gegensatz zur Deletion, zu einer höheren Anzahl von CJ und internen Verzweigungen der Cristae (Rabl et al., 2009).

Neben der veränderten mitochondrialen Architektur waren auch Auswirkungen auf das Zellwachstum zu beobachten. Herunterregulation von Mitofilin in HeLa-Zellen führte zu

verstärkter Apoptose und reduzierter Zellproliferation. Weiter war in diesen Zellen erhöhtes Membranpotential und erhöhte Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies zu beobachten. Dies war, im Gegensatz zur veränderten Ultrastruktur, aber erst nach wiederholter Transfektion mit siRNA zu beobachten. Somit liegt der Schluss auf einen sekundären Effekt nahe (John et al., 2005). Ähnliches konnte auch für Deletion von *FCJ1* beobachtet werden. Diese führte zu vermindertem Wachstum auf respiratorischem Medium (Rabl et al., 2009). Somit belegen diese Ergebnisse einen direkten Zusammenhang von mitochondrialer Architektur und Lebensfähigkeit der Zellen.

Die Organisation einer strukturell derart wichtigen Komponente in einem hochmolekularen Komplex liegt nahe. Diesbezüglich könnte die Präsenz von Mitofilin bzw. Fcj1 in Komplexen mit molekularen Massen von über einem Megadalton gezeigt werden. Zwar konnte für Fcj1 die Fähigkeit zur Bildung von Homooligomeren gezeigt werden, doch ist die genaue molekulare Zusammensetzung eines Mitofilin/Fcj1 enthaltenden Komplexes weiter unklar (John et al., 2005; Rabl et al., 2009).

1.2.2 Funktionen mitochondrialer Architektur

Ein Zusammenhang zwischen mitochondrialer Architektur und Zellvitalität wurde mehrfach dokumentiert (John et al., 2005; Rabl et al., 2009). So deuten die beschriebenen Phänotypen auf einen Einfluss der Architektur auf die Respirationseffizienz der Zellen hin.

Mitochondrien verschiedener Gewebe weisen extreme Unterschiede in ihrer Architektur auf (Fawcett, 1981)(Abbildung 1). Dies könnte mit unterschiedlichen metabolischen Prozessen in den Zellen dieser Gewebe zu erklären sein.

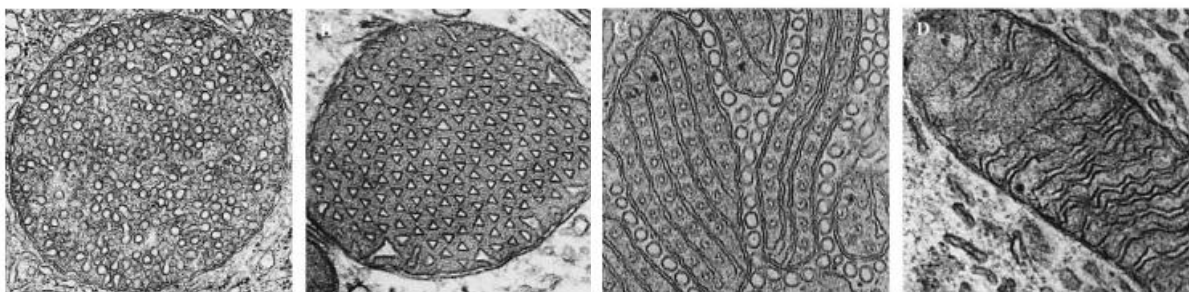


Abbildung 1. Vielseitigkeit mitochondrialer Architektur.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien verschiedener Gewebe. (A) Nierenkortex; (B) Astrocyt; (C) Pseudobranchus eines Fisches; (D) Ventrikulärer Herzmuskel. Aus Fawcett, 1981

Proteine der inneren mitochondrialen Membran sind nicht statistisch, sondern differenziert verteilt. So sind Proteine der Importmaschinerie TIM23 hauptsächlich in der IBM lokalisiert, Proteine der Atmungskette hingegen stark in der Cristamembran angereichert (Vogel et al., 2006; Wurm und Jakobs, 2006). Weiter indizieren die Ergebnisse von Vogel et al. eine hohe Dynamik der Verteilung der Proteine. In Wildtyp-Mitochondrien war nach diesen Befunden Tim23 in einem Verhältnis von 60:40 in IBM und CM verteilt. Bei Überexpression von GFP mit mitochondrialer Signalsequenz (mtGFP) und daher verstärkter Importaktivität war aufgrund von Umverteilung von Tim23 ein Verhältnis von 70:30 (IBM:CM) zu detektieren. Behandlung der Zellen mit Puromycin, einem Antibiotikum, das den Stopp der Proteinbiosynthese und die Ablösung der naszierenden Polypeptidketten bewirkt, hatte den gegenteiligen Effekt. Hier war eine nahezu ausgeglichene Verteilung von Tim23 zwischen IBM und CM zu beobachten. Weiter zeigte das Rieske-Protein, eine Untereinheit des Komplexes III der Atmungskette, in einem *Bcs1*-Deletionsstamm eine deutlich andere Verteilung als im Wildtyp. Diese Mutante ist defekt in der Assemblierung des Atmungskettenkomplexes III. Das Rieske-Protein, das im Wildtyp hauptsächlich in der CM zu finden war, war in der *Bcs1*-Deletionsmutante signifikant in die IBM umverteilt (Vogel et al., 2006). Dies deutet auf eine dynamische Verteilung von importierten Proteinen von der IBM zu deren Bestimmungsort in den Cristae hin. Somit könnten CJs eine Rolle in der Regulation der Distribution von Proteinen und Proteinkomplexen spielen.

Weiter wird eine Rolle der CJs als Diffusionsbarriere für Metabolite diskutiert. Die Verteilung von ADP zwischen IMS und ICS wurde mit Computersimulation analysiert. ADP konnte in dieser Simulation aufgrund der Struktur der CJ nicht ungehindert diffundieren. Somit könnte sich im Mitochondrium aufgrund der tubulären Struktur der CJs ein ADP-Gradient zwischen IMS und ICS einstellen. Regulation dieses Gradienten durch Änderung der CJ-Struktur könnte somit zur Steuerung des ADP/ATP-Antiporters und somit der ATP-Synthese genutzt werden (Mannella et al., 2001).

Die Funktion einer Diffusionsbarriere wird ebenfalls für eine andere Komponente der Mitochondrien diskutiert, dem Cytochrom *c*. Dieses Protein dient als Signalsubstanz zur Induktion der Caspase-abhängigen Apoptose. Bax/Bak induzierte Permeabilisierung der Außenmembran führt zur sehr schnellen Freisetzung des nahezu gesamten Cytochrom *c*-Pools der Mitochondrien (Goldstein et al., 2005; Goldstein et al., 2000). Dies ist überraschend, da lediglich 15% des Cytochrom *c* im IMS lokalisiert sind. Die restlichen 85% befinden sich im ICS (Bernardi und Azzone, 1981). Aufgrund der flaschenhalsähnlichen Struktur der CJs wäre zumindest eine verzögerte Ausschüttung des ICS-Pools zu erwarten. Eine Erklärung wurde in

einer Umstrukturierung der CJs gesehen. Unabhängig von der Induktion der Membranpermeabilisierung führt das Protein tBid zu einer Induktion der Reorganisation der Cristae. Dies drückt sich in einer deutlichen Erweiterung der Cristae-Öffnungen aus (Scorrano et al., 2002).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mitochondriale Architektur essentiell für deren Funktion ist. Nicht nur hinsichtlich der primären Aufgabe als Energieproduzent, sondern auch hinsichtlich des programmierten Zelltods. In wie fern weitere Prozesse, wie zum Beispiel Detoxifikation von reaktiven Sauerstoffspezies, unter Kontrolle der mitochondrialen Architektur stehen bleibt noch zu klären.

1.3 Mitochondriale Dynamik - Fusion und Teilung

Mitochondrien sind nicht, wie in den meisten Lehrbüchern dargestellt, viele einzelnen Organellen, sondern bilden in der Zelle ein stark verzweigtes tubuläres Netzwerk aus, welches bereits im Lichtmikroskop erkennbar ist. Die Gestalt dieses Netzwerkes wird als mitochondriale Morphologie bezeichnet. Das Ausmaß an Verzweigung ist abhängig von der Kohlenstoffquelle und nimmt in Bäckerhefe bei Wechsel von fermentierbarer zu nicht fermentierbarer Kohlenstoffquelle zu (Egner et al., 2002). Dieses Netzwerk wird durch ein Gleichgewicht von ständiger Fusion und Teilung aufrechterhalten. So führt Störung der Fusion zu Fragmentierung des Netzwerkes (Rapaport et al., 1998a). Dagegen führt Störung der Teilung zu Ausbildung von extrem stark verzweigten, netzartigen Strukturen (Mozdy et al., 2000)(Abbildung 2).

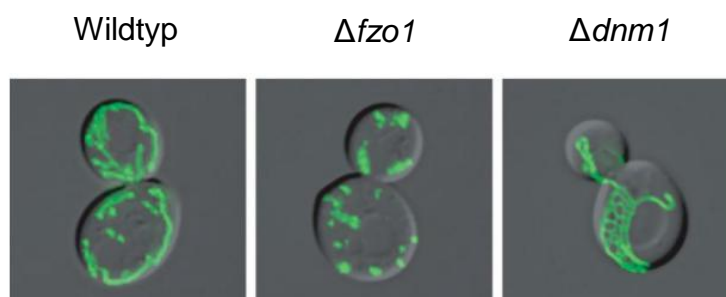


Abbildung 2. Mitochondriale Morphologie.

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines *S.cerevisiae* Wildtyp-Stammes, einer *Fzo1*- Deletionsmutante und einer *Dnm1*- Deletionsmutante. Als Fluoreszenzfarbstoff dient Matrix-dirigiertes GFP. Modifiziert nach Okamoto und Shaw, 2005.

Die physiologische Bedeutung der mitochondrialen Dynamik liegt unter anderem in Vererbung und Qualitätssicherung der mtDNA begründet (Nunnari et al., 1997). Da Mitochondrien nicht *de novo* entstehen können, wird das mitochondriale Netzwerk im Zuge der Zellteilung über mitochondriale Teilungs- und anschließende Fusionsprozesse an die Tochterzelle vererbt. Störungen der Fusions- und Teilungsprozesse führen zu Verlust der mitochondrialen DNA, was in Hefe zu Verlust der respiratorischen Kompetenz und in höheren Eukaryoten zum Tod der Zelle führt (Chen et al., 2010; Herlan et al., 2003; Hermann et al., 1998a; Jones und Fangman, 1992). Die Qualitätssicherung der mtDNA ist von zentraler Bedeutung, da Mitochondrien der Ort der oxidativen Phosphorylierung sind. Im letzten Schritt dieses Prozesses dient Sauerstoff als terminaler Elektronenakzeptor. Bei dieser Reduktion von Sauerstoff zu Wasser kommt es zur Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies (reactive oxygen species/ROS). Diese führen zu oxidativer Beschädigung der mtDNA. Nach dem derzeitig akzeptierten Modell wird durch Fusion und Teilung von Mitochondrien gewährleistet, dass geschädigte DNA durch unbeschädigte ersetzt wird (Detmer und Chan, 2007; Tatsuta und Langer, 2008).

In *S.cerevisiae* sind vier Proteine bekannt, die an der mitochondrialen Teilung beteiligt sind: Dnm1, Fis1, Mdv1 und Caf4. In Säugern sind bislang nur drei Proteine bekannt. Drp1 stellt das Homolog von Dnm1 und hFis1 das von Fis1 dar. Für das Säugerprotein Mff1 ist in Hefe noch kein Homolog bekannt, ebenso wie für die Hefepoteine Mdv1 und Caf4 keine homologen Proteine in Säugern bekannt ist. Das tatsächliche Effektorprotein der Teilung ist Dnm1/Drp1 (Kane und Youle, 2010). Diese Dynamin-ähnliche GTPase kann homooligomere Komplexe ausbilden (Fukushima et al., 2001). Dnm1 ist ein cytosolisches Protein. Jedoch konnte es auch auf der mitochondrialen Oberfläche exakt an den Stellen, an welchen die Teilung durch Einschnürung eingeleitet wird, detektiert werden (Bleazard et al., 1999). Der durch Dnm1 gebildete homooligomere Komplex wird in seiner Struktur durch die Bindung des jeweiligen Nukleotids determiniert. So bewirkt die Bindung von GDP die Bildung von nur leicht gekrümmten Filamenten, die Bindung von GTP aber die Ausbildung von spiralförmigen Strukturen. Bemerkenswerterweise stimmt der Durchmesser der gebildeten Spirale exakt mit dem Durchmesser der Teilungsstelle eines Mitochondriums überein (Ingerman et al., 2005). Die Abschnürung erfolgt wohl durch GTP-Hydrolyse, da Dnm1-Mutanten, die zwar GTP binden aber nicht hydrolysieren können, nicht funktional sind (Otsuga et al., 1998). Die Rekrutierung von Dnm1 erfolgt über das mitochondriale Außenmembranprotein Fis1 (Mozdy et al., 2000). Die Funktion von Caf4 und Mdv1 ist noch unklar. Im derzeitigen Modell wird diesen Proteinen Adapterfunktion zwischen Fis1 und

Dnm1 zugeschrieben (Griffin et al., 2005; Mozdy et al., 2000). Eine Komponente zur selektiven Abschnürung der Innenmembran konnte noch nicht identifiziert werden.

Bislang sind in *S.cerevisiae* drei Proteine bekannt, die für Fusion zuständig sind: Fzo1, Mgm1 und Ugo1. In Säugern konnten für Fzo1 die Mitofusine 1 und 2, für Mgm1 Opa1 als Homologe identifiziert werden. Für Ugo1 ist noch kein Homologes bekannt (Kane und Youle, 2010).

Die Fusion der Außenmembranen wird durch die Dynamin-ähnliche GTPase Fzo1 vermittelt. Die Hydrolyse von GTP ist essentiell für die Membranfusion; dies zeigt die inhibierende Wirkung von nicht hydrolysierbaren GTP-Varianten (Meeusen et al., 2004). Wie andere Dynamin-ähnliche Proteine kann Fzo1 Homooligomere bilden. Interessanterweise ist für Fusion nicht nur die Oligomerisation im selben Mitochondrium essentiell, sondern auch die Bildung von Fzo1-Oligomeren aus beiden fusionierenden Mitochondrien (Ishihara et al., 2004; Koshiba et al., 2004; Meeusen et al., 2004). Überdies interagiert Fzo1 mit dem mitochondrialen Außenmembranprotein Ugo1 (Sesaki et al., 2003). Auch Ugo1 ist essentiell für den Fusionsprozess, seine molekulare Funktion ist bislang allerdings noch unklar.

Für die Fusion der Innenmembran ist eine weitere Dynamin-ähnliche GTPase essentiell, Mgm1. Das Innenmembranprotein Mgm1 und das Säuger-Homolog Opa1 sind in der Zelle in mehreren Isoformen präsent. Die beiden in Hefe vorkommenden Isoformen, s-Mgm1 (short/kurz) und l-Mgm1 (long/lang), entstehen durch Prozessierung durch die Rhomboid-Protease Pcp1. Die prozessierte Form, s-Mgm1, verfügt zwar über kein Transmembransegment (TMS) mehr, ist allerdings membranassoziiert. Zum Erreichen der vollen Funktionalität ist ein 1:1 Verhältnis von s-Mgm1 zu l-Mgm1 erforderlich (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003).

Interessanterweise wird sowohl für die Fusion der Außenmembran, als auch der Innenmembran das Membranpotential der Innenmembran benötigt (Meeusen et al., 2004). Die Gründe dafür sind bislang noch unklar. Qualitätskontrolle wäre eine mögliche Erklärung. Sehr stark geschädigte Mitochondrien verlieren ihr Membranpotential. Diese können nicht mehr an der Fusion teilnehmen und werden möglicherweise der Mitophagie zugeführt (Hoppins und Nunnari, 2009).

Offensichtlich ist hohes Maß an Interaktion zwischen den beiden mitochondrialen Membranen Voraussetzung für den Fusionsprozess. Im Laufe dieses Prozesses erfolgt die Anbindung der Innenmembran an die Außenmembran durch Interaktion von Mgm1 mit dem Fzo1-Ugo1 Komplex in der Außenmembran (Sesaki und Jensen, 2004; Sesaki et al., 2003; Wong et al., 2003). Somit sind die Fusionsprozesse der Innenmembran und der

Außenmembran auch mechanistisch verbunden. Dies erklärt, warum Deletion des Innenmembranproteins Mgm1 zur Störung der Fusion und damit zur Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerkes führt (Meeusen et al., 2006). Da im Zuge der Fusion von Mitochondrien Proteine der Außenmembran und der Innenmembran miteinander interagieren, wird hier eine sogenannte Kontaktstelle ausgebildet. Diese Strukturen wurden erstmals 1966 von Hackenbrock beschrieben (Hackenbrock, 1966). Es ist allerdings Gegenstand aktueller Diskussion, ob diese Interaktion permanent stattfindet oder transientser Natur ist.

1.4 Kontaktstellen zwischen der Innenmembran und Außenmembran von Mitochondrien

1.4.1 Permanente Kontaktstellen

Nach Hackenbrock zeichnen sich die metabolischen Stadien (Chance und Williams, 1955), in welchen Mitochondrien vorliegen können, durch charakteristische Konformationen aus. Im Elektronenmikroskop wurde dies durch Kondensation des Matrixraumes bei gleichzeitiger Ablösung der IBM von der Außenmembran sichtbar. Die beiden Extremzustände beschreibt Hackenbrock als orthodoxen Zustand und kondensierten Zustand. Hierbei lässt sich die Überführung in den kondensierten Zustand durch Überschuss an ADP oder hypertones Milieu induzieren. Obwohl sich im kondensierten Zustand die IBM nahezu vollständig von der Außenmembran ablöst, bleibt der Kontakt an einigen Stellen erhalten (Abbildung 3). Diese Stellen der permanenten Interaktion der Außenmembran und IBM wurden als Contact Sites (Kontaktstellen/CS) bezeichnet (Hackenbrock, 1966, 1968a, b).

Permanente Kontaktstellen zeichnen sich durch ihre hohe Stabilität aus. So sind sie nicht nur in intakten Zellen zu beobachten, sondern auch in isolierten Mitochondrien. Bemerkenswerterweise überstehen sie zudem weitere Behandlungen. Nach Inkubation von Mitochondrien mit dem Detergenz Digitonin verbleiben Teile der Außenmembran an der Innenmembran (Brdiczka und Schumacher, 1976; Hackenbrock und Miller, 1975). Ähnliches konnte nach hypotonem Schwellen, das ein Zerreißen der Außenmembran nach sich zieht, beobachtet werden (Brdiczka et al., 1974; van der Klei et al., 1994; Werner und Neupert, 1972).

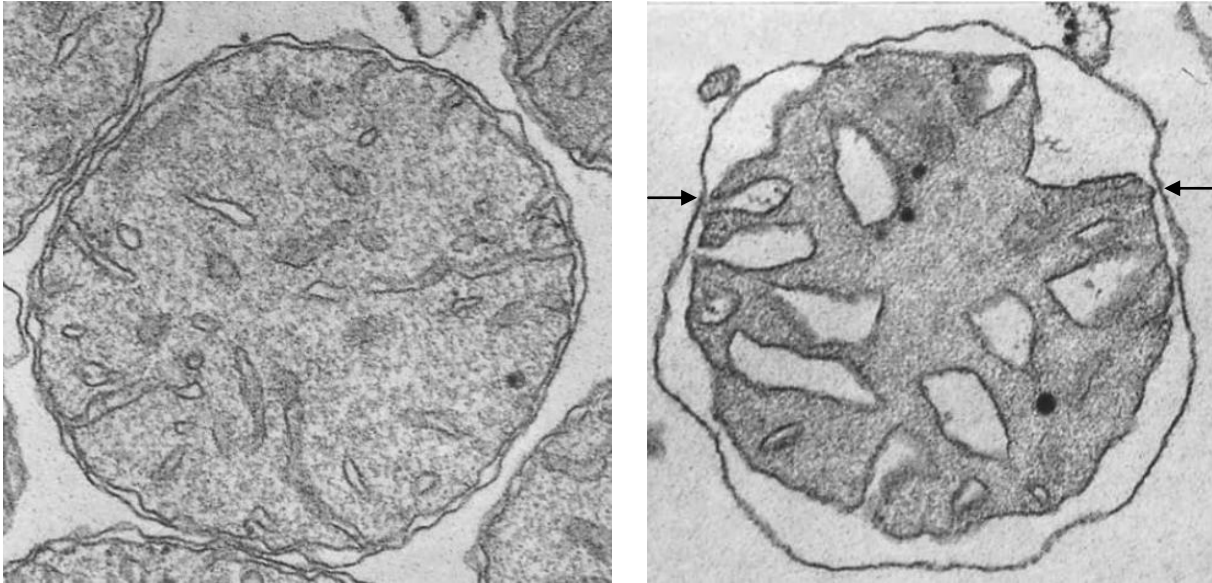


Abbildung 3. Überführung von Mitochondrien in den kondensierten Zustand führt zu großflächiger aber nicht vollständiger Ablösung der IBM von der Außenmembran.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Rattenleber-Mitochondrien im orthodoxen Zustand (links) und im kondensierten Zustand (rechts). Pfeile, Kontaktstellen. Modifiziert nach Hackenbrock, 1968.

Es wurde mehrmals versucht, diese außerordentliche Stabilität von Kontaktstellen zu ihrer Isolierung auszunutzen. Hierbei wurden Mitochondrien zunächst osmotisch oder mit Ultraschall behandelt und die so generierten Vesikel über einen Saccharosegradienten aufgetrennt (Lithgow et al., 1991; Ohlendieck et al., 1986; Pon et al., 1989). In jeder dieser Studien konnten Außenmembran und Innenmembran in den Fraktionen niedriger bzw. hoher Dichte angereichert werden. In Fraktionen intermediäre Dichte waren stets beide Arten von Membranen zu detektieren. Bemerkenswerterweise ist ein im TIM23-TOM-Superkomplex arretiertes Vorstufenprotein ebenfalls dort lokalisiert (Pon et al., 1989). Ein arretiertes Vorstufenprotein überspannt beide Membranen und sollte sich demnach wie ein Protein einer permanenten Kontaktstelle verhalten. Im Zuge dieser Untersuchungen konnten Hexokinase (Ohlendieck et al., 1986), CSP-1 und CSP-2 (Perkins et al., 1997) und GBP52 (Lithgow et al., 1991) identifiziert werden. CSP-1, CSP-2 und GBP52 sind lediglich in Grundzügen untersucht. Die Analyse von CSP-1 und CSP-2 beschränkt sich auf die molekularen Größen von 100 bzw. 64 kDa und die Bestätigung der mitochondrialen Lokalisation. GBP52 wird als GTP-bindendes Protein der Größe 52 kDa beschrieben.

Als mögliche Kontaktstelle wurde ein Komplex aus dem Adeninnukleotid-Transporter (ANT) und dem spannungsabhängigen Anionenkanal (VDAC/voltage-dependent anion channel/Porin) vorgeschlagen. Beutner und Kollegen konnten aus Rattenhirn-Zellextrakt zwei unabhängig voneinander existierende Komplexe isolieren. Zum einen ein Komplex bestehend

aus ANT, VDAC und cytosolischer Hexokinase. Zum anderen eine Komplex bestehend aus ANT, der mitochondrialen Kreatinkinase (mtCK) und VDAC (Beutner et al., 1996). *In vitro* konnte die postulierte Interaktion unter Verwendung von octamerem mtCK gezeigt werden (Rojo et al., 1991). Dies konnte in transgenen Mäusen, die mtCK in der Leber exprimierten, auch *in vivo* belegt werden. MtCK wird in Wildtyp-Mäusen nicht in der Leber exprimiert. Mitochondrien der Mutante zeigten, gegenüber den Wildtyp-Mitochondrien, höhere Resistenz gegen Detergenzien. Dies wurde auf ein dreifach höheres Vorkommen von Kontaktstellen zurückgeführt (Speer et al., 2005). Dieses Ergebnis ist in zweierlei Hinsicht interessant. Erstens kann es als Hinweis auf die Ausbildung permanenter Kontaktstellen gesehen werden. Zweitens wurden auch in Wildtyp-Mitochondrien, in welchen keine mtCK exprimiert wird, Kontaktstellen detektiert (Speer et al., 2005). Dies lässt darauf schließen, dass neben den ANT-mtCK-VDAC-Kontaktstellen noch weitere Kontaktstellen ausgebildet werden.

Ob diese Interaktion *in vivo* permanent stattfindet wird bislang noch diskutiert. Die Interaktion könnte auch im Fall des Metabolit-Transports transient ausgebildet werden. Die hier angesprochenen Studien wurden mit Gehirn- und Leber-Gewebe durchgeführt. Hier könnte die Transportaktivität derartig hoch sein, dass eine permanente Kontaktstelle initiiert wird. In einer kürzlich veröffentlichten Studie zumindest konnte VDAC nicht mit ANT co-präzipitiert werden (Claypool et al., 2008).

Als ein weiterer Kandidat für ein Kontaktstellenprotein wird Fzo1 beschrieben. Analyse von submitochondrialen Vesikeln zeigte Anreicherung in Fraktionen intermediärer Dichte (Hermann et al., 1998b) bzw. Co-Migration mit Innenmembranproteinen (Fritz et al., 2001). Dies beruht auf einer Protein-Protein-Interaktion, wie Fritz und Kollegen zeigten. Als Interaktionsdomäne von Fzo1 wurde der IMS-Teil zwischen den beiden Transmembrandomänen identifiziert. Spätere Studien identifizierten Mgm1 als Interaktionspartner in der Innenmembran (Sesaki et al., 2003; Wong et al., 2003). Die Interaktion mit Mgm1 ist essentiell für die Funktion von Fzo1. Eine Fzo1-Mutante, die ein Insert in der Interaktionsdomäne trug, konnte weder den Wachstumsphänotyp vollständig komplementieren, noch Fusion induzieren (Fritz et al., 2001). Da die beobachtete Co-Reinigung allerdings sehr ineffizient war, wurde anstelle einer permanenten, stabilen Kontaktstelle eine entweder sehr labile, oder transiente Interaktion vorgeschlagen. Diese wird von Ugo1 stabilisiert. Über diesen Komplex soll nach derzeitigem Arbeitsmodell die Fusion der Innen- und Außenmembranen vermittelt und koordiniert werden (Sesaki und Jensen, 2004; Sesaki et al., 2003; Wong et al., 2003).

Weiter wurde ein Zusammenhang zwischen Kontaktstellen und Crista Junctions diskutiert, doch konnte mittels Elektronentomographie keine Co-Lokalisation festgestellt werden (Nicastro et al., 2000; Perkins et al., 1997).

Trotz alledem bleiben die Fragen nach Funktion und molekularer Zusammensetzung von Kontaktstellen bislang weitgehend ungeklärt.

1.4.2 Transiente Kontaktstellen

1.4.2.1 Die Translokase der mitochondrialen Außenmembran – Der TOM-Komplex

Der Import von Proteinvorstufen in Mitochondrien ist essentiell für deren Funktionalität. Über 99% der mitochondrialen Proteine sind chromosomal kodiert. Sie werden im Cytosol synthetisiert und müssen daher erst an ihren Bestimmungsort gelangen. Der TOM-Komplex (Translocase of the outer mitochondrial membrane/Translokase der mitochondrialen Außenmembran) stellt die Haupttranslokase der mitochondrialen Außenmembran dar. Dieser Komplex besteht aus den Kernkomponenten Tom40 und Tom22. Dem β -Barrel-Protein Tom40 wird die Bildung des Protein-transportierenden Kanals zugeschrieben (Ahting et al., 2001; Hill et al., 1998; Stan et al., 2000). Jeder TOM-Komplex besteht aus zwei bis drei Poren mit einem Durchmesser von je 20Å (Kunkele et al., 1998). Die tatsächliche Architektur der Pore ist aber bislang unklar. Tom22 scheint zwei Funktionen zu erfüllen. Zum einen trägt es maßgeblich zur Integrität des Komplexes bei. Zum anderen dient es als Rezeptor für zu importierende Vorstufenproteine (van Wilpe et al., 1999). Tom22 ist zusammen mit Tom20 vor allem für die Erkennung von Vorstufenproteinen mit N-terminaler, positiv geladener Signalsequenz und von Proteinen mit interner Signalsequenz verantwortlich. Eine solche Sequenz ist vor allem in Matrixproteinen und Proteinen der Innenmembran aber auch in β -Barrel-Proteinen der Außenmembran zu finden (Abe et al., 2000; Mayer et al., 1995; Saitoh et al., 2007; Schleiff et al., 1999; Yamano et al., 2008). Das dritte Rezeptorprotein, Tom70, hingegen ist hauptsächlich für die Erkennung von polytopischen Innenmembranproteinen, sog. Carrier-Protein, zuständig (Brix et al., 1999; Schlossmann et al., 1994). Weiter beinhaltet der TOM-Komplex die Untereinheiten Tom5, Tom6 und Tom7. Die genaue Funktion dieser Komponenten wird noch diskutiert. Sie spielen aber mit Sicherheit eine wichtige Rolle in der Assemblierung und Aufrechterhaltung der Stabilität des Komplexes (Alconada et al., 1995; Dembowski et al., 2001; Schmitt et al., 2005; Sherman et al., 2005; Wiedemann et al., 2003).

1.4.2.2 Proteinimportwege

Annähernd alle mitochondrialen Proteine passieren während der Translokation den Kanal des TOM-Komplexes (Endo et al., 2003; Koehler, 2004; Neupert und Herrmann, 2007; Rehling et al., 2004). Allerdings sind unter den Außenmembranproteinen mittlerweile einige Ausnahmen bekannt. Zu diesen gehören Mcr1 und Fis1, die ihr TMS direkt am N- bzw. C-Terminus tragen (Kemper et al., 2008; Meineke et al., 2008). Interessanterweise scheint auch Ugo1 keinen TOM-Kanal zur Membranintegration zu benötigen (Pacic et al., 2011). Dies ist überraschend, da dieses Protein mehrmals die Außenmembran überspannt. Der Importweg von Außenmembranproteinen, die ein internes α -helikales TMS besitzen, ist bislang noch nicht geklärt. β -Barrel-Proteine stellen die fünfte Klasse der Außenmembranproteine dar. Diese werden, laut dem derzeitigen Arbeitsmodell, nach Passage des TOM-Kanals von zwei hexameren Komplexen (Tim9-Tim10 und Tim8-Tim13) zum TOB-Komplex (Topogenesis of β -barrel proteins) geführt (Hoppins und Nargang, 2004; Wiedemann et al., 2004). Die Maturation und Insertion der β -Barrel-Proteine wird vom TOB-Komplex durchgeführt (Paschen et al., 2003).

Der Großteil der IMS-Proteine wird über das Mia40-Erv1-System importiert. Dessen Substrate sind durch CX₃C- oder CX₉C-Motive gekennzeichnet. In der reifen Form liegen diese als Disulfidbrücken in oxidiert Form vor. Zur Passage der TOM-Pore müssen diese Cystein-Reste allerdings reduziert sein. Dies wird wahrscheinlich durch Bindung von Zink-Ionen sichergestellt. Zur Reifung im IMS werden zunächst, wohl mit Hilfe von Hot13 oder Mia40 selbst, die Zink-Ionen entfernt. Anschließend erfolgt die Erkennung der Cystein-Motive durch Mia40 und Bindung der Vorstufenproteine unter Bildung eines Substrat-Mia40-Intermediats über Sulfhydrylbrücken (Mesecke et al., 2005; Milenkovic et al., 2007; Sideris und Tokatlidis, 2007). Nach Oxidation des Substrats erfolgt die Freisetzung des maturierten Proteins (Grumbt et al., 2007; Muller et al., 2008). Im Anschluss wird die oxidierte Form von Mia40 über Erv1 regeneriert. Erv1 selbst wird wiederum durch Komponenten der Atmungskette regeneriert (Allen et al., 2005; Bihlmaier et al., 2007).

Die Insertion von polytopischen Proteinen in die mitochondriale Innenmembran wird über den TIM22-Komplex (Translocase of the inner mitochondrial membrane/Translokase der mitochondrialen Innenmembran) bewerkstelligt (Sirrenberg et al., 1996). Die für den Transport benötigte Energie wird über das Membranpotential der Innenmembran bereitgestellt. Der Komplex besteht neben der Hauptkomponente Tim22 aus Tim18 und Tim54 (Kerscher et al., 1997; Kerscher et al., 2000; Koehler et al., 2000). Tim22 bildet hierbei den Protein-transportierenden Kanal. Die genaue Funktion von Tim18 und Tim54 ist

bislang noch unklar. Die Substrate werden mit Hilfe einer Subpopulation des Tim9-Tim10 Komplexes zum TIM22-Komplex transportiert. Als weitere hierfür essentielle Komponente konnte Tim12 identifiziert werden (Gebert et al., 2008; Koehler et al., 1998a; Koehler et al., 1998b; Lionaki et al., 2008; Sirrenberg et al., 1998).

Der Import von Proteinen in die Innenmembran und über sie hinweg in die Matrix wird vom TIM23-Komplex vermittelt. Dieser Komplex besteht zum einen aus einem membranständigen Teil, der sich aus den Komponenten Tim23, Tim17, Tim50, Tim21 und Pam17 zusammensetzt. Tim23 und Tim17 bilden hierbei mit ihren je vier TMS den Proteintransportierenden Kanal (Martinez-Caballero et al., 2007; Meier et al., 2005; Truscott et al., 2001). Demnach sind beide Proteine Substrate des TOM-TIM22-Importweges (Kaldi et al., 1998). Tim50 hingegen dient als Rezeptor für die ankommenden Substrate, die charakteristische N-terminale, positiv geladene Signalsequenzen aufweisen (Mokranjac et al., 2003). Überdies konnte eine regulatorische Funktion von Tim50 auf den Kanal gezeigt werden (Meinecke et al., 2006). Weist das ankommende Substrat nach dem Signalpeptid eine Stopp-Transfer-Sequenz auf, erfolgt eine laterale Freisetzung des Proteins in die Innenmembran. Ist keine derartige Sequenz vorhanden, erfolgt der Transport in die Matrix (van Loon et al., 1986). An der Sortierung in das entsprechende Subkompartiment sind die beiden Komponenten Tim21 und Pam17 beteiligt (Mokranjac et al., 2005; Popov-Celeketic et al., 2008a). Für beide Arten des Transports benötigt dieser Komplex neben dem Membranpotential ATP als Energiequelle. ATP wird hierbei durch die Motor-Komponente des TIM23-Komplexes hydrolysiert. Die Motorkomponente ist ebenfalls ein Heterooligomer, das allerdings nicht in die Membran eingebettet ist, sondern von der Matrixseite her an den Komplex gebunden ist (Mokranjac et al., 2007). Während der Proteintranslokation interagiert Tim23 mit dem TOM-Komplex und bildet somit eine transiente Kontaktstelle zwischen Innen- und Außenmembran aus (Berthold et al., 1995; Dekker et al., 1997; Schleyer und Neupert, 1985; Schwaiger et al., 1987). An dieser Stelle ist hervorzuheben, dass Tim23 seine N-terminale Domäne in Außenmembran inserieren kann und in Cytosol exponiert (Donzeau et al., 2000). Dies geschieht in Abhängigkeit der Translokaseaktivität des TIM23-Komplexes (Popov-Celeketic et al., 2008a).

1.4.3 Unterscheidung von permanenten und transienten Kontaktstellen

Permanente Kontaktstellen sind äußerst stabil und im Elektronenmikroskop ohne weitere Behandlung der Mitochondrien sichtbar. Der TIM23-TOM-Superkomplex stellt im Gegensatz dazu eine transiente Kontaktstelle dar. Zwar kann diese im EM nachgewiesen werden, doch ist dies erst nach Antikörperbindung an ein zu importierendes Substrat, oder Arrest des Substrats durch Fusion mit einer fest gefalteten Domäne möglich (Schleyer und Neupert, 1985; Schwaiger et al., 1987). Auch ist die Co-Reinigung von TOM-Komponenten über TIM23-Komponenten (Berthold et al., 1995) oder die Detektion des Superkomplexes mittels Blau-Nativ-PAGE nur mit arretiertem Vorstufenprotein möglich (Dekker et al., 1997). Somit unterscheiden sich permanente und transiente Kontaktstellen deutlich in ihrer Dynamik. Diese Eigenschaft könnte es ermöglichen, permanente Kontaktstellen selektiv anzureichern. Wenn IBM und Außenmembran durch hypertones Schrumpfen getrennt werden, sollten permanente Kontaktstellen lateral aufeinander zu wandern und somit an einigen, wenigen Stellen akkumulieren.

1.5 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war es den molekularen Aufbau von permanenten Kontaktstellen zwischen der inneren und der äußeren mitochondrialen Membran im Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* zu analysieren.

Derartig stabile Elemente sollten entscheidend für die molekulare Architektur und somit auch für die Funktionalität von Mitochondrien sein. Dementsprechend zeigt sich auch die Relevanz dieser Strukturen für den gesamten Organismus. Dies weist auf das zweite Ziel dieser Arbeit hin. Nach Identifikation der molekularen Bestandteile der Kontaktstellen, sollten diese in ihrer Funktion analysiert werden.

Wie oben erklärt, ist der Aufbau von Kontaktstellen bislang immer noch unklar. Den vorliegenden Ergebnissen zufolge könnten Protein-Protein-Interaktionen eine maßgebliche Rolle in der Ausbildung dieser Strukturen spielen (Beutner et al., 1996; Fritz et al., 2001; Sesaki et al., 2003; Wong et al., 2003). Die Präsenz lediglich eines Proteins, das direkt mit den beiden mitochondrialen Membranen interagiert, ist allerdings nicht auszuschließen. Vorstellbar wäre auch die Interaktion von Membranproteinen mit der gegenüberliegenden Membran, ermöglicht durch co- oder posttranslationale Modifikation, z.B. Myristoylierung oder Palmitoylierung handeln. Die Kontaktstelle würde somit über die Transmembrandomäne und den Lipidanker eines Proteins vermittelt. Eine weitere Möglichkeit wäre das Vorhandensein von zwei Transmembransegmenten in einem Protein, lokalisiert in den beiden Membranen. Hierbei könnte es sich, neben einem α -helikalen Transmembransegment, auch um β -Faltblattelemente handeln, die bislang nicht als mögliche Transmembransegmente erkannt wurden. Letzteres wurde für das Protein Tim23 in Hefe vermutet. Dieses essentielle mitochondriale Innenmembranprotein kann seine N-terminale Domäne reversibel im Cytosol präsentieren, ohne ein α -helikales Transmembransegment zu besitzen (Donzeau et al., 2000; Popov-Celeketic et al., 2008a). Durch Fusion mit einer fest gefalteten Domäne, wie GFP, kann diese Topologie fixiert werden (Vogel et al., 2006). Zum einen kann dieses Fusionsprotein als Markerprotein für die oben angesprochene Analyse dienen, da somit eine permanente Kontaktstelle geschaffen wird. Zum anderen stellt sich die Frage: befindet sich die Chimäre in der TOM-Pore, oder wird sie lateral aus dem Kanal entlassen? Dies würde einen neuen Weg der Insertion in die mitochondriale Außenmembran darstellen. Die Beantwortung dieser Frage stellte ein drittes Ziel der hier vorgelegten Arbeit dar.

2 Ergebnisse

2.1 Etablierung eines Markerproteins zur Identifizierung von Kontaktstellen der mitochondrialen Außen- und Innenmembran

In der Absicht ein Markerprotein zur Verfügung zu haben, das permanent beide mitochondrialen Membranen durchspannt, wurde ein Fusionsprotein aus GFP und Tim23 gewählt. Das Innenmembranprotein Tim23 ist eine essentielle Komponente des TIM23-Komplexes, der Haupttranslokase der mitochondrialen Innenmembran. Tim23 ist mit vier α -helikalen Transmembransegmenten (TMS) in der Innenmembran verankert (Kubrich et al., 1994) und exponiert, v.a. während des Proteinimports, seine N-terminale Domäne ins Cytosol (Donzeau et al., 2000; Popov-Celeketic et al., 2008a). N-terminale Fusion von GFP an Tim23 bewirkt eine permanente Verankerung in der Außenmembran (Vogel et al., 2006). Diese Verankerung führt zu einer Veränderung der submitochondrialen Lokalisation. Tim23 ist zwischen innerer Grenzmembran (inner boundary membrane, IBM) und Cristamembran (CM) in einem Verhältnis von 60% zu 40% verteilt. GFP-Tim23 hingegen ist zu nahezu 100% in der IBM, in der sich ebenfalls die Kontaktstellenproteine präferiert aufhalten sollten, lokalisiert. Aufgrund dieser besonderen Topologie und submitochondrialen Lokalisation ist das Fusionsprotein ideal als Marker für Kontaktstellenproteine enthaltende submitochondriale Vesikel geeignet.

2.2 Die Lokalisation der GFP-Domäne des Fusionsproteins GFP-Tim23

Zu Beginn diese Arbeit sollten die früheren Ergebnisse verifiziert werden. Hierzu wurde GFP-Tim23 in einem *S.cerevisiae* TIM23-Deletionsstamm unter Kontrolle des endogenen Tim23-Promotors exprimiert. Dekoration von unbehandelten Mitochondrien mit α -Tim23 zeigt eine Bande mit einer apparenten molekularen Masse von 55 kDa nicht aber von 27 kDa, was die erfolgreiche Deletion des Wildtyp-Gens belegt (Abbildung 4). Durch Behandlung intakter Mitochondrien mit Proteinase K (PK) wurde nur etwa die Hälfte des GFP-Tim23 gespalten. Neben GFP-Tim23 wurden drei Fragmente mit den apparenten Molekularmassen von 27, 23 und 13 kDa durch Immunodekoration mit einem Antikörper gegen den C-Terminus von Tim23 detektiert. Diese Banden entsprechen Tim23 voller Länge, Tim23, bei dem die ersten 20 Aminosäuren abgebaut wurden (Δ 20Tim23) (Donzeau et al., 2000) und

dem, durch die Innenmembran geschützten, Membrananker von Tim23. Der Abbau von Tim23 bis zur Innenmembrandomäne in unbehandelten Mitochondrien erklärt sich durch die teilweise Öffnung der Außenmembran als Folge der Isolierungsprozedur. Nach Öffnung der Außenmembran mittels hypotonem Schwellen der Mitochondrien (Mitoplasten) wurde das Fusionsprotein effizient abgebaut. Die resultierende Bande entspricht wiederum der durch die Innenmembran geschützten Domäne. Dieses membranintegrale Fragment konnte erst durch Lyse der Membranen mit dem Detergens TritonX-100 (TX-100) zugänglich für PK gemacht werden. Dies zeigte, dass zwar das Fusionsprotein durch PK abbaubar ist, jedoch die GFP Domäne nicht die erwartete cytosolische Lokalisation aufweist. Vielmehr ergab dieses Experiment, dass sich ca. 50% der GFP-Tim23 Population im Intermembranraum (intermembrane space, IMS) befinden. Immundekoration von Proteinen der verschiedenen mitochondrialen Kompartimente mit spezifischen Antikörpern belegte die erfolgreiche Durchführung des Experiments.

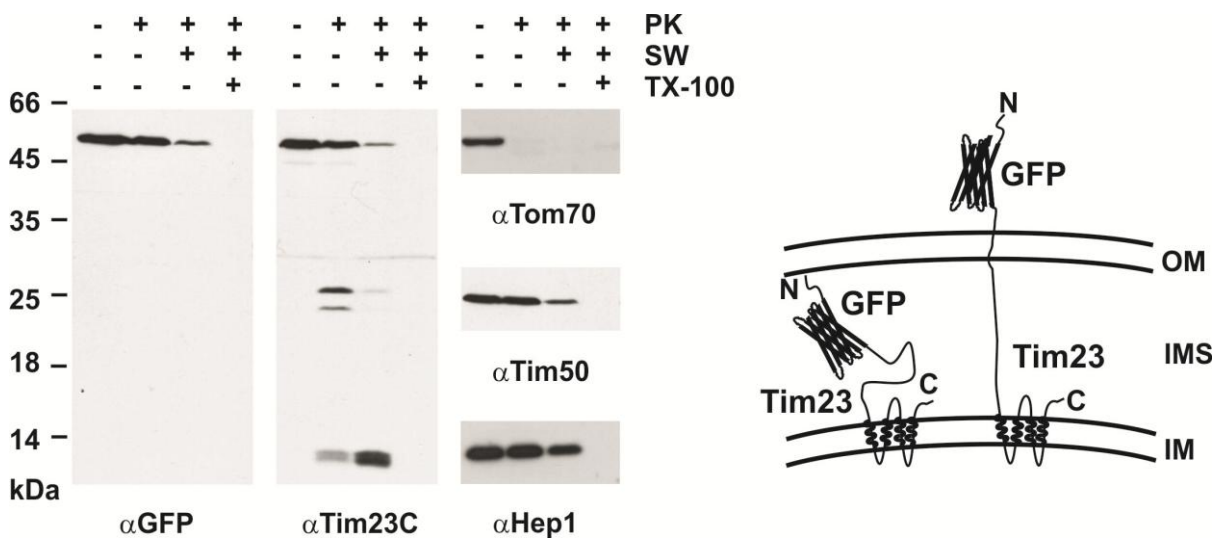


Abbildung 4. Expression von GFP-Tim23 bei 30°C auf glucosehaltigem YP-Medium führt zum Teil zu cytosolischer Lokalisation der GFP-Domäne, zum Teil zu Lokalisation im IMS.

Linker Teil: Der Stamm W303ΔTim23 pRS315-GFP-Tim23 unter Kontrolle des endogenen Tim23-Promotors wurde auf YP-Medium mit 2% Glucose (YPD) bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 kultiviert. Isolierte Mitochondrien wurden entweder unbehandelt belassen oder intakt, als Mitoplasten oder mit TritonX-100 lysiert mit PK behandelt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblotting. PK, Proteinase K; SW, geschwollene Mitochondrien; TX-100, TritonX-100; α, Antikörper gegen die entsprechenden Proteine; rechter Teil: OM, mitochondriale Außenmembran; IMS, Intermembranraum; IM, mitochondriale Innenmembran; N, N-Terminus des Fusionsproteins; C, C-Terminus des Fusionsproteins

Dieses Ergebnis entsprach nicht den früheren Beobachtungen und somit stellte sich die Frage nach möglichen Ursachen. Unter anderem wurden Wachstumsbedingungen wie Temperatur und Kohlenstoffquelle untersucht.

Abbildung 5A zeigt den starken Einfluss der Wachstumstemperatur auf die Lokalisation des Fusionsproteins. In Mitochondrien aus Zellen, die bei 24°C (GFP-Tim23:24°C) wuchsen, konnte die GFP-Domäne durch PK annähernd komplett abgespalten werden. Das anfänglich bei Inkubation mit PK für eine Minute entstehende Tim23 Volllängenfragment wurde bei zunehmender Inkubationszeit weiter zu einem Fragment abgebaut, das $\Delta 20$ Tim23 entspricht. Im Gegensatz dazu wurde in Mitochondrien aus Zellen, die bei 37°C (GFP-Tim23:37°C) kultiviert wurden, kein Abbau durch PK detektiert. Bei 30°C wiederum (vgl. Abb. 1) wurde eine intermediäre Situation beobachtet. Dieser Effekt wurde durch respiratorische Kohlenstoffquellen, hier Lactat, noch verstärkt (Abbildung 5B).

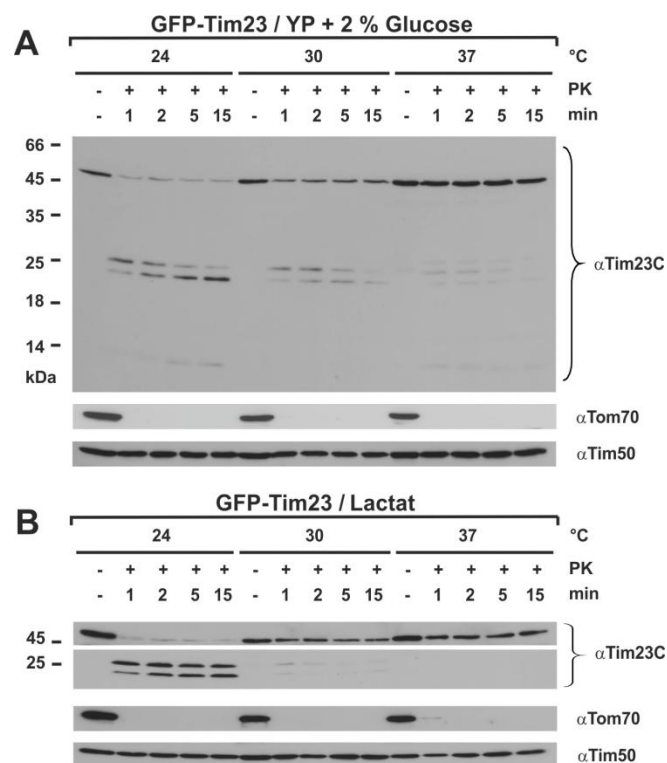


Abbildung 5. Die Lokalisation der GFP-Domäne von GFP-Tim23 ist abhängig von den Wachstumsbedingungen.

Der Stamm W303 GFP-Tim23 wurde auf YP-Medium mit 2 % Glucose (A) und auf Lactat-Medium (B) bei den angegebenen Temperaturen von 24°C, 30°C und 37°C kultiviert. Die Mitochondrien wurden isoliert, wie beschrieben behandelt und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. PK, Proteinase K; α , Antikörper gegen die entsprechenden Proteine

Neben der Lokalisation im IMS könnte der Schutz vor Proteolyse auch auf Aggregation an der Oberfläche der Mitochondrien zurück zu führen sein. Um dies auszuschließen wurden intakte GFP-Tim23:37°C enthaltende Mitochondrien, Mitoplasten und mit TX-100 lysierte Mitochondrien mit PK behandelt (Abbildung 6). Hier zeigte sich deutlich, dass auch GFP-Tim23:37°C in Mitoplasten und lysierten Mitochondrien effizient durch PK abgebaut werden kann, nicht aber in intakten Mitochondrien. Die bei beiden Arten von intakten, mit PK behandelten Mitochondrien entstehenden Fragmente der molekularen Masse von 13 kDa sind wiederum durch eine teilweise Öffnung der Außenmembran zu erklären. Der ineffiziente Abbau in Mitochondrien aus Zellen, die auf glucosehaltigem Medium gewachsen waren und hypotonem Puffer ausgesetzt wurden, liegt an der mangelnden Schwellfähigkeit. Dies wird durch den nur geringfügigen Abbau des IMS-Proteins Tim50 belegt.

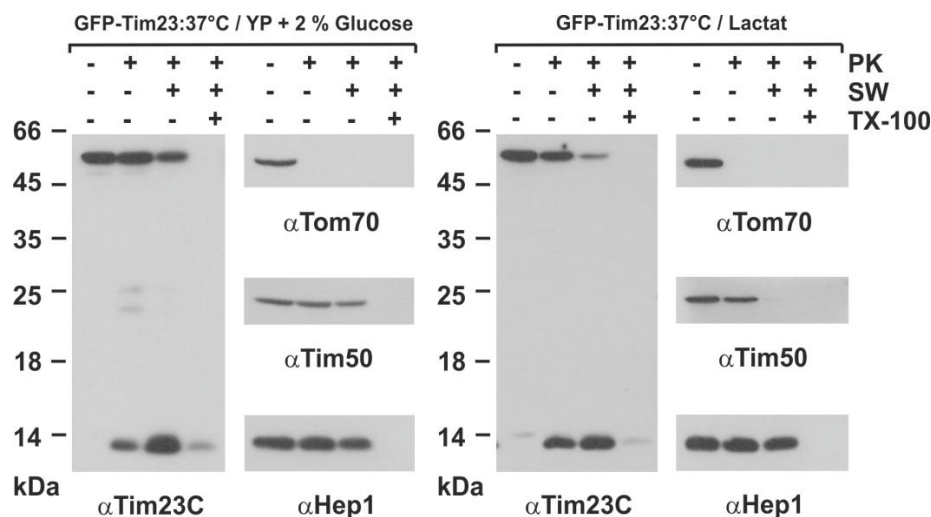


Abbildung 6. PK-Unzugänglichkeit der GFP-Domäne in Mitochondrien, die GFP-Tim23:37°C beinhalten, beruht auf der Lokalisation im IMS und nicht auf Aggregation.

Die gleichen Mitochondrien wie in Abb. 5A und B wurden wie beschrieben behandelt und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert. PK, Proteinase K; SW, geschwollene Mitochondrien; TX-100, TritonX-100; α , Antikörper gegen die entsprechenden Proteine.

Ist die temperaturabhängige Lokalisation des N-Terminus von GFP-Tim23 bedingt durch die GFP-Fusion oder eine intrinsische Eigenschaft von Tim23 selbst? Um dies zu testen wurden Wildtyp-Mitochondrien aus Zellen, die entweder in glucose- oder lactathaltigem Medium bei 24, 30 und 37°C angezogen worden waren, mit PK behandelt. Wie in Abbildung 7 zu sehen ist, besteht kein Zusammenhang zwischen den Wachstumsbedingungen und der Topologie von Tim23. Es konnten in allen Fällen lediglich geringe Mengen von Tim23 N-terminal gespalten werden. Die hier detektierbaren Unterschiede hinsichtlich der Tim23-Population mit spaltbarem N-Terminus, korrelierten weder mit den verschiedenen

Wachstumstemperaturen noch mit den unterschiedlichen Zusammensetzungen der Wachstumsmedien.

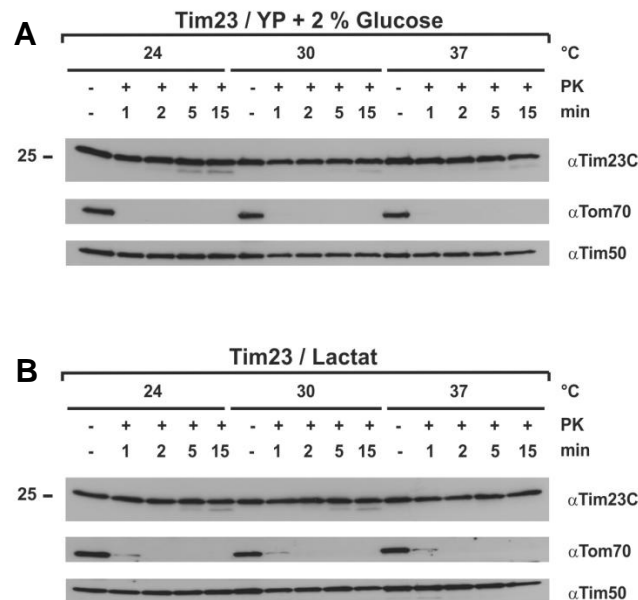


Abbildung 7. Die Lokalisation des N-Terminus von Wildtyp-Tim23 ist unabhängig von den Wachstumsbedingungen. Der Stamm W303-Wildtyp wurde auf YP-Medium mit 2 % Glucose (A) und auf Lactat-Medium (B) bei den angegebenen Temperaturen von 24°C, 30°C und 37°C kultiviert. Mitochondrien wurden isoliert und parallel mit den in Abb. 5 dargestellten Mitochondrien behandelt. PK, Proteinase K; α , Antikörper gegen die entsprechenden Proteine.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Topologie der GFP-Untereinheit von GFP-Tim23 stark von den Wachstumsbedingungen Temperatur und Kohlenstoffquelle abhängt. Da dies bei Wildtyp-Tim23 nicht der Fall ist, ist diese Eigenschaft auf den GFP-Teil des Fusionsproteins zurück zu führen. Diese Ergebnisse zeigen zum einen, dass GFP-Tim23, sofern die Zellen auf 24°C kultiviert werden, als Marker für Kontaktstellenproteine enthaltende Vesikel dienen kann. Zum anderen werden einige interessante Fragen aufgeworfen. Sind die Komplexe TOM und TIM23 hinsichtlich ihrer Translokationsfunktion noch gänzlich arbeitsfähig? Falls dem so ist, könnte hiermit ein erster Beweis für die Möglichkeit eines lateralen Freisetzens von Vorläuferproteinen aus der TOM-Pore erbracht werden?

Um diese Fragen zu klären sollte im Folgenden die Funktionsfähigkeit der mitochondrialen Proteintranslokasen untersucht werden.

2.2.1 Topologie von GFP-Tim23 bestimmt die Lebensfähigkeit der Zellen

Wie oben klar gezeigt wurde, ist die GFP-Domäne von GFP-Tim23:24°C cytosolisch lokalisiert. Tim23 wird als polytopisches Innenmembranprotein über den TOM-TIM22-Weg importiert. Demzufolge müssen die Fusionsproteine die TOM-Pore passieren. Daher ergeben sich zwei Möglichkeiten der Durchspannung der mitochondrialen Außenmembran. Erstens, GFP-Tim23:24°C hat die TOM-Pore verlassen und befindet sich in der Lipidumgebung der Außenmembran. Zweitens, GFP-Tim23:24°C befindet sich noch immer im TOM-Kanal. Im letzteren Fall wäre eine Blockade des Kanals die Folge. Dies könnte sich in einer Beeinträchtigung des Wachstums ausdrücken.

Der Wachstumsphänotyp von Zellen, die GFP-Tim23 entweder unter Kontrolle des endogenen Tim23 oder des starken Triosephosphatisomerase (TPI)-Promotors exprimieren, wurde im Vergleich zu Wildtyp-Zellen getestet. Die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit wurde bei 24, 30 und 37°C sowohl auf Agarplatten als auch in Flüssigmedium durchgeführt (Abbildung 8). Auf Agarplatten zeigten GFP-Tim23 exprimierende Zellen bei 24 und 30°C verglichen mit dem Wildtyp nur schwach reduziertes Wachstum. Bei 37°C hingegen zeigten Zellen, die GFP-Tim23 exprimieren ein deutlich reduziertes Wachstum. Überexpression von GFP-Tim23 (GFP-Tim23 \uparrow) auf respiratorischem Lactat-Medium wirkte sich nahezu letal aus (Abbildung 8A). Diese Ergebnisse konnten durch Bestimmung der Wachstumskurven in Flüssigmedium bestätigt werden (Abbildung 8B).

Zusammenfassend lässt sich erkennen, dass die Lokalisation der GFP-Domäne von GFP-Tim23 im IMS das Wachstum negativ beeinflusst, nicht aber die Lokalisation an der Oberfläche der Mitochondrien. Dies deutet darauf hin, dass die mitochondrialen Translokasen TOM und TIM in ihrer Funktion nicht beeinträchtigt sind, sofern die GFP-Untereinheit des Fusionsproteins cytosolisch lokalisiert ist.

Um dies weiter zu untersuchen, wurde zunächst die Topologie von GFP-Tim23 \uparrow , wie für GFP-Tim23 unter Kontrolle des endogenen Promotors, untersucht (Abbildung 9). Auch bei Überexpression zeigte sich die gleiche Abhängigkeit der Lokalisation der GFP-Domäne des Fusionsproteins von der Wachstumstemperatur. Die Topologie des Fusionsproteins in Mitochondrien aus bei 37°C gewachsenen Zellen konnten aufgrund des geringen Wachstums nicht analysiert werden.

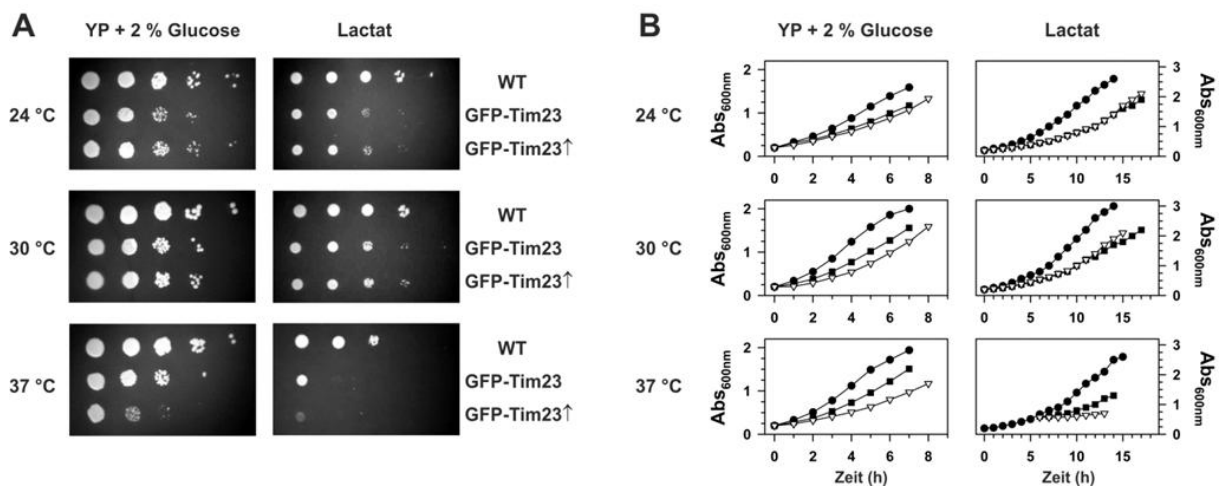


Abbildung 8. GFP-Tim23 exprimierende Stämme zeigen einen temperatursensitiven Wachstumsphänotyp.

W303 Wildtyp und W303ΔTim23 mit entweder pRS315-GFP-Tim23 unter Kontrolle des endogenen Tim23 Promotors oder pYX242-GFP-Tim23 unter Kontrolle des TPI- Promotors wurden auf 24, 30 und 37°C auf YP-Medium mit 2% Glucose oder Lactat-Medium kultiviert und über ca. zwei Tage in der logarithmischen Wachstumsphase gehalten. Der Wachstumsphänotyp wurde auf zwei verschiedene Arten ermittelt.

(A) Die Kultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,3 verdünnt; ausgehend von dieser Verdünnung wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt (1:10; 1:100; 1:1000; 1:10000); 3 µl jeder Verdünnung wurden auf die entsprechenden Medien aufgebracht und bei den gekennzeichneten Temperaturen inkubiert.

(B) Die Kultur wurde auf eine OD₆₀₀ von 0,2 verdünnt und bei den angegebenen Temperaturen weiter inkubiert. Die Zunahme der optischen Dichte wurde stündlich erfasst. GFP-Tim23-exprimierende Stämme konnten auf Lactat-Medium bei 37°C nur auf eine OD₆₀₀ von 0,6 verdünnt werden, da stärkere Verdünnung einen extremen Anstieg in der Verdopplungszeit zur Folge hatte. WT, schwarze Kreise; GFP-Tim23, schwarze Quadrate; GFP-Tim23[↑], weiße Dreiecke

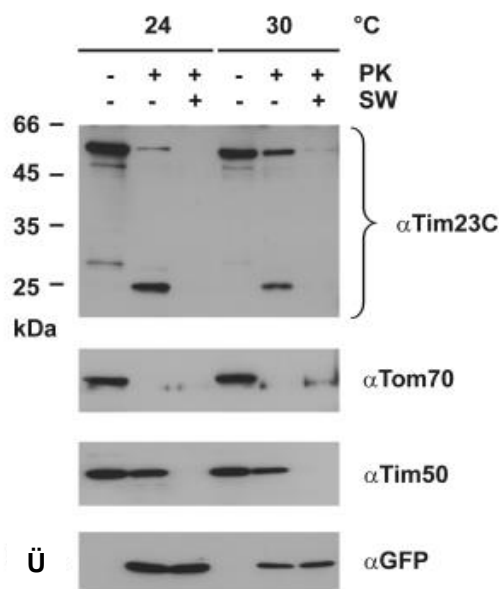


Abbildung 9. Die GFP-Domäne von GFP-Tim23[↑] zeigt dieselbe temperaturabhängige Lokalisation wie GFP-Tim23.

Der Stamm W303 GFP-Tim23[↑] wurde auf Lactat-Medium bei 24°C und 30°C kultiviert. Die Mitochondrien wurden isoliert und entweder unbehandelt belassen oder unter isotonischen oder hypotonischen Bedingungen mit Proteinase K behandelt. SDS-PAGE mit anschließendem Immunoblotting unter Verwendung der dargestellten Antikörper zeigt die vermehrte Präsenz der vor Proteolyse geschützten GFP-Tim23 Population bei Wachstum bei 30°C. Das für PK nicht abbaubare GFP-Fragment wurde nach Behandlung der Mitochondrien mit PK im Überstand (Ü) detektiert.

Anschließend wurde ein möglicher Effekt der Expression von GFP-Tim23 anstelle von Wildtyp-Tim23 auf die endogenen Mengen anderer mitochondrialer Proteine untersucht. Die Mengen von Tim17, Tom40, Tom20, Aconitase und des ADP/ATP-Carrier (AAC) waren unabhängig von der Lokalisation der GFP-Domäne vergleichbar derer des Wildtyps. Das Verhältnis der Expressionslevel von Wildtyp-Tim23 zu GFP-Tim23 \uparrow :24°C unter Kontrolle des TPI Promotors, GFP-Tim23:24°C (beide mit der GFP-Domäne cytosolisch lokalisiert) und zu GFP-Tim23:37°C (mit der GFP-Domäne im IMS lokalisiert) unter der Kontrolle des endogenen Promoters betrug ca. 3:9:1:1. Der einzig erkennbare Unterschied lag dabei im Tim17-Gehalt (Abbildung 10). Dieser war bei GFP-Tim23 \uparrow verglichen mit den anderen analysierten Stämmen deutlich erhöht. Dies deutet auf eine kontrollierte und koordinierte Expression von Tim17 und Tim23 hin.

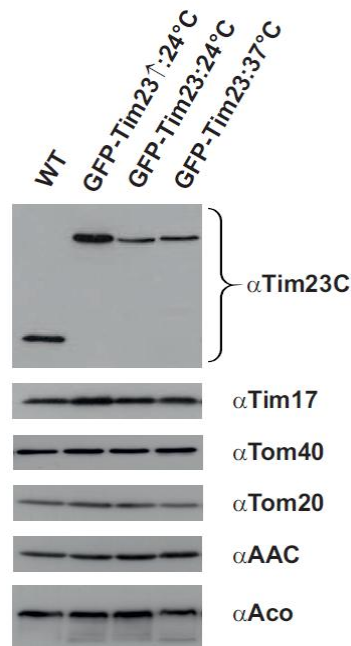


Abbildung 10. Vergleich der Expressionsmengen von Tim23-Wildtyp, GFP-Tim23 \uparrow :24°C, GFP-Tim23:24°C und GFP-Tim23:37°C.

Gleiche Mengen an mitochondrialem Protein der Stämme W303-Wildtyp, GFP-Tim23 \uparrow kultiviert bei 24°C, GFP-Tim23 kultiviert 24°C und 37°C wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Benutzung der dargestellten Antikörper untersucht. Als Kontrollproteine dienten Tim17, Tom40, Tom20, AAC und Aconitase.

2.2.2 Die Topologie von GFP-Tim23 ist entscheidend für die Funktionalität der mitochondrialen Protein-Tanslokasen

Der Proteinimport stellt eine der essentiellen Funktionen von Mitochondrien dar. Daher sollte *in organallo* getestet werden, ob das Fusionsprotein mit seiner temperaturabhängigen Topologie den Proteinimport beeinflusst. Repräsentativ für den Import in die unterschiedlichen Kompartimente und somit für die unterschiedlichen Importmaschinerien wurden verschiedene radioaktiv markierte Vorstufenproteine in Wildtyp-Mitochondrien, sowie in GFP-Tim23:24°C- und GFP-Tim23:37°C-Mitochondrien importiert. Im Fall von GFP-Tim23:24°C-Mitochondrien, also bei cytosolischer Lokalisation der GFP-Domäne, wurde für keines der getesteten Substrate ein Importdefekt verglichen mit dem Wildtyp festgestellt. GFP-Tim23:37°C-Mitochondrien hingegen zeigten für sämtliche Substrate Importdefekte. Diese fielen mit ca. 60-70%, gemessen an der Wildtyp-Importrate, für AAC, CCHL und Porin als Tim23-unabhängig Substrate relativ moderat aus. Für die Tim23-abhängige Substrate, Su9(1-69)-DHFR und DLD, hingegen waren die Importdefekte sehr deutlich. Für diese Substrate wurden nur ca. 20% der Wildtyp-Importrate detektiert (Abbildung 11).

Für die adressierte Frage, ob laterale Freisetzung aus der TOM-Pore möglich ist, ist die Situation der im Intermembranraum lokalisierten GFP-Domäne nicht von Bedeutung. Daher wurde dieser Phänotyp nicht weiter untersucht. Von entscheidender Bedeutung ist aber, ob GFP-Tim23:24°C die TOM-Pore wirklich verlassen hat. Tim23 ist ein Substrat des TOM-TIM22 Importweges. Die Proteinvorstufe muss also den TOM-Komplex passieren, wobei der N-terminale Teil des Fusionsproteins im Cytosol verbleibt. Der TOM-Komplex ist etwa viermal häufiger als der TIM23-Komplex (Sirrenberg et al., 1997). GFP-Tim23 unter dem endogenen Promotor wird zudem dreimal schwächer exprimiert als Wildtyp-Tim23 (siehe Abbildung 10). Die überschüssigen freien TOM-Poren stehen für den Import der Vorstufen der mitochondrialen Proteine zur Verfügung. Daher kann ein Effekt auf den Import oder das Wachstum bei cytosolischer Lokalisation der GFP-Domäne nicht erwartet werden. Um eine mögliche Blockade der TOM-Poren auszuschließen, wurden die oben durchgeführten *in organello* Experimente mit Wildtyp-Mitochondrien und GFP-Tim23[↑]:24°C-enthaltenden Mitochondrien wiederholt. GFP-Tim23[↑] wird dreimal stärker exprimiert als Wildtyp-Tim23 (siehe Abbildung 10). Daher sollte hier ein Importdefekt auftreten, falls GFP-Tim23 in der TOM-Pore verbleibt. Bemerkenswerterweise wurde abermals kein Importdefekt für Mitochondrien mit GFP-Tim23 anstelle von Tim23 beobachtet. Dies traf sowohl auf Tim23-abhängige Substrate, als auch auf Tim23-unabhängige Substrate zu (Abbildung 12).

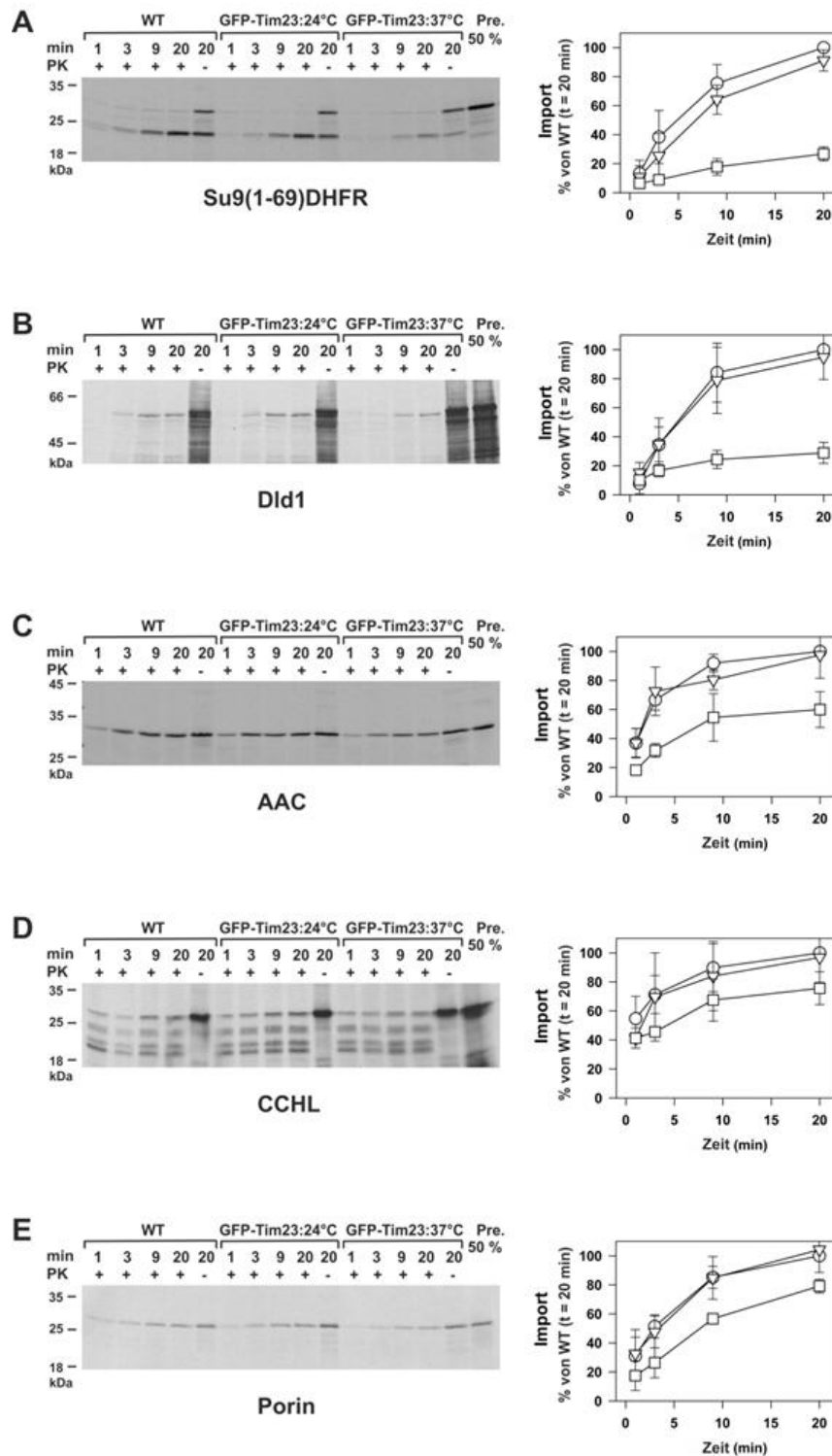


Abbildung 11. Der mitochondriale Proteinimport ist nur beeinträchtigt, falls die GFP-Domäne von GFP-Tim23 im Intermembranraum lokalisiert ist.

Import von radioaktiv markierten Proteinvorstufen in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen und GFP-Tim23-Zellen. Die GFP-Tim23 exprimierenden Zellen wurden bei 24°C und 37°C kultiviert. Linker Teil: Kinetik des Imports in die verschiedenen Mitochondrien; Kontrolle, 50% des pro Ansatz eingesetzten Lysats; Rechter Teil: Mittelwerte der Quantifizierungen von drei Experimenten; WT, weiße Kreise; GFP-Tim23:24°C, weiße Dreiecke; GFP-Tim23:37°C, weiße Quadrate; Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. (A) Su9(1-69)-DHFR, Import in die Matrix; (B) Dld1, TIM23-abhängiger Import in die Innenmembran; (C) AAC, TIM22-abhängiger Import in die Innenmembran; (D) CCHL, Import in den Intermembranraum; (E) Porin, TOB-abhängiger Import in die Außenmembran.

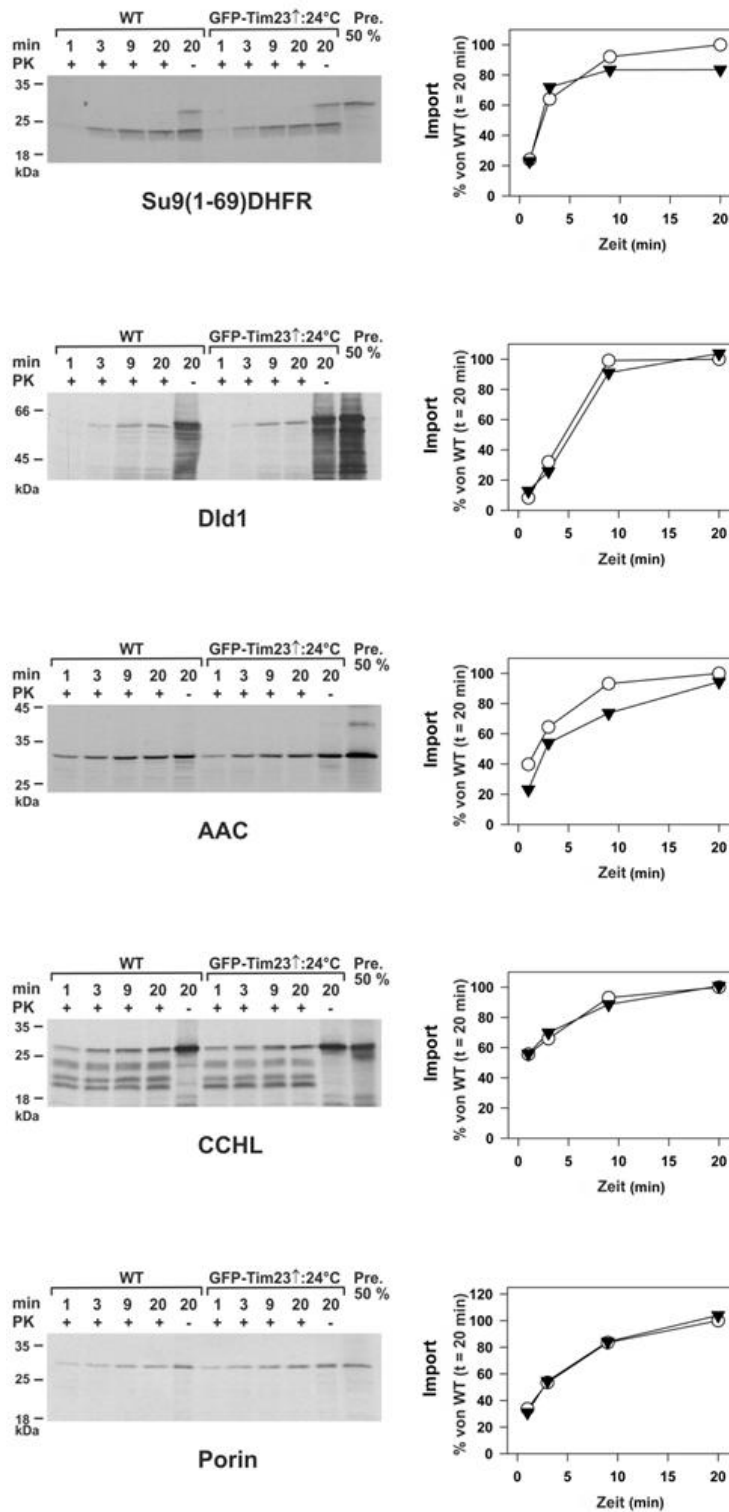


Abbildung 12. Die mitochondrialen Translokasen sind bei Überexpression von GFP-Tim23 bei 24°C voll funktional.

Import von radioaktiv markierten Proteinvorstufen in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen und GFP-Tim23[↑]-Zellen, die auf Lactat-Medium bei 24°C kultiviert wurden. Linker Teil: Kinetik des Imports in die Mitochondrien; Kontrolle, 50% des pro Ansatz eingesetzten Lysats; Rechter Teil: Mittelwerte der Quantifizierungen von drei Experimenten; WT, weiße Kreise; GFP-Tim23[↑]:24°C, schwarze Dreiecke; Fehlerbalken stellen die Standardabweichungen dar. (A) Su9(1-69)-DHFR, Import in die Matrix; (B) Dld1, TIM23-abhängiger Import in die Innenmembran; (C) AAC, TIM22-abhängiger Import in die Innenmembran; (D) CCHL, Import in den Intermembranraum; (E) Porin, TOB-abhängiger Import in die Außenmembran.

Dies spricht weiter dafür, dass sich GFP-Tim23 bei cytosolischer Lokalisation der GFP-Domäne nicht mehr im TOM-Kanal befindet.

Die bislang gezeigten Import-Experimente wurden ausschließlich mit sehr kleinen Mengen an radioaktiv markiertem Vorstufenprotein durchgeführt. Um die dabei erhaltenen Ergebnisse weiter zu bekräftigen wurde rekombinantes pSu9(1-69)DHFR-His6 in die Mitochondrien importiert. Da bei dieser Art von *in organello* Experimenten wesentlich mehr Vorstufenprotein verwendet wird, sollten sämtliche vorhandenen TOM-Poren für den Import in Anspruch genommen werden und somit besetzt sein. Auf diese Weise sollten auch geringe Effekte auf den Import detektiert werden können. Wie in Abbildung 13 dargestellt, war weder im Fall von GFP-Tim23:24°C-Mitochondrien noch von GFP-Tim23↑:24°C-Mitochondrien geringerer Import als im Fall von Wildtyp-Mitochondrien zu erkennen. Wie zu erwarten war, war im Fall von GFP-Tim23:37°C-Mitochondrien eine komplette Hemmung des Imports zu beobachten.

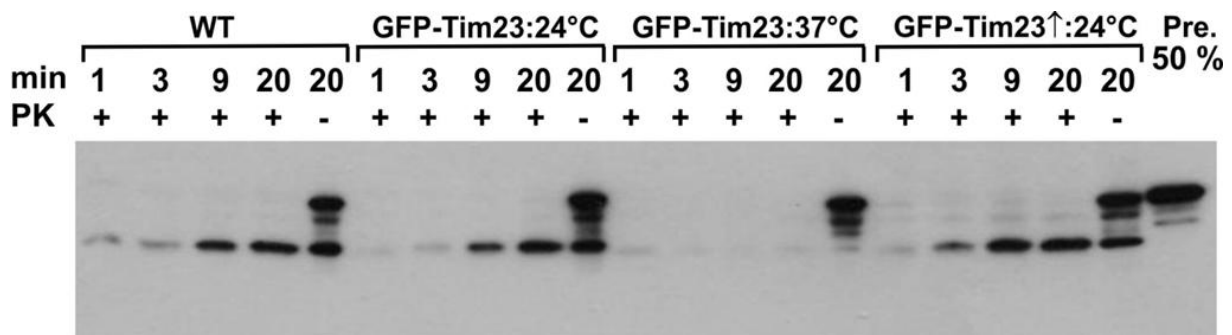


Abbildung 13. Die mitochondrialen Proteintranslokasen sind bei cytosolischer Lokalisation der GFP-Domäne auch bei Sättigung voll funktionsfähig.

Importkinetiken von rekombinatem pSu9(1-69)-DHFR-His6 in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen, GFP-Tim23:24°C-Zellen, GFP-Tim23:37°C-Zellen und GFP-Tim23↑:24°C-Zellen, die das Fusionsprotein überexprimieren. Kontrolle, 50% des pro Ansatz eingesetzten Proteins; Die Analyse der Importreaktionen erfolgte mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodekoration unter Benutzung eines anti-His Antikörpers.

Die bislang erhaltenen Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass GFP-Tim23 im Zuge des Imports die TOM-Pore verlässt, was aller Wahrscheinlichkeit nach mittels Öffnung des TOM-Kanals geschieht.

2.2.3 Die laterale Freisetzung aus der TOM-Pore ist sequenzabhängig

Falls die Annahme, dass GFP-Tim23:24°C die Import-Pore verlassen hat zutrifft, sollte es nicht möglich sein TOM-Komponenten zusammen mit GFP-Tim23 zu isolieren. Wie in Abbildung 14 zu sehen ist, war es tatsächlich nicht möglich die TOM-Komponenten Tom40, Tom22 oder Tom70 zusammen mit His6-GFP-Tim23 zu isolieren. Die erfolgreiche Co-Isolation der TIM23-Komponenten Tim17 und Tim50 hingegen belegt die Verlässlichkeit des Experimentes. Tim17 bildet mit Tim23 relativ stabiles Heterooligmer, was in einer sehr starken Interaktion resultiert. Tim50 hingegen ist nur relativ schwach an den Komplex gebunden. Dies schlägt sich deutlich in den Co-Reinigungseffizienzen nieder, da Tim17 komplett depletiert, Tim50 aber nur zu ca. 10%.

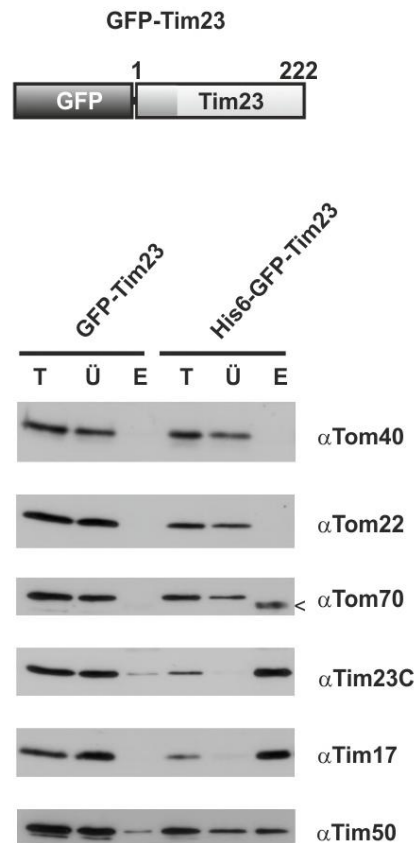


Abbildung 14. Komponenten des TOM-Komplex können mit GFP-Tim23 nicht co-isoliert werden.

His6-GFP-Tim23 und GFP-Tim23 exprimierende Zellen wurden auf Lactat-Medium bei 24°C kultiviert. Die Mitochondrien wurden isoliert, mit Digitonin solubilisiert und His6-GFP-Tim23 mittels NiNTA-Beads affinitätsgereinigt. Die Fraktionen: Solubilisierte Mitochondrien (T/Total), Ungebundenes Protein (Ü/Überstand) und Gebundenes Material (E/Eluat) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der dargestellten Antikörper analysiert. Der Pfeil indiziert eine Kreuzreaktion des verwendeten anti-Tom70 Antikörpers.

Auf der Grundlage der bisherigen Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die N-terminalen Reste von Tim23 für die laterale Freisetzung von Bedeutung sind. Dies wirft die Frage auf, ob laterale Freisetzung eine intrinsische Eigenschaft von Tim23 ist. Falls ein Transportweg aus der TOM-Pore in die mitochondriale Außenmembran existiert, könnte der Austausch der N-terminalen Aminosäuresequenz von Tim23 durch Transmembransegmente von Außenmembranproteinen zu einer Freisetzung aus der TOM-Pore wie im Fall von GFP-Tim23 führen. Ein gegenteiliges Resultat sollte zu beobachten sein, wenn dieselbe Sequenz durch eine hydrophile Sequenz ersetzt wird.

Um dies zu testen wurden die Aminosäurereste 1-20 von Tim23 ersetzt, zum einen durch eine hydrophile Sequenz von Tom22 (Reste 22-57, Tom22SOL) zum anderen durch die Transmembransegmente von Tom22 (Reste 92-126, Tom22TMS) und Mim1 (Reste 29-68, Mim1TMS). Wie Abbildung 13 zeigt, weisen alle Fusionsproteine mit ausgetauschtem Tim23 N-Terminus bei Expression bei 24°C die erwartete Topologie. Die GFP-Domänen sind cytosolisch lokalisiert.

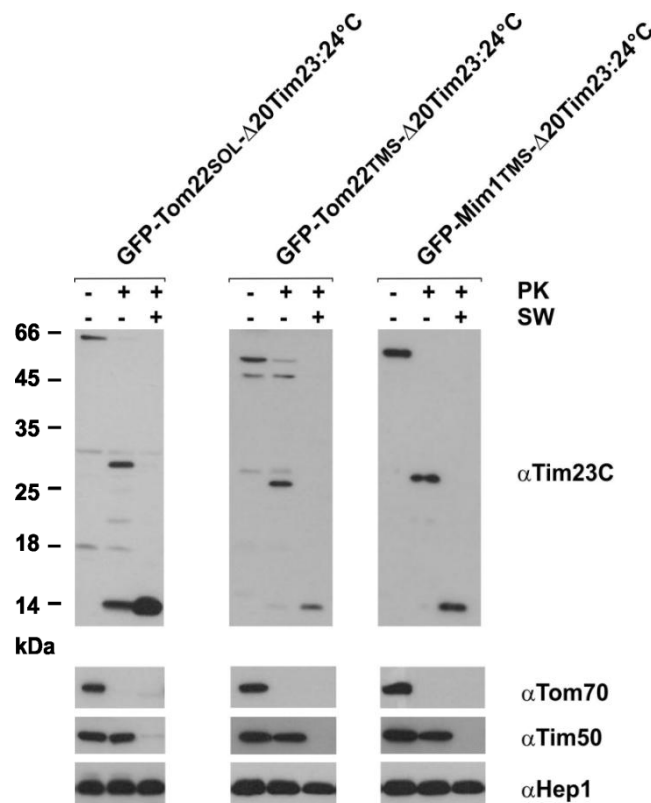


Abbildung 15. Die GFP-Domänen der Fusionsproteine mit Austausch der N-terminalen Aminosäurereste (1-20) sind cytosolisch lokalisiert.

Die Stämme GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23, GFP-Tom22TMS- Δ 20Tim23 und GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23 unter Kontrolle des endogenen Tim23-Promotors wurden auf Lactat-Medium bei 24°C kultiviert. Die isolierten Mitochondrien wurden unbehandelt belassen oder unter isotonen oder hypotonen Bedingungen mit PK behandelt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der angegebenen Antikörper. PK, Proteinase K; SW, geschwollene Mitochondrien; α , Antikörper gegen die entsprechenden Proteine.

Bei parallel durchgeführten Co-Isolierungsexperimenten fanden sich nach Affinitätschromatographie nahezu identische Mengen an Tim17 und Tim50 in den Eluat-Fractionen der verschiedenen Konstrukte. Hinsichtlich der TOM-Komponenten zeigten sich allerdings deutliche Unterschiede (Abbildung 16A). Die Co-Reinigungseffizienz bei der Analyse von His6-GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 betrug ca. 10% des gesamten Tom40. Bei His6-GFP-Tim23, His6-GFP-Tom22TMS- Δ 20Tim23 und His6-GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23 hingegen lag die Co-Reinigungseffizienz lediglich bei 0,5 bzw. 2% (Abbildung 16B).

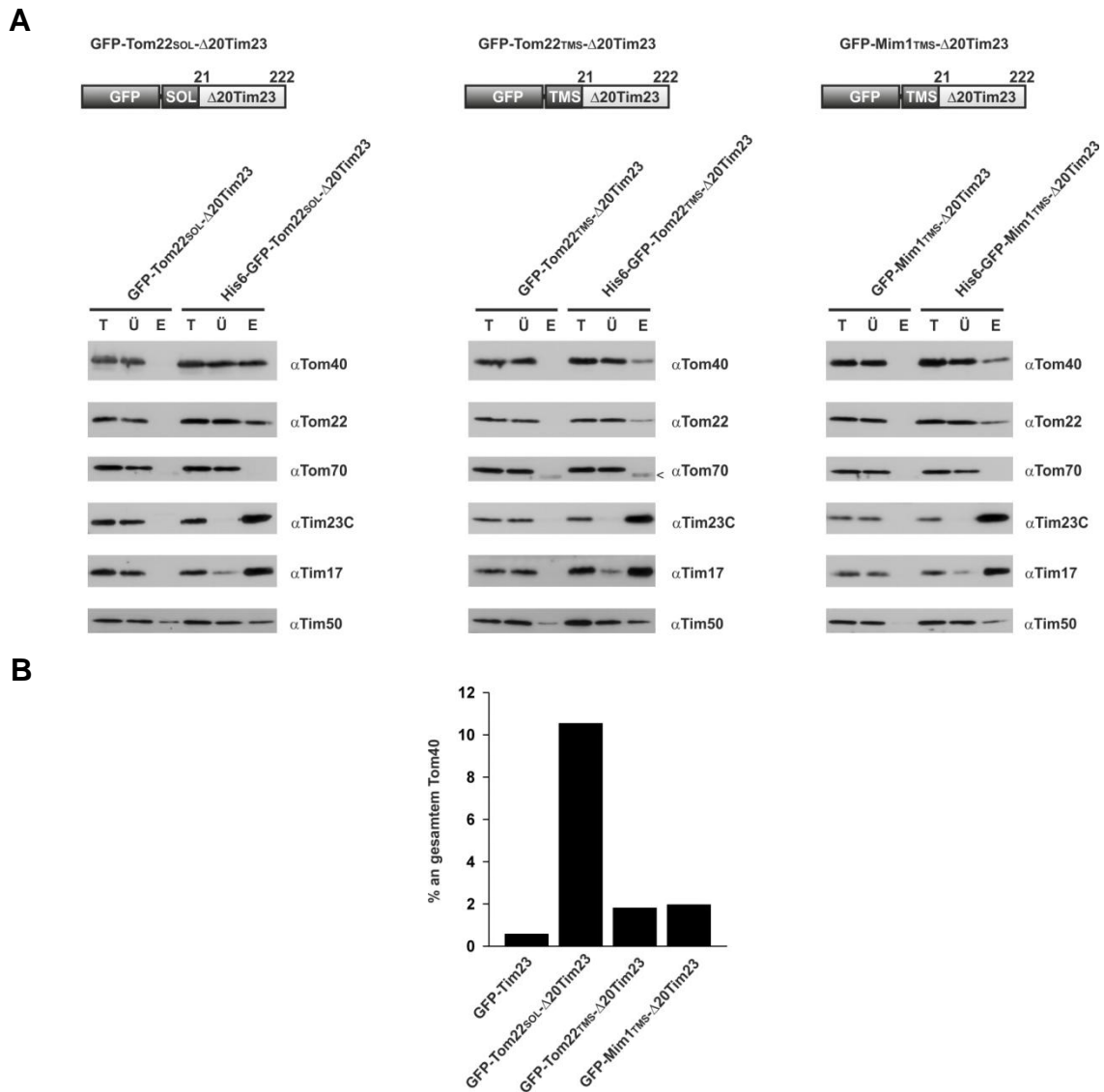


Abbildung 16. Der Austausch der N-terminale Aminosäurereste (1-20) von Tim23 durch eine hydrophile Sequenz nicht aber durch ein Transmembransegment führt zu effizienter Co-Isolierung von TOM-Komplex-Komponenten mit GFP-Tim23-Varianten.

(A) His6-GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23, His6-GFP-Tom22TMS- Δ 20Tim23, His6-GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23 exprimierende Zellen wurden auf Lactat-Medium bei 24°C kultiviert. Die Mitochondrien wurden isoliert, mit Digitonin solubilisiert und mittels NiNTA-Beads affinitätsgereinigt. Als Kontrolle dienen Mitochondrien mit den korrespondierenden nicht getagten Fusionsproteinen. Die Fraktionen: Solubilisierte Mitochondrien (T/Total), Ungebundenes Protein (Ü/Überstand) und Gebundenes Protein (E/Eluat) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Der Pfeil indiziert eine Kreuzreaktion des verwendeten anti-Tom70 Antikörpers.

(B) Quantifizierung von co-isoliertem Tom40

Die stärkere Co-Reinigung von TOM-Komponenten mit His6-GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 könnte wie folgt erklärt werden. (1) Dieses Konstrukt verbleibt in der TOM-Pore, wohingegen die anderen entlassen werden. (2) GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 wird verglichen mit den übrigen stärker exprimiert. (3) In Mitochondrien mit den Fusionsproteinen, mit welchen TOM-Komponenten nur in sehr geringem Maße co-isoliert werden können, ist weniger intakter TOM-Komplex präsent. Um die letzten beiden Möglichkeiten auszuschließen, wurden die Mengen an Fusionsproteinen und intaktem TOM-Komplex in den verschiedenen Stämmen bestimmt. Bei gleichen Signalstärken von Tim17, Tom40, Tom20, AAC und Aconitase lag der Gehalt von GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 sogar unter dem der übrigen Konstrukte (Abbildung 17A). Die Menge an intaktem TOM Komplex war in allen getesteten Stämmen vergleichbar, wie die Immunodekoration einer Blau-Native-PAGE (BN-PAGE) in Abbildung 17B zeigt. Dies bekräftigt weiter die Annahme, dass laterale Freisetzung aus dem TOM-Kanal möglich ist.

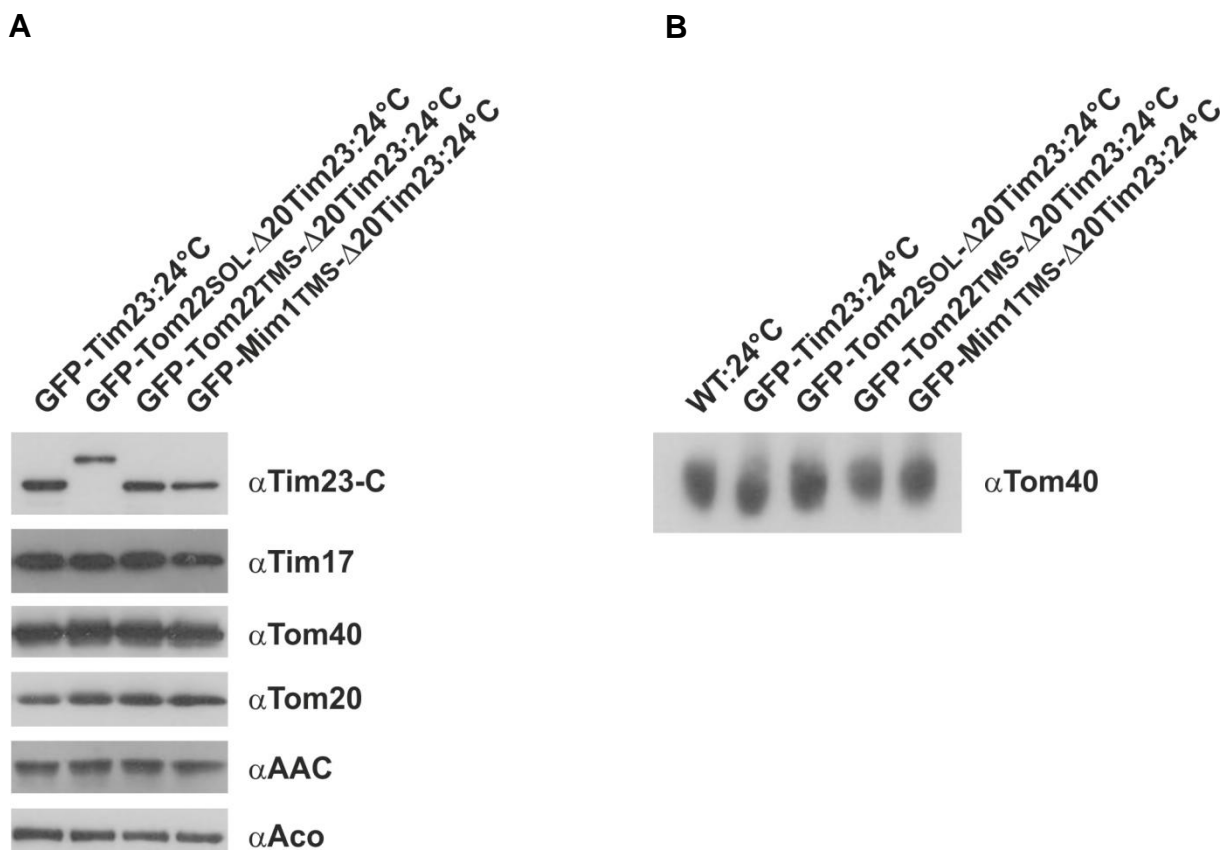


Abbildung 17. Co-Isolierung von TOM-Komplex Komponenten mit GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 ist nicht erklärbar durch höheres Expressionslevel oder instabileren TOM-Komplex in den übrigen GFP-Tim23-Varianten.

(A) Gleiche Mengen an mitochondrialem Protein der Stämme GFP-Tim23, GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23, GFP-Tom22TMS- Δ 20Tim23 und GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23 wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Benutzung der angegebenen Antikörper untersucht. Als Kontrollproteine dienten Tim17, Tom40, Tom20, AAC und Aconitase.

(B) Gleiche Mengen an Mitochondrien wurden in Digitonin solubilisiert und mittels BN-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung eines anti-Tom40 Antikörpers analysiert.

Um die bisherigen Ergebnisse noch weiter zu unterstützen, wurde ein *in organello* Import mit rekombinantem pSu9(1-69)-DHFR-His6 durchgeführt. Bemerkenswerterweise zeigten GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23 enthaltende Mitochondrien keinen Unterschied in der Importeffizienz zu Wildtyp-Mitochondrien. Im Gegensatz dazu war in GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 enthaltenden Mitochondrien ein starker Importdefekt festzustellen (Abbildung 18).

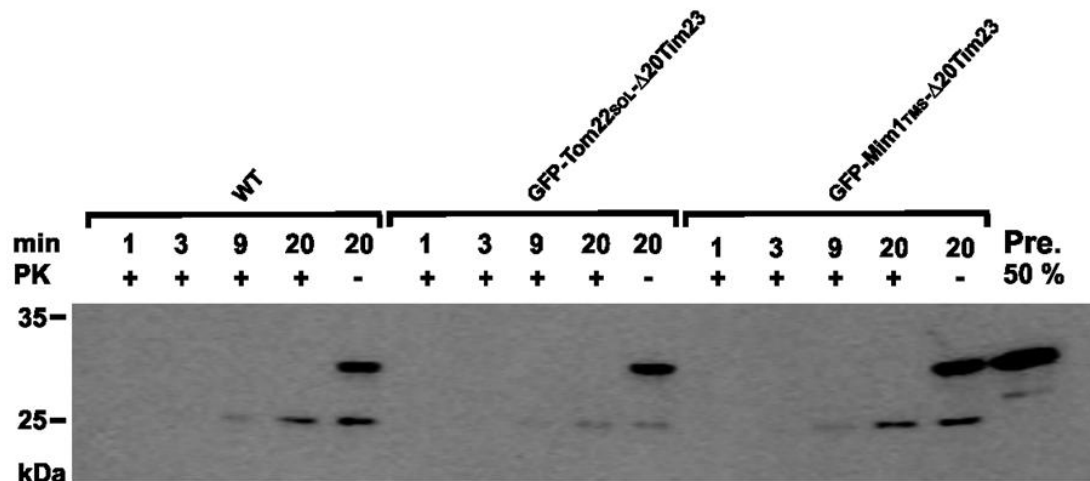


Abbildung 18. Der Austausch der N-terminale Aminosäurereste (1-20) von Tim23 durch eine hydrophile Sequenz nicht aber durch ein Transmembransegment führt zu einem erheblichen Importdefekt.

Import von rekombinantem pSu9(1-69)-DHFR-His6 in Mitochondrien aus Wildtyp-Zellen, GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23-Zellen und GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23-Zellen. Kinetik des Imports in die verschiedenen Mitochondrien; Kontrolle, 50% des eingesetzten Vorstufenproteins; rekombinant hergestelltes pSu9(1-69)-DHFR-His6 wurde importiert und mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Benutzung eines anti-His Antikörpers analysiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass GFP-Tim23 bei Wachstum bei 24°C einerseits mit seinen vier α -helikalen TMS in der mitochondrialen Innenmembran und andererseits mit der N-terminalen Domäne von Tim23 permanent in der mitochondrialen Außenmembran verankert ist. Demzufolge wird die GFP-Domäne auf der mitochondrialen Oberfläche präsentiert. Hierbei steckt das Fusionsprotein nicht in der Import-Pore der Außenmembran, dem TOM-Komplex, fest, sondern wird lateral in die mitochondriale Außenmembran entlassen. Dieser Importmechanismus ist nicht auf die N-terminale Sequenz von Tim23 beschränkt. Auch TMS von Außenmembranproteinen, zumindest die hier getesteten Gruppe von α -helikalen, einfach membranspannenden Proteinen mit internem TMS, können auf diese Weise aus dem TOM-Kanal exportiert werden. Somit beschreibt diese Arbeit einen neuen Weg der Topogenese von Proteinen in Mitochondrien.

2.3 Identifizierung von Kontaktstellenproteinen

Die topologische Besonderheit des Fusionsproteins GFP-Tim23 ermöglicht nicht nur die Untersuchung des Proteinimports in die Außenmembran von Mitochondrien. Sie stellt auch die Voraussetzung für Studien an einer bislang weitgehend unbekanntem Gruppe von Proteinen der mitochondrialen Hülle dar, den mitochondrialen Kontaktstellen.

Permanenter Kontakt zwischen mitochondrialer Innen- und Außenmembran wurde mittels Elektronenmikroskopie erstmals 1966 gezeigt (Hackenbrock, 1966). Diese sogenannten Kontaktstellen (Contact Sites, CS) wurden in Mitochondrien im kondensierten Zustand als begrenzte, stark kontrastierte Bereiche der Innenmembran gesehen, die eng an der Außenmembran anliegen. Diese Beobachtungen legen den Schluss nahe, dass die Kontakte durch Protein-Protein Interaktionen hergestellt werden.

Einsichten in die Proteinzusammensetzung der CS konnten mit Hilfe von mitochondrialer Subfraktionierung erwartet werden. Diesem Ansatz liegen die Erkenntnisse zur unterschiedlichen Beschaffenheit von Außen- und Innenmembran zu Grunde. Die Innenmembran weist im Vergleich zur Außenmembran ein wesentlich höheres Protein-Lipidverhältnis auf, besitzt also eine wesentlich höhere Dichte. Mittels milder Ultraschall-Behandlung können aus Mitochondrien reine Außen- und Innenmembranvesikel gebildet werden. Durch isopyknische Dichtegradientenzentrifugation ist es möglich die relative schweren Innenmembranvesikel von den leichteren Außenmembranvesikeln zu trennen. Die Ultraschall-Behandlung der Mitochondrien sollte aus den permanenten Kontaktstellen Vesikel generieren, die aus beiden Membranen, Innen- und Außenmembran, bestehen. Diese sollten sich in ihrer Dichte von reinen Innen- oder Außenmembranvesikeln unterscheiden und somit durch Dichtegradientenzentrifugation von diesen zu trennen sein. Frühere Versuche solche Kontaktstellen-Vesikel zu isolieren waren vor allem mangels spezifischer Marker nicht erfolgreich. Als Marker kann sich ein Protein eignen, das in beiden mitochondrialen Membranen fest verankert ist. Wie oben klar dargestellt, erfüllt GFP-Tim23 diese Eigenschaft. Hypertone Behandlung von Mitochondrien führt zu einer Ablösung der inneren Grenzmembran (inner boundary membrane, IBM) von der Außenmembran, so dass die Außenmembran nur noch an den Kontaktstellen mit der Innenmembran in Verbindung steht. Bei dieser Behandlung sollten die Kontaktstellen, und somit auch GFP-Tim23, lateral aufeinander zu diffundieren. Aufgrund dessen sollte GFP-Tim23 nach Ultraschall-Behandlung in Kontaktstellen-Vesikel angereichert sein und einen Marker abgeben. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob es möglich ist Vesikel zu generieren und zu isolieren,

in denen GFP-Tim23 im Vergleich zu Innen- und Außenmembranproteinen angereichert ist (Abbildung 19).

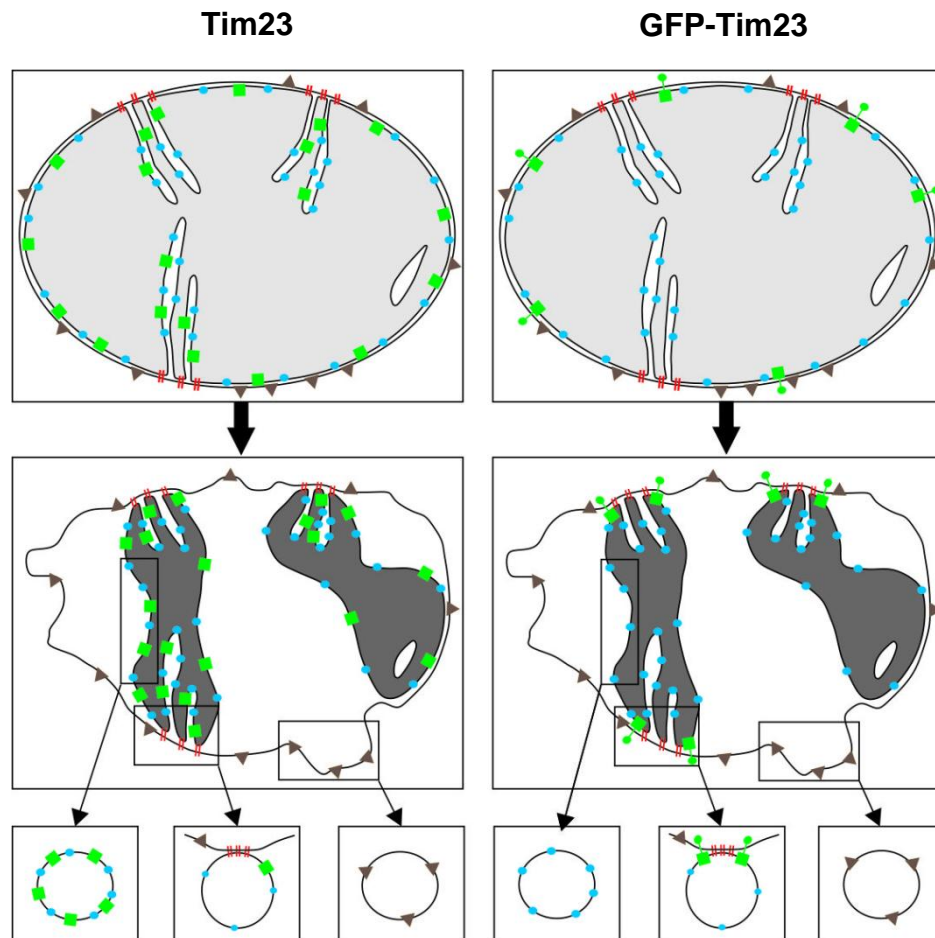


Abbildung 19. Prinzip der Herstellung von submitochondrialen Membranvesikeln und der Etablierung von GFP-Tim23 als Marker für Kontaktstellen.

Obere Reihe: Schematische Darstellung von Mitochondrien und die Verteilung ihrer Membranproteine im orthodoxen Zustand.

Mittlere Reihe: Schematische Darstellung von Mitochondrien und die Verteilung ihrer Membranproteine im kondensierten Zustand.

Untere Reihe: generierbare Membranvesikel mit den enthaltenen Membranproteinen

Links: Mitochondrium aus Tim23-enhaltenden Wildtyp-Zellen, rechts: Mitochondrium aus GFP-Tim23 exprimierenden Zellen.

Symbole: rote Striche, mögliche Kontaktstellenproteine; grüne Hanteln, GFP-Tim23; grüne Quadrate, Tim23; blaue Kreise, Innenmembranproteine; graue Dreiecke, Außenmembranproteine

2.3.1 Identifikation von Fcjl als erstes Kontaktstellenprotein

Um zu untersuchen, ob das oben dargestellte Konzept tragfähig ist, wurden aus frisch isolierten Mitochondrien durch milde Ultraschallbehandlung Membranvesikel erzeugt. Diese wurden nach Aufkonzentration unter einem linearen Saccharosegradienten gelegt und bis zum Erreichen des Gleichgewichts einer Ultrazentrifugation unterzogen. Nach der Einstellung des Gleichgewichts wurde der Gradient in Fraktionen gleichen Volumens aufgeteilt, die nach TCA-Fällung mittels SDS-PAGE und Immunoblotting analysiert wurden. Um die Mitochondrien keiner zusätzlichen Beanspruchung auszusetzen, waren die Mitochondrien keiner weiteren Aufreinigung vor der Vesikelgeneration unterworfen worden.

Dieses Experiment wurde parallel mit den Hefe-Stämmen W303-Wildtyp und W303 GFP-Tim23 durchgeführt. Zur Ansammlung von GFP-Tim23 in den Kontaktstellen wurden beide Stämme auf 24°C kultiviert. Wie man in Abbildung 20A sieht, konnte im Fall der Wildtyp-Mitochondrien eine sehr gute Trennung von Außen- und Innenmembranvesikeln erreicht werden. Die Außenmembranproteine Por1/VDAC, Tom70, Tom40 und Tom22 sind im obersten Bereich des Gradienten und damit in Fraktionen mit sehr niedriger Saccharosekonzentration stark angereichert. Vesikel mit Innenmembranproteinen wie Cox2, Cor2, Tim17 und Tim23 hingegen sind aufgrund des hohen Protein-Lipidverhältnisses nicht fähig im Gradienten aufzusteigen und reichern sich am Boden des Gradienten an. Somit wurde eine sehr hohe Auftrennung zwischen Außen- und Innenmembranvesikeln erreicht. In der Mitte des Gradienten wurden sowohl Außen- als auch Innenmembranproteine detektiert. Die Präsenz von Außen- und Innenmembranvesikeln in der Mitte des Gradienten deutet darauf hin, dass Vesikel erzeugt wurden, die aus beiden Membranen bestehen.

Abbildung 20B zeigt die Verteilung von Außen- und Innenmembranvesikeln generiert aus GFP-Tim23-enthaltenden Mitochondrien. Die Verteilung der verschiedenen mitochondrialen Proteinkomponenten auf dem Gradienten war der beim Wildtyp beobachteten sehr ähnlich (Abbildung 20A). Ausnahmen stellten die Komponenten des TIM23 Komplexes dar. Hier lag eine deutliche Verschiebung von den dichtesten Fraktionen des Gradienten hin zu den Fraktionen mittlerer Dichte vor. Dies kann durch Assoziation von GFP-Tim23 und den Kontaktstellen erklärt werden. Interessanterweise wird die TIM23-Komponente Tim17 in ihrer Verteilung in gleicher Weise verändert. Dies erklärt sich durch die relativ stabile Interaktion von Tim17 und Tim23 im TIM23-Komplex, der in diesem Fall GFP-Tim23 enthält. Somit kann gleiches Verteilungsmuster als Hinweis auf Interaktion dienen.

Bei der weiteren Analyse der Fraktionen konnte ein Protein identifiziert werden, das exakt die gleiche Verteilung im Gradienten wie das Markerprotein GFP-Tim23 aufwies. Bei diesem

Protein handelt es sich um Fcj1, einem essentiellen Faktor für die Ausbildung der Crista Junctions (CJ). Bemerkenswerterweise verhält sich dieses Protein in Vesikeln aus Wildtyp-Mitochondrien genau wie in Vesikeln aus GFP-Tim23-haltigen Mitochondrien. Daher lässt sich die Möglichkeit eines Artefakts, das auf einer Interaktion von Fcj1 mit Tim23 beruhen würde, ausschließen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass hier ein Verfahren zur Erzeugung und Auftrennung von submitochondrialen Vesikeln etabliert werden konnte, das es ermöglicht Kontaktstellen-Vesikel zu isolieren. Weiter konnte gezeigt werden, dass sich GFP-Tim23 aufgrund seiner beide Membranen durchspannenden Topologie so wie erwartet verhält. Vesikel, die dieses Fusionsprotein enthielten reicherten sich, verglichen mit reinen Innen- und Außenmembranvesikeln, in Fraktionen intermediärer Dichte an. Bemerkenswerterweise ist Fcj1 ein Protein, das sich auch im Wildtyp exakt wie ein Kontaktstellenprotein verhält. Auch dies ist in Übereinstimmung mit dem Ausgangskonzept.

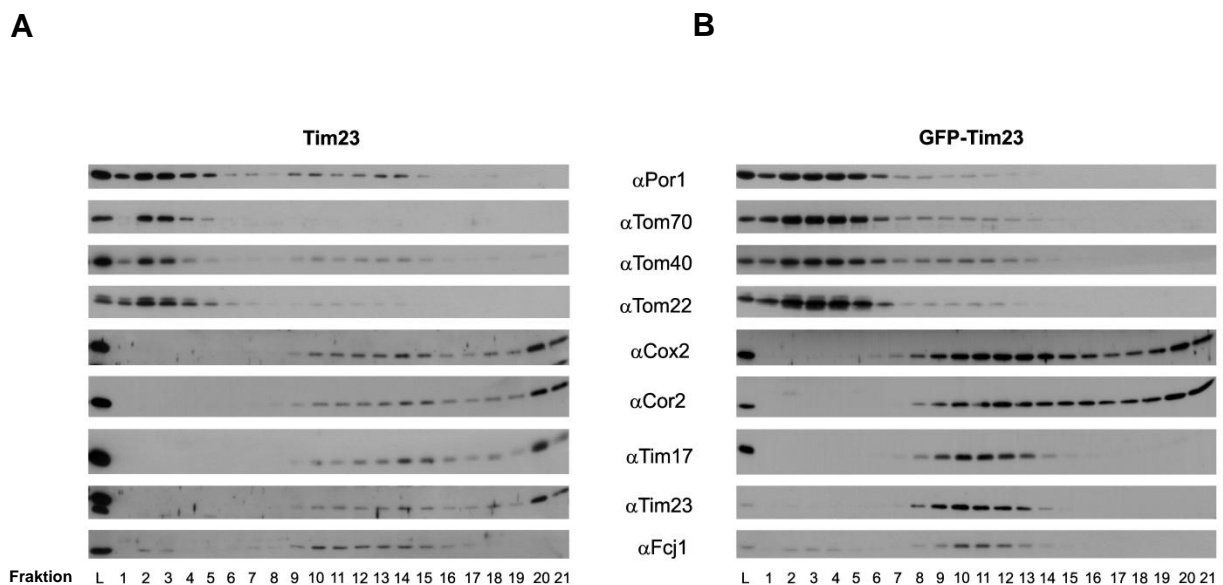


Abbildung 20. Verteilung mitochondrialer Membranproteine in Membranvesikeln nach isopyknischer Dichtegradientenzentrifugation.

Wildtyp-Zellen und GFP-Tim23-exprimierenden Zellen wurden auf Lactat-Medium bei 24°C kultiviert. Die Mitochondrien wurden isoliert und schonend mit Ultraschall behandelt. Die dadurch entstandenen Membranvesikel wurden über Gleichgewichtszentrifugation in einem Saccharosegradienten aufgetrennt. Die Analyse der Verteilung von Außenmembran und Innenmembranvesikeln erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der angegebenen Antikörper. (A) Vesikel aus Tim23 enthaltenden Wildtyp-Mitochondrien; (B) Vesikel aus GFP-Tim23-enthaltenden Mitochondrien; L, Auftrag auf den Gradienten; 1-21, Fraktionszahl von niedriger zu hoher Dichte.

2.3.2 Identifikation des Kontaktstellenproteoms mittels SILAC

Um weitere Proteine zu identifizieren, deren Verteilung im Saccharosegradienten sich ähnlich zu der von Fcj1 und damit GFP-Tim23 verhält, wurde eine spezielle Variante der quantitativen Massenspektrometrie verwendet, SILAC (Ong et al., 2002). Durch Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture (SILAC) können Proteine durch massenspektrometrische Analyse einerseits identifiziert werden, darüber hinaus aber auch quantifiziert werden (ausführliche Beschreibung siehe: 6.3.11).

In dem in dieser Arbeit durchgeführten Experiment wurde der Lysin-auxotrophe Wildtyp-Stamm YPH499 parallel auf Medien, die entweder Lysin mit den Isotopen ^{12}C und ^{14}N (leicht) oder ^{13}C und ^{15}N (schwer) beinhalten, bei 24°C kultiviert. Nach der Isolation der Mitochondrien wurden daraus wie oben beschrieben Membranvesikel generiert und diese über einen Saccharosegradienten aufgetrennt. Im Anschluss daran wurden Fraktionen 9-13 des schweren Gradienten vereinigt und als SILAC-Standard verwendet. Dieser wurde mit jeder zweiten Fraktion des leichten Gradienten gemischt und die in den Proben enthaltenen Proteine mit der Endopeptidase LysC verdaut. Nach der massenspektrometrischen Analyse erfolgten die Identifizierung und die Quantifizierung anhand der Verhältnisse der schweren und leichten Isotope unter Verwendung der MaxQuant-Software (Cox und Mann, 2008). Die Prozessierung der Proben und deren massenspektrometrische Analyse wurde von Dirk Walther durchgeführt (Max-Planck-Institut für Biochemie Abt. Matthias Mann „Proteomics and Signal Transduction“).

Innerhalb einer ersten Analyse konnten 677 Proteine identifiziert werden. 346 Proteine (51,1%) wurden in früheren Studien bereits dem mitochondrialen Proteom zugewiesen. Bei den übrigen 331 (48,9%) handelt es sich um nicht-mitochondriale Proteine oder Proteine unbekannter Lokalisation (Abbildung 21). Besonders prominent waren hier Proteine der Vakuolen (8,6%), des Cytosols (12,7%) und des endoplasmatischen Retikulums (ER) (19,1%) vertreten.

Die mitochondrialen Proteine verteilten sich wie in Abbildung 22 angegeben auf die mitochondrialen Subkompartimente.

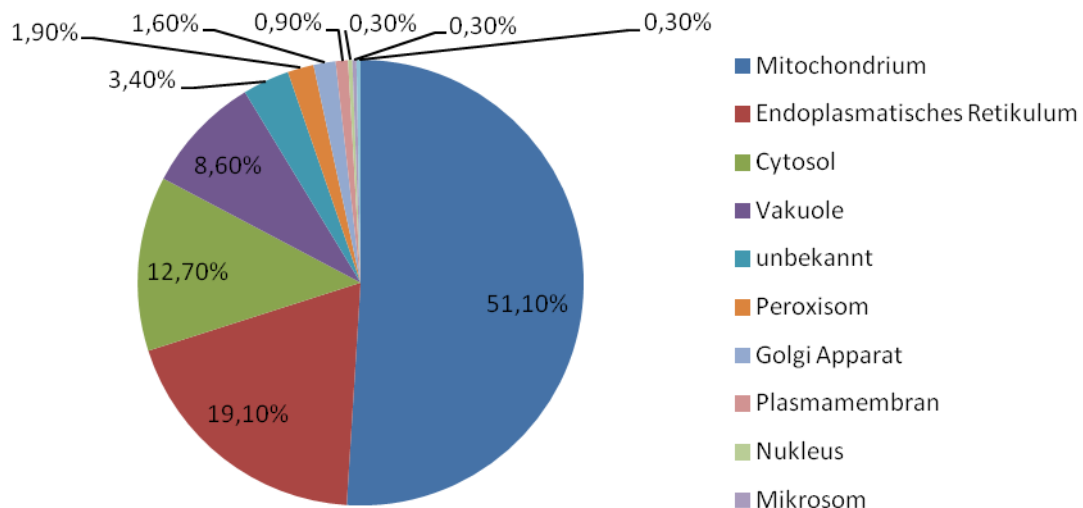


Abbildung 21. Kompartimentzugehörigkeit der identifizierten SILAC-Paare.

YPH499 Wildtyp-Zellen wurden parallel in „leichtem“ und „schwerem“ SLac-Medium bei 24°C kultiviert, die Mitochondrien wurden isoliert und wie in Abb. 20 beschrieben behandelt. Anstelle der Analyse mittels TCA-Präzipitation, SDS-PAGE und Immunodekoration erfolgte eine massenspektrometrische Analyse jeder zweiten Fraktion. Angaben in % bezogen auf die Gesamtzahl der identifizierten Proteine.

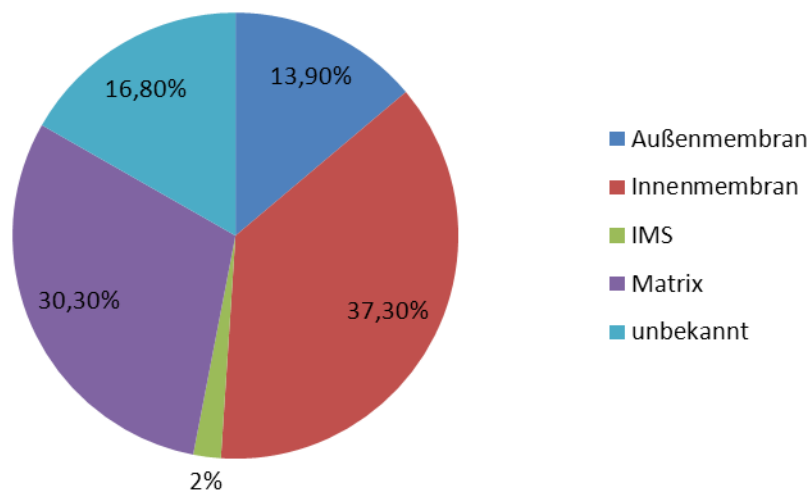


Abbildung 22. Submitochondriale Verteilung der mit SILAC identifizierten Proteine.

Angaben in % bezogen auf die Gesamtzahl der in Abb. 21 dargestellten mitochondrialen Proteine.

Abbildung 23 (A-E) zeigt die Profile der relativen SILAC-Verhältnisse einiger mitochondrialer Proteine und einiger Proteine des ER. Außenmembranproteine zeigten in Fraktion 1 die stärkste Anreicherung. Nur minimale Mengen fanden sich in den mittleren Fraktionen (Abbildung 23A). Lösliche Proteine hingegen reichert sich annähernd komplett in Fraktion 21 an, der Fraktion mit der höchsten Saccharosekonzentration des Gradienten (Abbildung 23B). Da Proteine ohne Membrananteil wegen ihrer hohen Dichte nicht in den Gradienten aufsteigen können, wurden sie aller Wahrscheinlichkeit nach in Innenmembranvesikeln eingeschlossen und aufgrund des hohen osmotischen Drucks während der Trennung freigesetzt. Bei Innenmembranproteinen war neben dem Maximum in Fraktion 13 ein sehr hohes relatives SILAC-Verhältnis in Fraktion 21 zu beobachten. Vergleicht man aber die relativen SILAC-Verhältnisse dieser mitochondrialen Innenmembranproteinen mit dem SILAC-Verhältnis von Fcj1 (Abbildung 23D), erkennt man nach diesem Experiment ebenso signifikante Unterschiede wie nach den Immunodekorationen (vgl. Abbildung 20). Zum einen lag das Maximum im Fall von Fcj1 nicht in Fraktion 13, sondern in 11, zum anderen zeigte das Verteilungsprofil dieses Proteins kein zweites Maximum in Fraktion 21. Die Verteilung von Fcj1 stimmte somit in beiden Analyseverfahren exakt überein.

Auf Verwendung hoch reiner Mitochondrien wurde in diesen Experimenten verzichtet, da dies eine zusätzliche mechanische Belastung darstellen würde. Die Hauptkontamination bei der Isolierung von Mitochondrien stellt das ER dar (vgl. Abbildung 21). ER-Proteine zeichneten sich aber durch ein sehr charakteristisches Profil aus (Abbildung 23E), das deutlich von dem mitochondrialer Proteine abwich. Betrachtet man die Profile zweier Proteine eines mitochondrialen Proteinkomplexes, hier die Prohibitine Phb1 und Phb2, so waren diese nahezu deckungsgleich. Dies traf auch zu, wenn die Verteilung für ein und dasselbe Protein, hier Tim50, in zwei unabhängig voneinander durchgeführten SILAC-Experimenten analysiert wurde (Abbildung 23F und G). Diese beiden Ergebnisse unterstreichen die Präzision und Reproduzierbarkeit der Analyse.

Nach Überprüfung der Verlässlichkeit der Experimente und Analysen wurden Proteine mit einer Verteilung auf dem Gradienten gesucht, die der Verteilung von Fcj1 entsprachen. Unter den ca. 680 detektierten Proteinen konnten fünf mit praktisch identischen SILAC-Profilen identifiziert werden, die Proteine Ycl057c-a, Yfr011c, Ynl100w, Ygr235c und Ybr262c (Abbildung 24). Diese Proteine wurden schon in früheren Proteomstudien den Mitochondrien zugeordnet (Tabelle 1), blieben aber bislang weitgehend uncharakterisiert. Somit fielen diese Proteine unter die oben aufgeführte Proteinklasse der mitochondrialen Proteine mit unbekannter Lokalisation (Abbildung 22).

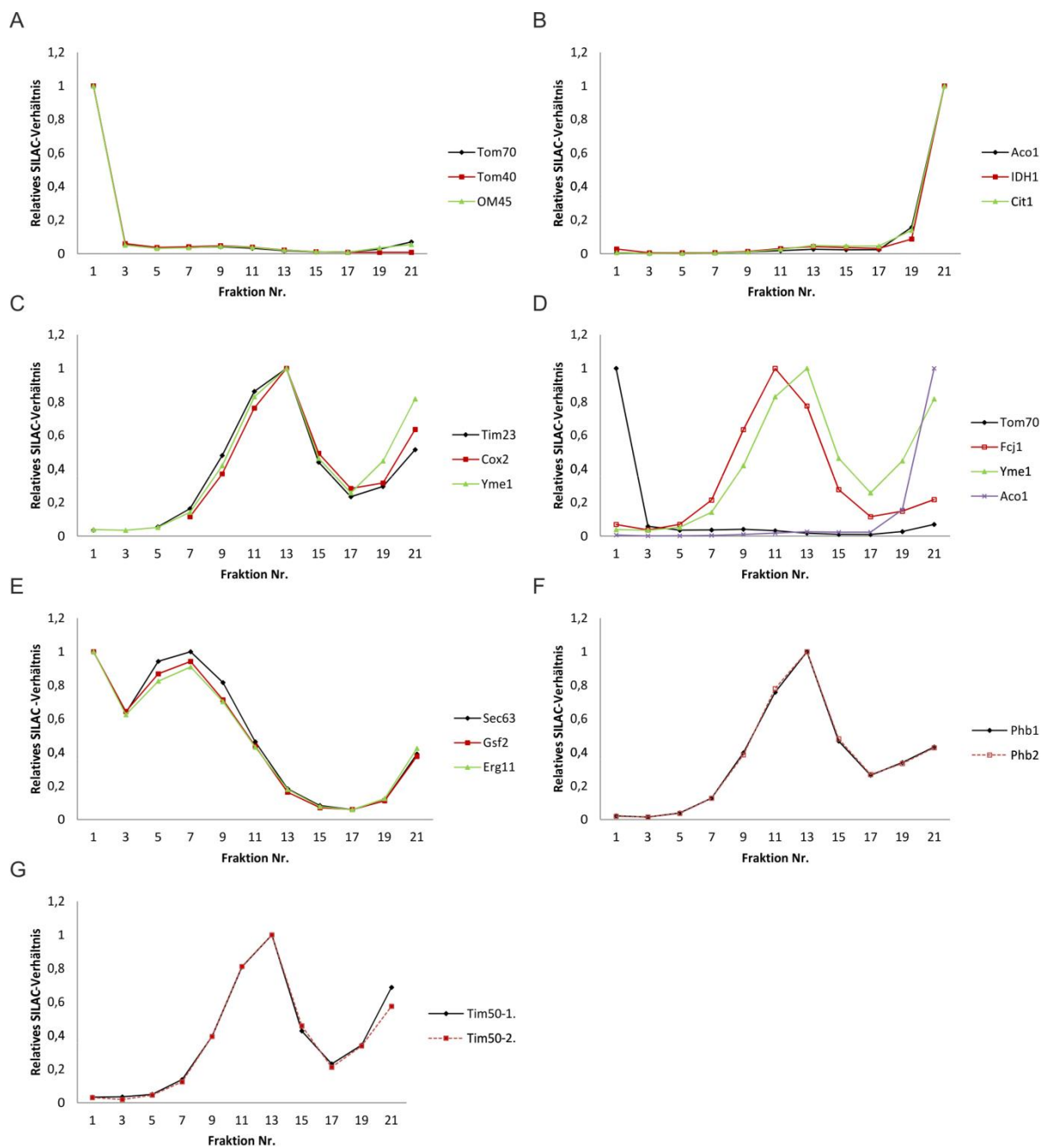


Abbildung 23. Massenspektrometrisch ermittelte Verteilungsprofile verschiedener mitochondrialer und ER-Proteine im Dichtegradienten.

(A) Proteine der mitochondrialen Außenmembran, (B) lösliche mitochondriale Proteine, (C) Proteine der mitochondrialen Innenmembran, (D) Vergleich des Profils von Fcj1 mit den Profilen von Markern der verschiedenen mitochondrialen Kompartimente, (E) ER-Membranproteine, (F) Profile der Untereinheiten des Prohibitin Komplexes, (G) Profile von Tim50 in zwei unterschiedlichen MS-Läufen,

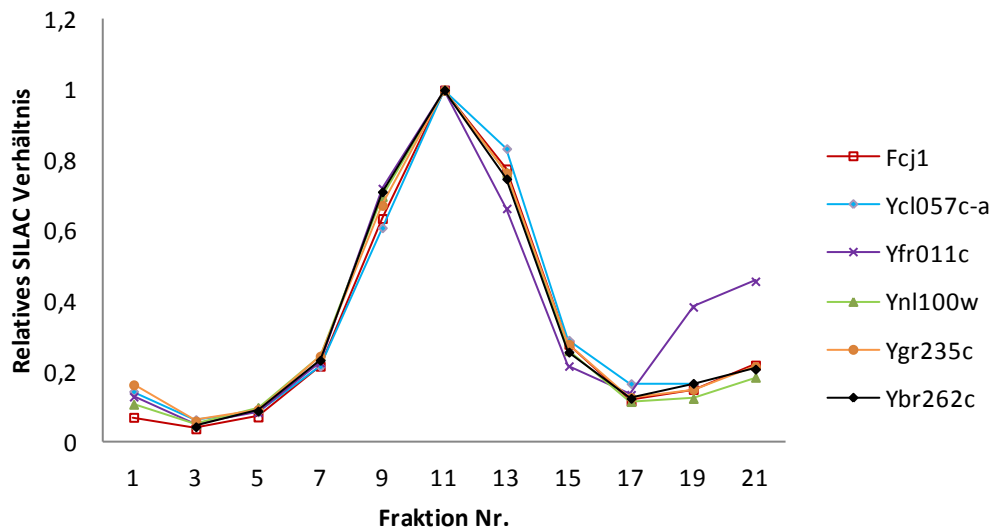


Abbildung 24. Verteilungsprofile potentieller Kontaktstellenproteine.

Fünf der ca. 350 detektierten mitochondrialen Proteine zeigen in ihrer Verteilung sehr starke Ähnlichkeit zu Fcj1

Abschließend lässt sich sagen, dass mit Hilfe dieser Experimente fünf zusätzliche potentielle Kontaktstellenproteine identifiziert wurden. Interessanterweise gehören vier dieser sechs Proteine, Fcj1 eingeschlossen, zur Gruppe der AIM (Altered Inheritance rate of Mitochondria) Proteine (Hess et al., 2009). Es besteht also eine funktionale Verknüpfung zwischen Fcj1, Yfr011c, Ynl100w und Ybr262c.

Tabelle 1. Potentielle Kontaktstellenproteine gehören zum mitochondrialen Proteom.

Alle sechs potentiellen Kontaktstellenproteine wurden in früheren mitochondrialen Proteomstudien identifiziert. +, in der Studie vorhanden ; -, in der Studie nicht vorhanden.

| Protein | Huh, <i>et al.</i> (2003) | Sickmann, <i>et al.</i> (2003) | Reinders, <i>et al.</i> (2006) | Hess, <i>et al.</i> (2009) |
|-----------|------------------------------|-----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------|
| Fcj1 | + | + | + | Aim28 |
| Ycl057c-a | - | - | + | - |
| Yfr011c | + | + | + | Aim13 |
| Ynl100w | + | + | + | Aim37 |
| Ygr235c | + | + | + | - |
| Ybr262c | + | + | + | Aim5 |

2.3.3 Der mitochondriale Kontaktstellen-Komplex

Bilden die mittels SILAC identifizierte Proteine mit Fcj1-ähnlicher Verteilung im Dichtegradienten einen Komplex? Um dies zu untersuchen, wurden zunächst Stämme im YPH499-Hintergrund generiert, die hexahistidyl-getagte Versionen der potentiellen Kontaktstellenproteine exprimieren. Um die Wildtyp-Expressionslevel zu erhalten wurden die Proteine C-terminal auf dem Chromosom getagt. Somit konnte der endogene Promotor beibehalten werden. Mitochondrien dieser Stämme wurden nach Isolation mit dem milden Detergens Digitonin solubilisiert und über NiNTA-Affinitätschromatographie gereinigt. Mittels SDS-PAGE und Immunoblotting wurde das gesamte solubilisierte Material (T), der nicht gebundene Überstand (Ü) und das gebundene Protein (E) analysiert.

Abbildung 25 zeigt eine Zusammenfassung der Co-Isolierungsexperimente. Bemerkenswerterweise wurde eine Interaktion aller sechs Proteine mit Kontaktstellenprotein-Verteilung festgestellt. Die Effizienz der Co-Reinigung variierte hierbei allerdings deutlich. Im Fall Isolierung von Ycl057c-a-6xHis konnte Ynl100w annähernd depletiert werden, Yfr011c aber nur in Spuren co-isoliert werden. Interessanterweise war es mit jedem getagten Protein möglich ca. 5 % der Fcj1-Population zu reinigen, mit Fcj1-6xHis war die Reinigung der anderen potentiellen Kontaktstellenproteine hingegen nicht möglich.

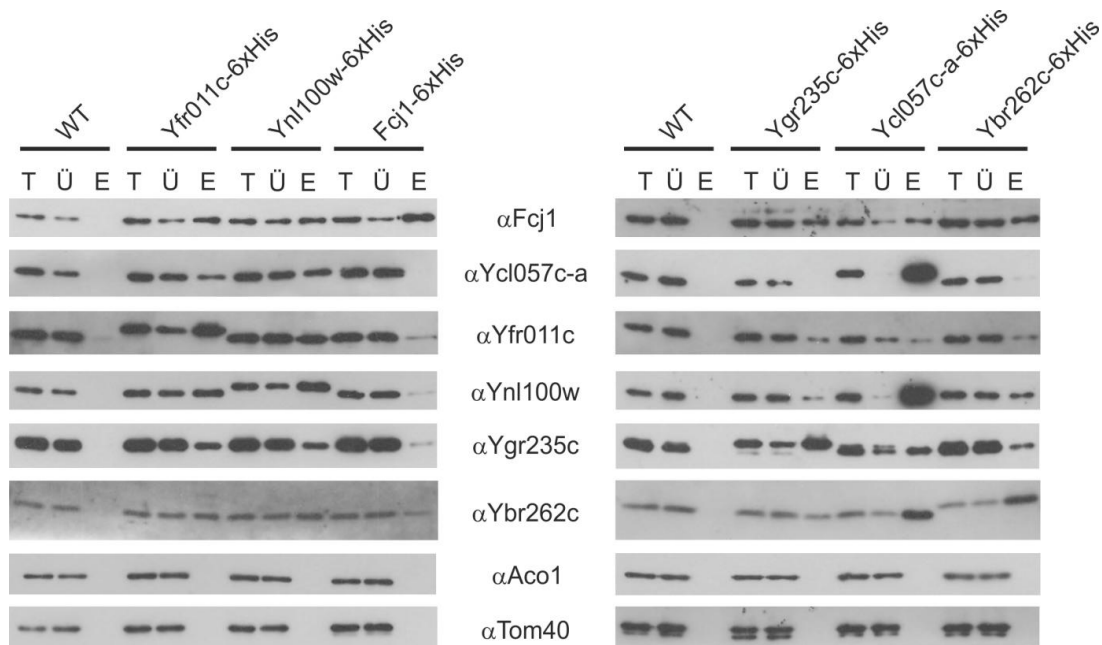


Abbildung 25. Potentielle Kontaktstellenproteine interagieren miteinander.

C-terminal 6xHis getagte Versionen der potentiellen Kontaktstellenproteine wurden unter Kontrolle ihres endogenen Promotors vom Chromosom exprimiert. Die Mitochondrien wurden isoliert, mit Digitonin solubilisiert und die Proteine mittels NiNTA affinitätsgereinigt. Als Kontrolle dienten YPH499 Wildtyp-Mitochondrien. Die Fraktionen: Solubilisierte Mitochondrien (T/Total), Ungebundenes Protein (Ü/Überstand) und Gebundenes Material (E/Eluat) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert.

Da die C-terminale Domäne von Fcj1 den am stärksten konservierten Bereich des Proteins darstellt, wurde vermutet, dass ein Tag hier zu einer Destabilisierung des Komplexes führt. Um dies zu testen, wurden die Co-Isolierungsexperimente mit N- und C-terminal His-getagten Versionen von Fcj1 wiederholt. Die entsprechenden DNA-Konstrukte wurden episomal von dem Plasmid pYX242 unter Kontrolle des TPI-Promotors exprimiert. Obwohl dies eine 5-10 fache Überexpression zur Folge hatte, konnten keine Komplexkomponenten mit Fcj1-His gereinigt werden. Durch Affinitätsreinigung mit His-Fcj1 hingegen war die Co-Isolierung sämtlicher Komplexkomponenten möglich (Abbildung 26). Dies zeigt deutlich die Bedeutung des nicht modifizierten C-Terminus dieses Proteins für die Stabilität des Komplexes. Andere mitochondrialen Proteine wie Tom40 oder Aconitase konnten in keinem der Experimente mit aufgereinigt werden, was die Aussagekraft der Ergebnisse bestätigt.

Um den hier identifizierten Komplex weiter zu analysieren, wurden YPH499 Wildtyp-Mitochondrien mit Digitonin solubilisiert und die mitochondrialen Komplexe über Blau-Nativ-PAGE (BN-PAGE) aufgetrennt. Mittels Immunoblotting konnten bei Verwendung von spezifischen Antikörpern gegen Fcj1, Ynl100w und Ygr235c zwei hoch molekulare Komplexe in der Größenordnung von 1,5 und 0,8 MDa identifiziert werden (Abbildung 27A). Diese werden im weiteren MICOS I und II (Mitochondrial Contact Site Complex/ mitochondrialer Kontaktstellen-Komplex) genannt.

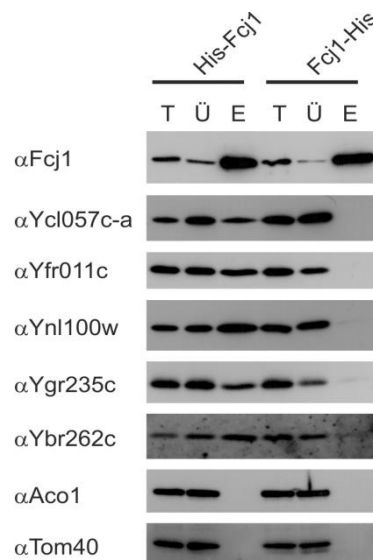


Abbildung 26. Der C-Terminus von Fcj1 ist essentiell für die Stabilität des Komplexes.

N- und C-terminal His-getagtes Fcj1 wurde vom Plasmid pYX242 in einem *Fcj1*-Deletionsstamm exprimiert. Die Mitochondrien wurden isoliert, mit Digitonin solubilisiert und Fcj1 mittels NiNTA affinitätsgereinigt. Als Kontrolle dienten YPH499 Wildtyp-Mitochondrien. Bezeichnungen wie in Abbildung 25.

Da die übrigen Antikörper bei BN-PAGE kein Signal ergaben, wurden Mitochondrien mit His-getagten Versionen dieser Proteine auf dieselbe Weise analysiert. Mittels Immunoblotting mit einem anti-His-Antikörper (penta-His; Qiagen) wurden in Ycl057c-a-His-Mitochondrien zwei Komplexe derselben Größen dekoriert (Abbildung 27B).

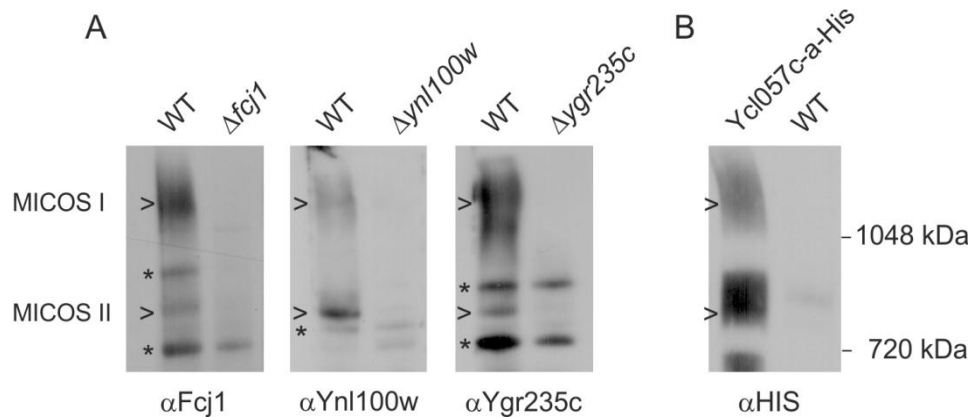


Abbildung 27. Die Mcs-Proteine bilden die hochmolekularen Komplexe MICOS I und II.

(A) Gleiche Mengen an YPH499 Wildtyp-Mitochondrien und Mitochondrien der angezeigten Deletionsmutanten wurden mit Digitonin solubilisiert und mittels BN-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Stern, Kreuzreaktionen der verschiedenen Antikörper.

(B) Im Fall von Mcs10 wurden gleiche Mengen an YPH499 Wildtyp-Mitochondrien und Mitochondrien eines Stammes verwendet, der Mcs10-His6 unter Kontrolle des endogenen Promotors vom Chromosom exprimiert.

In diesen Experimenten wurde die Interaktion der sechs potentiellen Kontaktstellenproteine nachgewiesen. Weiter deuteten die unterschiedlichen Co-Reinigungseffizienzen und die Relevanz von einzelnen Domänen der Proteine für die Stabilität der Interaktion auf ein komplexes Netzwerk hin. Diese Proteine bilden hochmolekulare Komplexe der Größen 1,5 und 0,8 MDa, die als MICOS I und II bezeichnet werden. Die Proteine, die im Zuge der Co-Isolierungsexperimente als Bestandteile von MICOS I und II identifiziert wurden, werden im Folgenden als Mcs-Proteine (Mitochondrial Contact Site/mitochondriale Kontaktstellen-Proteine) unter Beisetzung ihrer kalkulierten molekularen Masse in kDa bezeichnet. Die in

Tabelle 2 aufgeführten Mcs-Proteine sollten nun weiter charakterisiert werden.

Tabelle 2. Neue Bezeichnung der miteinander interagierenden Kontaktstellenproteine.

Linke Spalte: Systematischer Name.

Rechte Spalte: Neu eingeführte Nomenklatur; Mitochondrial Contact Site Protein (Mcs); Nummerierung entsprechend des kalkulierten Molekulargewichts in kDa.

| Systematischer Name | Mcs-Bezeichnung |
|---------------------|-----------------|
| Ycl057c-a | Mcs 10 |
| Yfr011c | Mcs 19 |
| Ynl100w | Mcs 27 |
| Ygr235c | Mcs 29 |
| Ybr262c | Mcs 12 |

2.3.4 Topologie der Kontaktstellenproteine

Sämtliche Mcs-Proteine waren zwar bereits den Mitochondrien zugeordnet, sonst aber vollständig uncharakterisiert. Daher wurden zunächst die Topologien mittels Untersuchung der Zugänglichkeit für Proteinase K (PK) und alkalischer Membranextraktion analysiert. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern gegen die Mcs-Proteine. Der Vollständigkeit halber wurde Fcj1, das schon früher untersucht worden war (Rabl et al., 2009), in die Analyse mit einbezogen.

Wie alkalische Extraktion zeigte, sind mit Ausnahme von Mcs19 alle Kontaktstellenproteine mitochondriale Membranproteine. Auch bei dem hohen pH-Wert von ca. 11,5 verblieben diese in der Pellet-Fraktion (P) (Abbildung 28). Dies stimmt mit den Ergebnissen der Hydrophobizitäts-Vorhersagen überein. Jedes der membranständigen Mcs-Proteine war erst nach Öffnung der Außenmembran durch hypotones Schwellen (Mitoplasten) für PK zugänglich. Die Mcs-Proteine sind daher der mitochondrialen Innenmembran zuzuordnen (Abbildung 28). Laut Hydrophobizitäts-Vorhersage ist Mcs10 mit einem TMS (Aminosäurereste AS 45-60) in der Membran verankert. Die Ergebnisse der PK-Behandlung von Mitochondrien mit einer C-terminal His-getagten Version ließen Schlüsse auf dessen Orientierung in der Membran zu. In Protease-behandelten Mitoplasten war keine Detektion mit einem spezifischen anti-His Antikörper mehr möglich. Somit ist der N-Terminus von Mcs10 in der Matrix und der C-Terminus im IMS lokalisiert. Im Fall von Mcs27 und Mcs29 ergaben die Hydrophobizitäts-Vorhersagen sehr ähnliche Profile. Für beide Proteine wurden zwei TMS vorausgesagt. Dies konnte durch Immunoblotting mit spezifischen Antikörpern gegen die Termini der beiden Proteine bestätigt werden. N- und C-Terminus sind sowohl bei Mcs27 als auch bei Mcs29 im IMS lokalisiert, wie die PK-Behandlung von Mitoplasten belegt. Mcs12 ist aufgrund von Sequenzanalysen und der hier dargestellten Ergebnisse mit einer N-terminalen TMS in der Innenmembran verankert; die C-terminalen ca. 70 AS sind im IMS lokalisiert. Mcs19 stellt eine Ausnahme dar. Laut Hydrophobizitäts-Vorhersagen weist es kein TMS auf. Dies stimmt mit den Ergebnissen der alkalischen Extraktion überein. Mcs19 konnte im Gegensatz zu den übrigen Mcs-Proteinen bei hohem pH in die Überstands-Fraktion überführt werden (Abbildung 28). Da Mcs19 bei PK-Behandlung von Mitoplasten abgebaut wird, handelt es sich um ein IMS-Protein. Das Signal eines spezifischen Antikörpers gegen Mcs19 ging in Mitoplasten ohne PK-Zugabe nicht verloren. Daher muss dieses Protein eine starke Assoziation eingehen. Dies kann auf zwei Arten erklärt werden. Erstens, Mcs19 interagiert mit den anderen Mcs-Proteinen. Zweitens, es ist direkt mit einer der mitochondrialen Membran assoziiert. Dies erscheint möglich, da Mcs19 ein N-terminales

Myristoylierung-Motiv ausweist. Das relativ hohe SILAC-Verhältnis in Fraktion 1 könnte darauf schließen lassen, dass Mcs19 zumindest teilweise direkt an die Außenmembran gebunden ist. Das hohe SILAC-Verhältnis in Fraktion 21, wiederum deutet darauf hin, dass eine Subpopulation im Intracristalbereich lokalisiert ist (Abbildung 24).

Die Tatsache, dass sowohl für Fcj1 als auch für die Kontrollproteine der einzelnen mitochondrialen Kompartimente die erwarteten Ergebnisse erzielt wurden, belegt die Aussagekraft der hier dargestellten Resultate.

Somit lässt sich abschließend sagen, dass alle sechs mitochondrialen Kontaktstellenproteine in der Innenmembran verankert oder an ihr assoziiert sind.

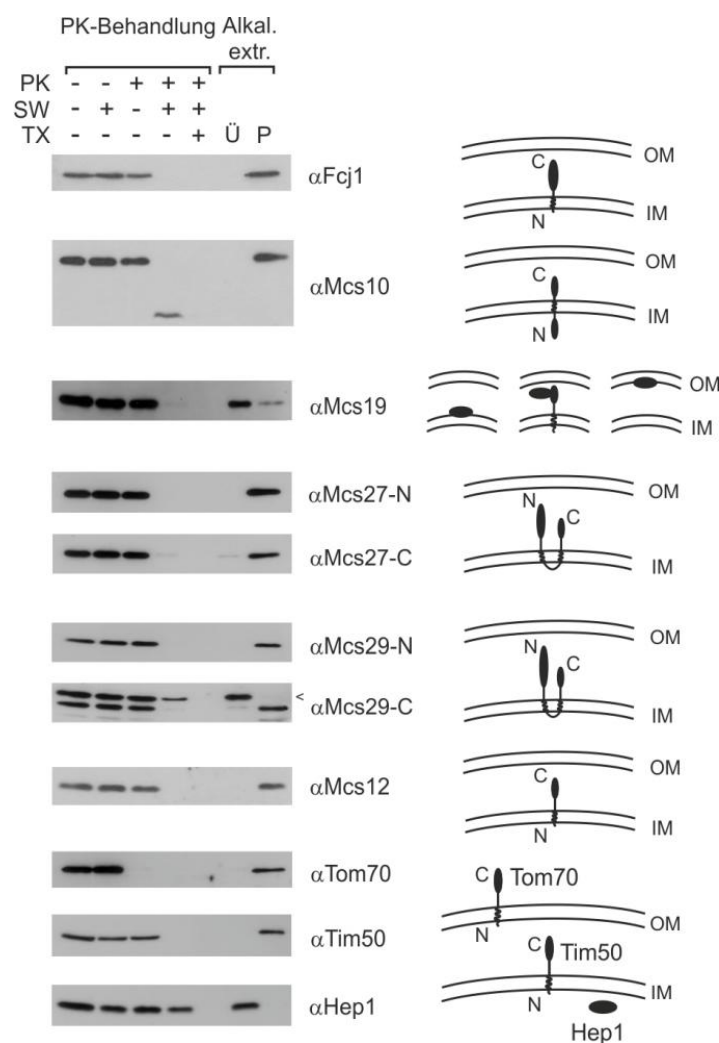


Abbildung 28. Topologie der Mcs-Proteine.

Wildtyp-Mitochondrien wurden isoliert und entweder unbehandelt belassen oder mit PK behandelt (links). Behandelt wurden, wie jeweils angezeigt intakte Mitochondrien, Mitoplasten und durch Triton X-100 lysierte Mitochondrien. Weiter wurden Wildtyp-Mitochondrien alkalischem Carbonatpuffer bei pH 11,5 ausgesetzt. Lösliche (Ü/Überstand) und membranintegrale Bestandteile (P/Pellet) wurden durch Zentrifugation voneinander abgetrennt. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und anschließendem Immunoblotting unter Verwendung der bezeichneten Antikörper. Der Pfeil deutet eine Kreuzreaktion des C-terminalen Mcs29 Antikörpers an.

Schematische Darstellung der Topologien. OM, outer membrane/Außenmembran; IM, inner membrane/Innenmembran

2.3.5 Submitochondriale Lokalisierung

Im Gegensatz zu anderen Innenmembranproteinen ist Fcj1 hauptsächlich in der IBM und dort an den Crista Junctions lokalisiert (Vogel et al., 2006). Um zu testen, ob die anderen MICOS-Komponenten ebenfalls diese spezielle submitochondriale Lokalisation aufweisen, wurden Stämme generiert, die die verschiedenen Mcs-Proteine und Fcj1 in 3xHA-markierter Version exprimieren. Die cryo-elektronenmikroskopische (EM) Analyse der Stämme wurde von Dr. Fulvio Reggiori und Janice Griffith (Department of Cell Biology and Institute of Biomembranes, University Medical Centre Utrecht) durchgeführt. Hierbei wurden die Stämme zunächst entweder auf lactat- oder glycerolhaltigem Medium kultiviert. Die submitochondriale Lokalisierung der HA-markierten Proteine erfolgte nach Fixierung, Einbettung und Schneiden mittels Immunodekoration mit anti-HA-Antikörper und 10nm großen Goldpartikeln. Die Genauigkeit der Lokalisation bei diesem Verfahren beträgt ± 20 nm und ist bedingt durch die Variabilität der Position der Immunglobuline.

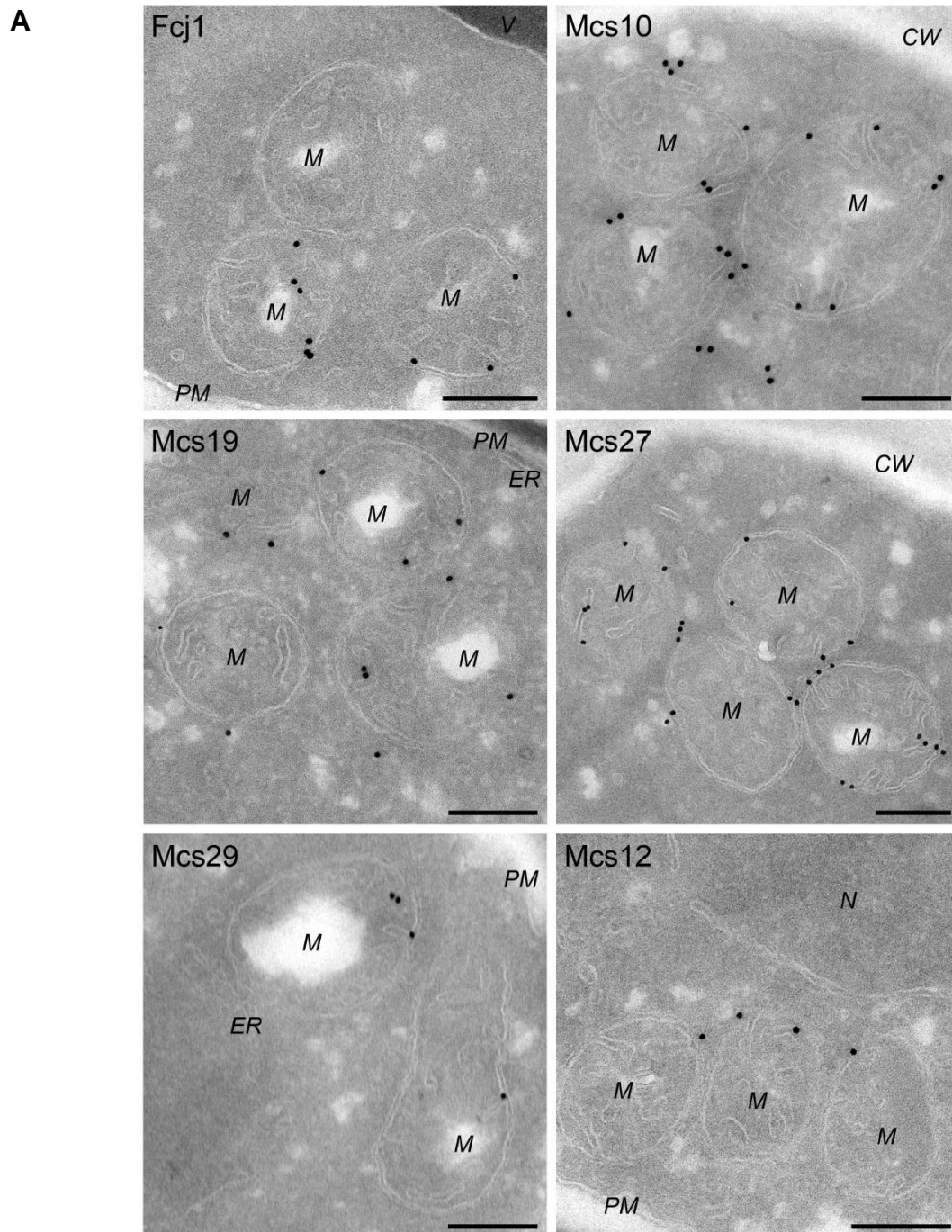
Wie die in Abbildung 29 gezeigten EM-Aufnahmen verdeutlichen, war der Signalhintergrund aufgrund von unspezifischer Bindung der Antikörper vernachlässigbar klein. Im Detail erbrachten diese Experimente für das schon früher analysierte Fcj1 ähnliche Ergebnisse. Es ist jedoch zu bemerken, dass bei der hier durchgeführten Versuchsreihe Fcj1 nahezu ausschließlich in der IBM zu detektieren war.

Eine sehr ähnliche submitochondriale Lokalisation wies Mcs10 auf. Dies war ebenfalls annähernd ausschließlich in der IBM zu detektieren. Innerhalb der IBM war Mcs10 bevorzugt an Stellen angesiedelt, an denen sich die Cristae in den Matrixraum einstülpen, den Crista Junctions (CJ). Dies wurde bei Betrachtung von Schnitten von Zellen, die aufgrund der Kultivierung in glycerolhaltigem Medium etwas weniger Cristae ausbilden, umso deutlicher. Bei den auf diese Weise erhaltenen etwas deutlicher kontrastierten Bildern lässt sich eindeutig erkennen, dass Mcs10 nicht nur in der IBM, sondern genau an den CJ angereichert ist (Abbildung 29).

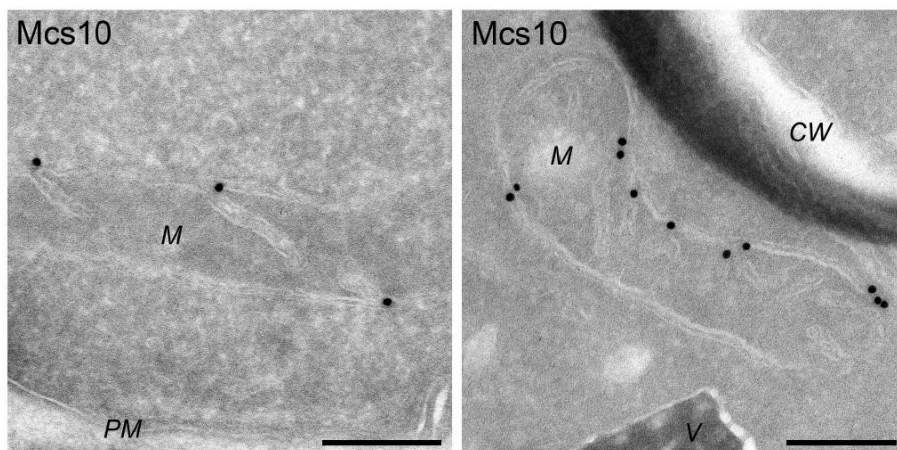
Mcs19 ist ebenfalls in der IBM angereichert. Allerdings war eine Subpopulation dieses Proteins in den Cristae zu detektieren. Dieses Ergebnis ist mit den vorher erhaltenen konform. In den Analysen der relativen SILAC-Verhältnisse zeigte Mcs19 einen verhältnismäßig hohen Wert in Fraktion 21. Dies deutet auf ein lösliches oder an die CM assoziiertes Protein hin, was mit den Cryo-EM-Aufnahmen bestätigt werden konnte.

Für die Proteine Mcs12, Mcs27 und Mcs29 wurden vergleichbare Ergebnisse erhalten. Sie sind bevorzugt in der IBM und teilweise direkt an den CJ lokalisiert.

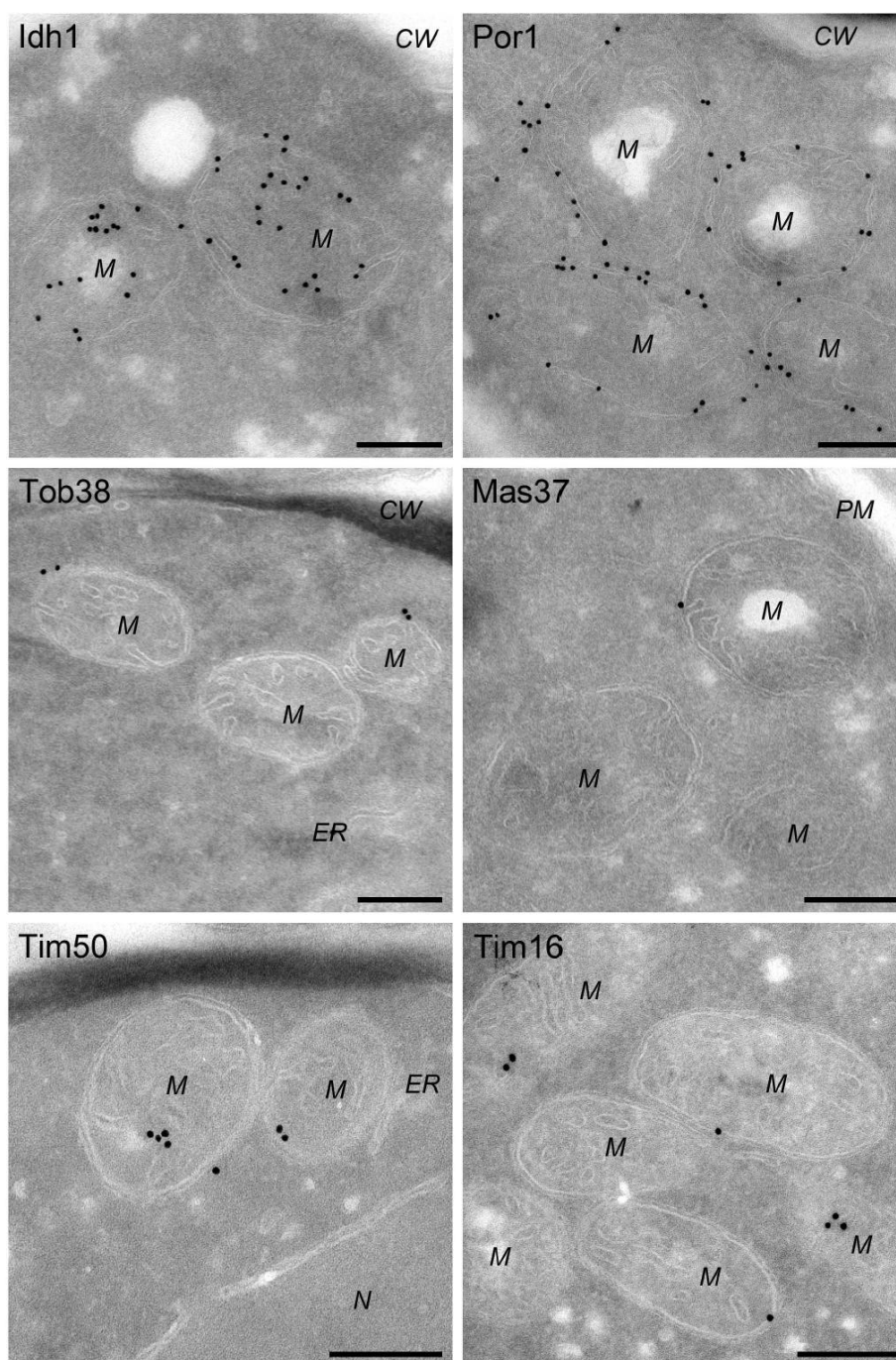
Als Kontrollen wurde die Lokalisation der mitochondrialen Außenmembranproteine Por1, Mas37 und Tob38, der Innenmembranproteine Tim16 und Tim50, sowie des löslichen Matrixproteins Idh1 analysiert. Diese brachten die erwarteten Ergebnisse und stärkten somit Aussagekraft der Ergebnisse, die für die Mcs-Proteine erhalten wurden.



B



C



D % der Goldpartikel an Crista Junctions

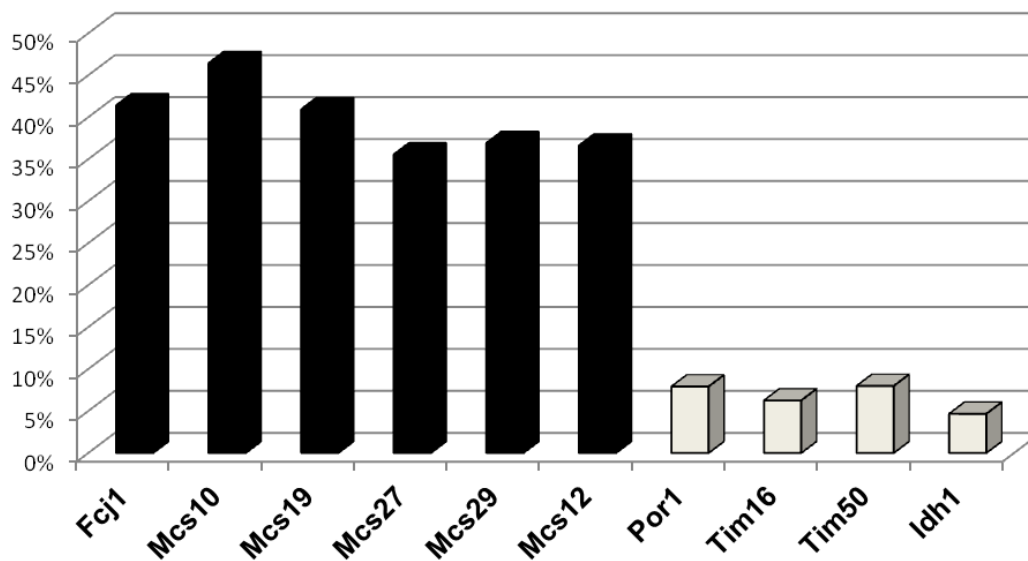


Abbildung 29. Bestimmung der submitochondrialen Lokalisation der MICOS-Komponenten mittels Immuno-EM.

Zellen, die HA-getagte Versionen der angezeigten Proteine exprimieren, wurden für Cryo-EM vorbereitet. Die Schnitte wurden mit anti HA-Antikörper und an ProteinA-gekoppelten Goldpartikeln markiert. Im Fall von Por1 wurde ein gegen dieses Protein spezifischer Antikörper verwendet. (A) Verteilung der Mcs-Proteine in auf Lactat kultivierten Zellen. (B) Verteilung von Mcs10 in auf Glycerol kultivierten Zellen. (C) Verteilung von mitochondrialen Proteinen der verschiedenen Subkompartimente in auf Lactat gewachsenen Zellen; Matrix (Idh1); mitochondriale Außenmembran (Por1, Tob38, Mas37); mitochondriale Innenmembran (Tim50, Tim16). CW, cell wall/Zellwand; M, Mitochondrium; N, Nukleus; PM, Plasmamembran; V, Vakuole; Größenbalken, 200 nm. (D) Quantitative Analyse der Verteilungen der Mcs-Proteine und der Kontrollproteine hinsichtlich direkter Lokalisation an CJ. Hierbei wurde der Prozentsatz an Goldpartikel ermittelt, die sich direkt an CJs befinden. Im Fall von Tob38 und Mas37 war aufgrund von geringer Markierung keine quantitative Aussage möglich.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sämtliche Mcs-Proteine bevorzugt in der IBM lokalisiert sind. Etwa 40% aller detektierten Goldpartikel, die an MICOS-Komponenten gebunden waren, waren direkt an den CJs lokalisiert. Im Gegensatz dazu konnten nur 5-8% der Kontrollproteine dort detektiert werden (Abbildung 29D). Offenbar ist der MICOS-Komplex, oder zumindest einige seiner Komponenten, wichtig für die Ausbildung bzw. Stabilität der CJ.

2.3.6 Phänotypen der Mcs-Deletionsmutanten

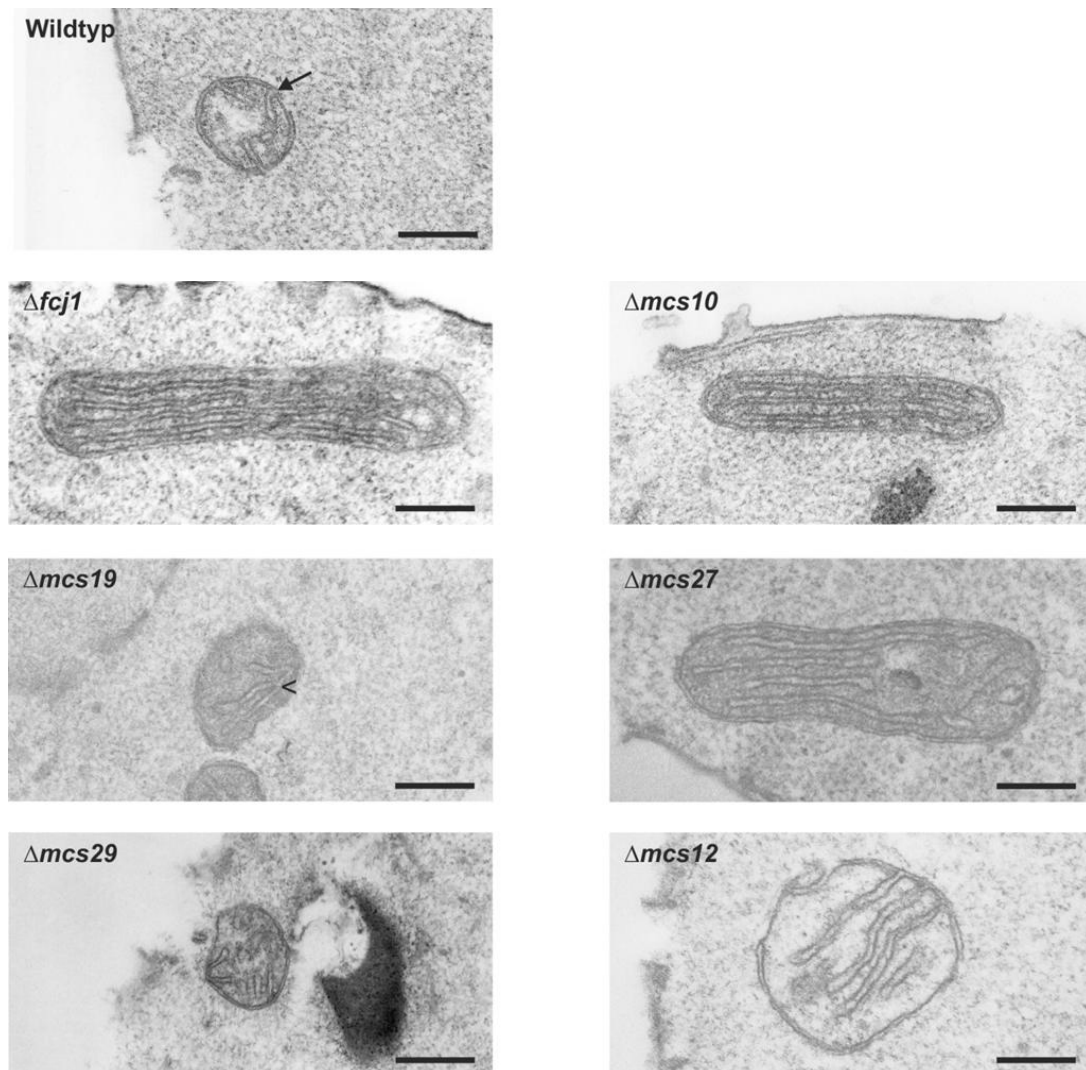
Da die MICOS-Komponenten vornehmlich an Crista Junctions lokalisiert sind und in einem *FCJI*-Deletionsstamm nahezu keine Crista Junctions mehr detektiert werden können (Rabl et al., 2009), wurde zunächst die Auswirkung der Deletion der MICOS-Komponenten auf die mitochondriale Ultrastruktur untersucht. Hierfür wurden im YPH499-Hintergrund die Gene der MICOS-Komponenten mittels homologer Rekombination ausgeschaltet. Die erfolgreiche Depletion der einzelnen Proteine wurde mit Hilfe von Immunoblotting verifiziert (Daten nicht gezeigt). Als Kontrolle wurde neben Wildtypzellen noch Zellen einer *FCJI*-Deletionsmutante analysiert. Die elektronenmikroskopische Analyse der hier hergestellten Deletionsstämme wurde von Christian Körner (Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie, LMU München) und Sabine Tost (Anatomisches Institut, LMU München) durchgeführt.

Abbildung 30A zeigt eine Auswahl von elektronenmikroskopischen Aufnahmen der analysierten Stämme. Wie zu erwarten war, wurden in den Mitochondrien einer *FCJI*-Deletionsmutante keine Crista Junctions detektiert. Interessanterweise zog die Deletion von *MCS10* einen annähernd identischen Phänotyp nach sich. Auch hier konnten in keinem der analysierten Schnitte Crista Junctions beobachtet werden. Die Cristae bildeten, ähnlich wie Zellen des *FCJI*-Deletionsstammes, stapelförmig angeordnete, vesikuläre Strukturen. In den übrigen Deletionsstämmen werden zwar Crista Junctions ausgebildet, doch wurde durch Quantifizierung deutlich, dass diese im Vergleich zum Wildtyp reduziert sind (Abbildung 30B). So ist deren Anzahl im *MCS19*-Deletionsstamm um 75% reduziert. Bemerkenswert ist zudem, dass Depletion dieses IMS-Proteins zur Ausbildung von internen Crista-Verzweigungen führt (Abbildung 30C). Auch Deletion von *MCS27* führt zu starker Reduktion der Anzahl von Crista Junctions. Verglichen mit Wildtyp-Mitochondrien sind die Cristae hier auch deutlich verlängert und annähernd parallel zueinander ausgerichtet. Die Deletion von *MCS29* hingegen führt nur zu geringer Reduktion der Anzahl der Crista Junctions. Die Deletion von *MCS12* zeigt ähnliche Auswirkung wie die von *MCS27*. Auch hier erscheinen die Cristae verlängert und parallel zueinander ausgerichtet. Allerdings ist hier die Reduktion der Anzahl der CJ mit ca. 70 % der Anzahl von Wildtyp-Mitochondrien deutlich geringer.

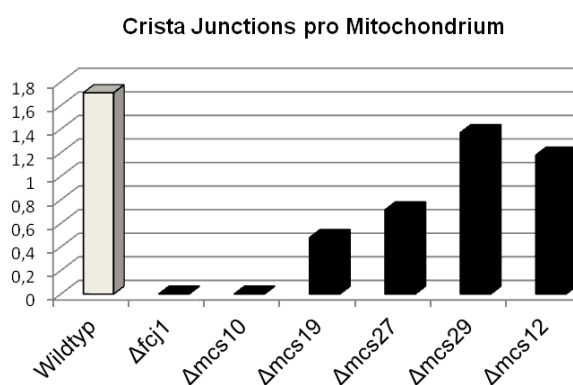
Zusammenfassend ist zu bemerken, dass die Deletion jeder MICOS-Komponente Änderungen in der mitochondrialen Architektur nach sich zieht. Diese Änderungen beziehen sich allerdings nicht nur auf die Anzahl der Crista Junctions. So sind häufig Verlängerungen der Cristae und Änderungen in deren räumlicher Anordnung und Struktur zu beobachten.

Somit könnte MICOS nicht nur wichtig für die Verbindung von IBM und CM sein, sondern auch für die generelle Organisation der Struktur der Cristae.

A



B



C

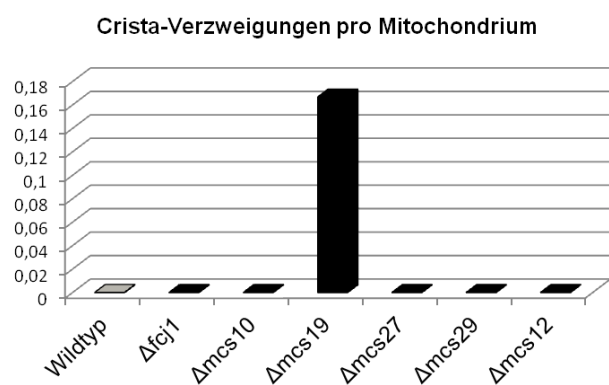


Abbildung 30. Depletion der MICOS-Komponenten führt zu Veränderungen in der mitochondrialen Architektur.

(A) Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Mitochondrien in Wildtyp-Zellen und Zellen von *MCS*-Deletionsstämmen. Pfeil, Crista Junction; Pfeilspitze, interne Crista-Verzweigung; Größenbalken, 200 nm. (B und C) Quantitative Auswertung der Aufnahmen. (B) Durchschnittliche Anzahl der Crista Junctions pro Mitochondrium. (C) Durchschnittliche Anzahl der internen Crista-Verzweigungen pro Mitochondrium.

Zur Analyse des Wachstumsphänotyps der verschiedenen Deletionsmutanten wurde einerseits Wachstum auf nicht-respiratorischem und respiratorischem Medium bei verschiedenen Temperaturen getestet. Andererseits wurde getestet, ob Minimalmedium anstelle von Vollmedium bei identischer Kohlenstoffquelle einen Einfluss auf das Wachstumsverhalten hat.

Die Depletion der verschiedenen Mcs-Proteine hat, wie auch schon früher für Fcjl gezeigt (Rabl et al., 2009), keine Auswirkung auf das Wachstumsverhalten auf glucosehaltigem Medium. Hierbei spielte es keine Rolle, ob den Zellen Vollmedium, oder synthetisches Medium angeboten wurde. Auch war keinerlei Temperatursensitivität zu beobachten (Abbildung 31A und B).

Die Analyse des Wachstumsverhaltens auf respiratorischem Medium hingegen zeigte im Fall von *FCJI*- und *MCS10*-Deletionsmutanten sehr starke Phänotypen. Deletion von *FCJI* bewirkt eine deutliche Temperatursensitivität. Wie in Abbildung 31C und D zu sehen ist, war der Phänotyp bei 24°C am stärksten und konnte durch Erhöhung der Temperatur deutlich abgemildert werden. Dies ist bei Deletion von *MCS10* nicht der Fall. In dieser Mutante ist unabhängig von Temperatur, Voll- und Minimalmedium nahezu kein Wachstum erkennbar, sofern die Zellen über die Kohlenstoffquelle zur Atmung gezwungen werden (Abbildung 31C und D).

Milde temperaturabhängige Wachstumsphänotypen auf respiratorischem Medium waren sich bei den *MCS12*- und *MCS27*-Deletionsstämmen zu beobachten. Hierbei wurde im Gegensatz zur *FCJI*-Deletionsmutante der Phänotyp mit steigender Temperatur deutlicher. Die Gabe von Voll- oder Minimalmedium spielte hingegen keine Rolle (Abbildung 31C und D). Deletion von *MCS19* und *MCS29* führten weder in Abhängigkeit von der Temperatur noch vom Medium zu einer erkennbaren Veränderungen im Wachstumsverhalten (Abbildung 31C und D).

Depletion der Mcs-Proteine führt somit zu Reduktion der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung oder sogar zu deren Verlust. Interessanterweise korreliert die Stärke der Wachstumsphänotypen sehr gut mit den Auswirkungen der Deletionen auf die mitochondriale Ultrastruktur. Dies deutet auf einen direkten Zusammenhang zwischen mitochondrialer Architektur und Funktion hin.

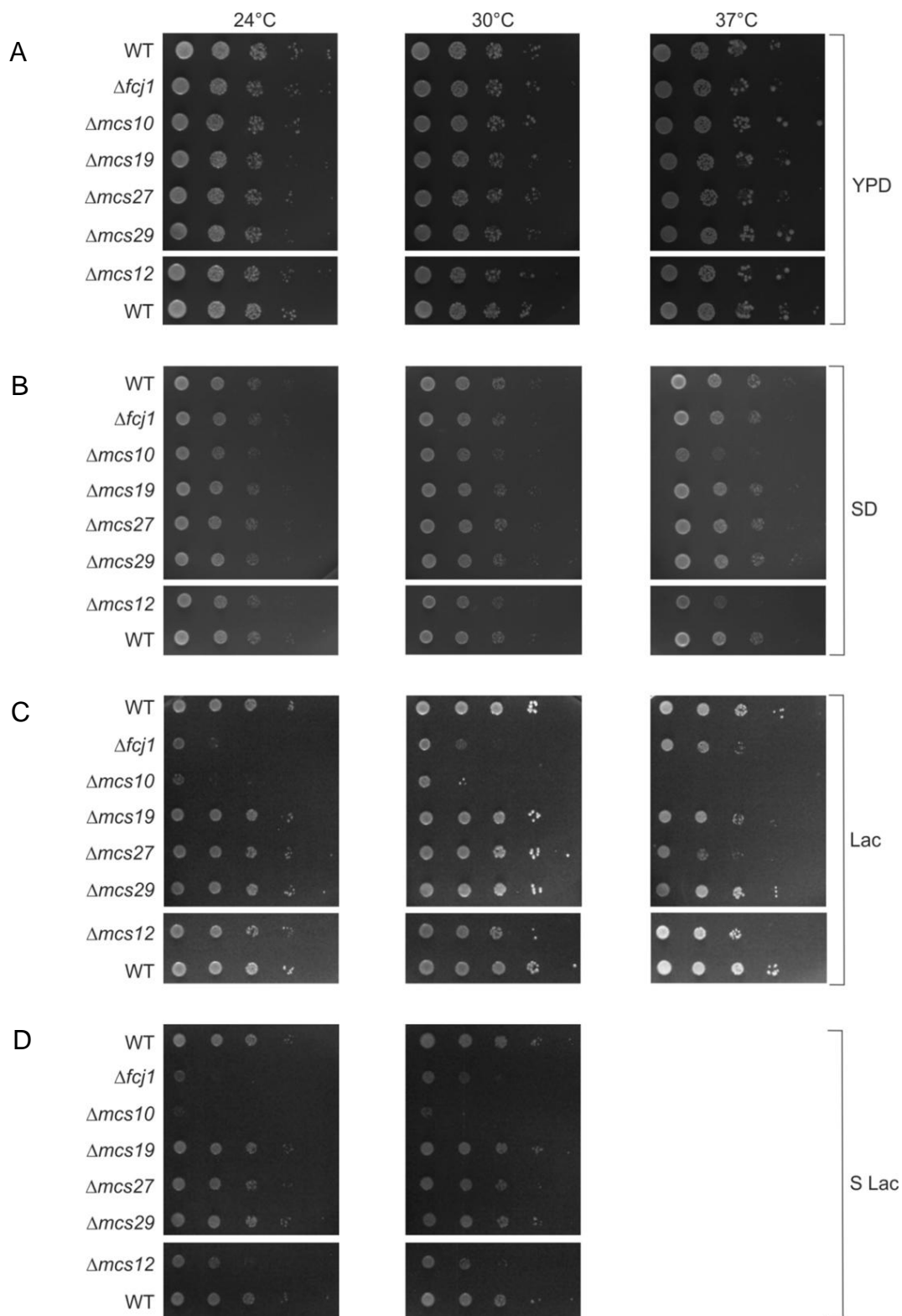


Abbildung 31. Wachstumstypen der Mcs-Deletionsmutanten.

Die Stämme Wildtyp und Deletionsmutanten der verschiedenen Mcs-Proteine wurden über Nacht bei 30°C in YPD-Medium kultiviert und in der logarithmischen Phase gehalten. Von diesen Kulturen ausgehend wurden Verdünnungsreihen hergestellt (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) und je 3 μ l auf die angegebenen Nährmedien aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei 24°C, 30°C oder 37°C auf folgenden Medien:

(A) Glucose und Hefeextrakt (YPD); (B) Synthetisches Medium mit Glucose als C-Quelle (SD); (C) Lactat und Hefeextrakt (Lac); (D) Synthetisches Medium mit Lactat als C-Quelle (SLac). Keiner der Stämme zeigte Wachstum bei 37°C auf SLac Medium.

2.3.7 Interaktion der Kontaktstellenproteine mit Proteinen der mitochondrialen Außenmembran

Die spezifische Anreicherung von Fcj1 und den Mcs-Proteinen in den Fraktionen intermediärer Dichte (siehe Abbildung 24) kann durch das Vorhandensein von Vesikeln, die sowohl aus Außenmembran als auch aus Innenmembran bestehen, erklärt werden. Derartige Vesikel können zum einen durch Proteine, die wie GFP-Tim23:24°C beide Membranen durchspannen, zum anderen durch Protein-Protein-Interaktion zwischen Innen- und Außenmembranproteinen entstehen. Weder Fcj1 noch eines der Mcs-Proteine durchspannt die mitochondriale Außenmembran, wie durch die PK-Behandlungen gezeigt werden konnte (Abbildung 28). Daher ist die letztere Erklärung die wahrscheinlichere.

Um einen Hinweis auf einen Interaktionspartner zu bekommen, wurden zunächst die Resultate der SILAC-Analysen im Detail betrachtet. Hier fällt auf, dass der weitaus größte Teil der Außenmembranproteine in Fraktion 11, der Peakfraktion der MICOS-Komponenten, nur sehr gering vertreten sind (siehe Abbildung 23A). Die Komponenten des TOB-Komplexes stellten allerdings eine Ausnahme dar. Wie Abbildung 32A zeigt, waren die Werte der relativen SILAC-Verhältnisse von Tob38 und Tob55 verglichen mit den Werten von Tom40 in den mittleren Fraktionen 9-13 deutlich erhöht. Dass es sich hier um eine signifikante Erhöhung handelte, wurde bei weiterer Prozessierung der Primärdaten offensichtlich. Bei Subtraktion der relativen SILAC-Verhältnisse der einzelnen Fraktionen von zwei Außenmembranproteinen wie Tom40 und OM14 resultierten daraus Werte um den Nullpunkt. Bei analoger Behandlung der Daten von Tob55 hingegen wurde deutlich, dass eine Subpopulation dieses Proteins in Fraktion 11 angereicherten Vesikeln zu finden war (Abbildung 32B). Nach Normalisierung der prozessierten Daten für die TOB-Komplex-Komponenten ist die starke Ähnlichkeit zu den Profilen der Mcs-Proteine zu erkennen (Abbildung 32C).

Neben den erhöhten Werten der TOB-Komponenten in den mittleren Fraktionen zeigte ein weiterer Komplex der mitochondrialen Außenmembran diese Auffälligkeit, der Komplex bestehend aus Ugo1 und Fzo1, der für mitochondriale Fusion nötig ist (Sesaki und Jensen, 2001). Nach Prozessierung der Primärdaten der SILAC-Analyse von Ugo1 und Fzo1 analog zu den Daten der TOB-Komponenten erkennt man eine ähnliche Überlappung der Profile mit denjenigen der MICOS-Komponenten (Abbildung 32D). Dies ist bemerkenswert, da Ugo1-Fzo1 bislang noch nicht mit Proteinen, die für mitochondriale Ultrastruktur verantwortlich sind, in Verbindung gebracht wurden.

Die Anreicherung von Tob55 und Ugo1 konnte mittels SDS-PAGE und Immunoblotting von entsprechend hergestellten Proben bestätigt werden (Abbildung 32D).

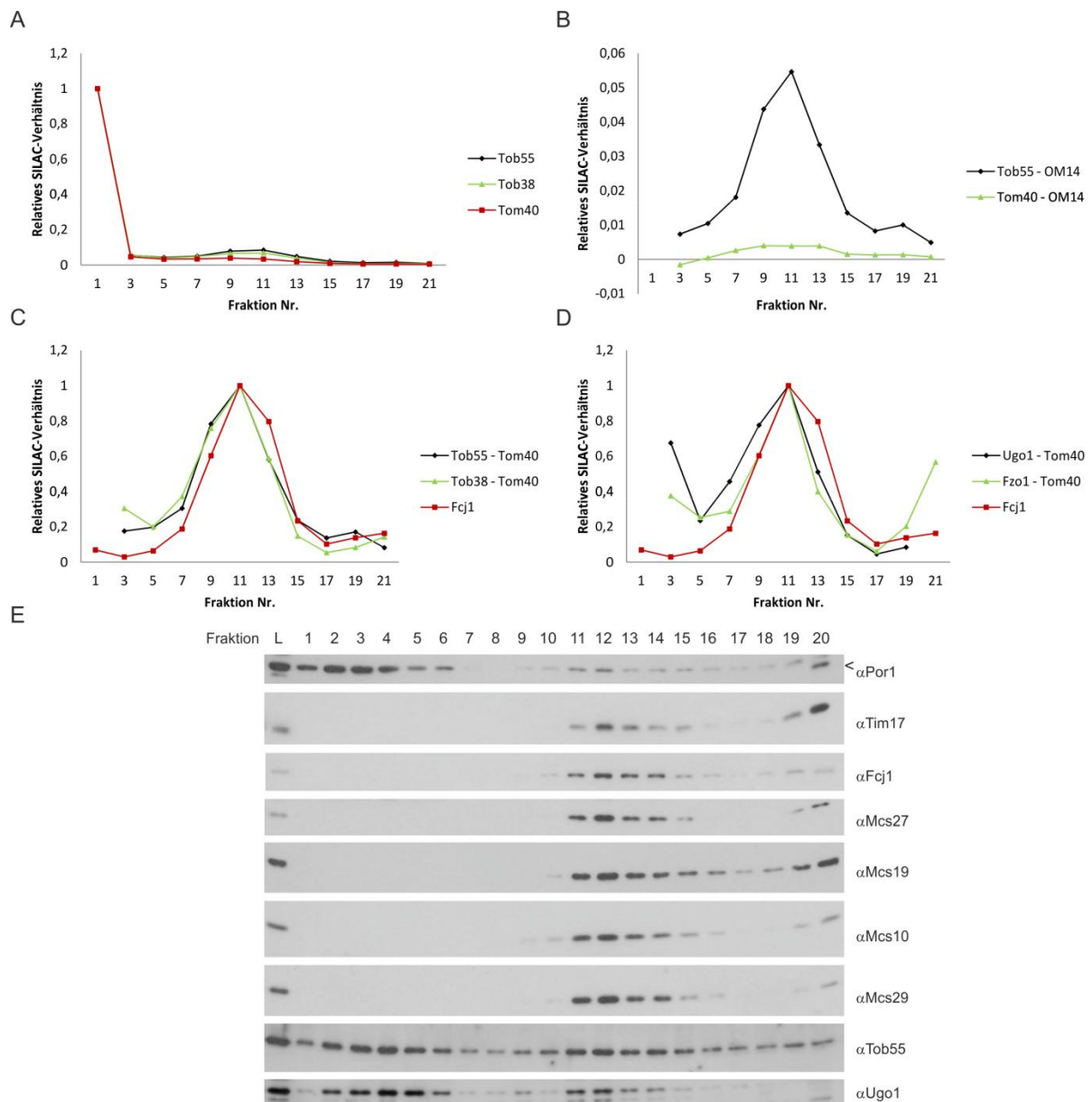


Abbildung 32. Der TOB-Komplex und Ugo1 in der mitochondrialen Außenmembran sind potentielle Interaktionspartner von MICOS.

(A) Relative SILAC-Verhältnisse der mitochondrialen Außenmembranproteine Tob55, Tob38 und Tom40.

(B) Subtraktion des relativen SILAC-Verhältnisses des Außenmembranproteins OM14 von den SILAC-Verhältnissen von Tob55 und Tom40.

(C) Gegenüberstellung der Profile von TOB-Komponenten, bearbeitet wie in (B), zu dem von Fcj1.

(D) Gegenüberstellung der Profile von Ugo1 und Fzo1, bearbeitet wie in (B), zu dem von Fcj1.

(E) Wildtyp-Zellen wurden auf Lactat-Medium bei 24°C kultiviert. Die isolierten Mitochondrien wurden mit Ultraschall behandelt und die entstandenen Membranvesikel einer Gleichgewichtszentrifugation unterzogen. Nach Auftrennung der Vesikel im Saccharosegradienten erfolgte die Analyse der Fraktionen mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der angegebenen Antikörper. L, Auftrag auf den Gradienten; 1-20, Fraktionszahl von niedriger zu hoher Dichte. Der Pfeil indiziert eine Kreuzreaktion des verwendeten anti-Por1 Antikörpers.

Auf Grundlage der hier dargestellten Beobachtungen, sollte im Folgenden untersucht werden, ob eine Interaktion von MICOS-Komponenten mit dem TOB-Komplex und Ugo1 gezeigt werden kann.

Mitochondrien wurden entweder aus Mcs19-6xHis oder Mcs27-6xHis exprimierenden Zellen isoliert, mit Digitonin solubilisiert und einer NiNTA-Affinitätschromatographie unterzogen. Dabei wurde die Co-Isolierung von Tob55 beobachtet. Außerdem konnte eine Interaktion von Ugo1 mit Fcj1, nicht aber mit den anderen MICOS-Komponenten, nachgewiesen werden. Die letztere Interaktion konnte nur bei Verwendung des Detergens TritonX-100 detektiert werden. Die Verlässlichkeit des Ergebnisses wird hier, wie im Fall der TOB Co-Reinigung, durch die Abwesenheit der dekorierten Proteine in der Wildtyp-Eluatfraktion und der Abwesenheit der Kontrollproteine Por1 und Tim17 in den Eluatfraktionen der getagten Proteine belegt (Abbildung 33).

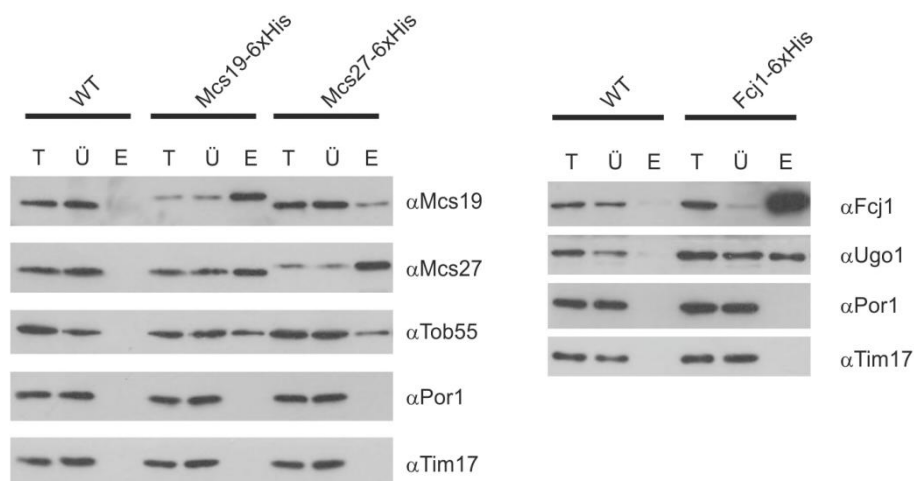


Abbildung 33. Interaktion von MICOS Komponenten mit den mitochondrialen Außenmembranproteinen Tob55 und Ugo1.

C-terminal 6xHis-getagte Versionen von Mcs19, Mcs27 und Fcj1 wurden unter Kontrolle ihres endogenen Promotors vom Chromosom exprimiert. Die Mitochondrien wurden isoliert, solubilisiert und mittels NiNTA affinitäts gereinigt. Als Kontrolle dienten Wildtyp-Mitochondrien. Die Fraktionen: Solubilisierte Mitochondrien (T/Total), Ungebundenes Protein (Ü/Überstand) und Gebundenes Material (E/Eluat) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert. Links: Interaktion von Mcs19 und Mcs27 mit Tob55; Rechts: Interaktion von Fcj1 mit Ugo1.

Um diese Ergebnisse weiter zu untermauern, wurden submitochondriale Vesikel eines *FCJI*-Deletionsstammes untersucht. Die Generation der Vesikel und deren Auftrennung erfolgten wie beschrieben. Bemerkenswerterweise wurden deutliche Unterschiede zum Wildtyp festgestellt (vgl. Abbildung 32E). So waren die MICOS-Komponenten Mcs10 und Mcs29 nicht mehr in Fraktionen intermediärer Dichte, sondern in Fraktionen hoher Dichte angereichert. Dies entspricht einer Verteilung, die für Innenmembranproteine wie Tim17 typisch ist. Für Ugo1 wiederum wurde im Wildtyp eine deutliche Subpopulation in Fraktionen intermediärer Dichte nachgewiesen werden. Diese ist nach Depletion von *Fcj1* vollständig abwesend. Somit war keine Unterscheidung zwischen Ugo1 und dem Außenmembranprotein Por1 mehr möglich (Abbildung 34).

Diese Ergebnisse bestätigen nicht nur die Folgerungen aus den Co-Reinigungsexperimenten, sondern zeigt nochmals deutlich, dass Kontaktstellen in Fraktionen intermediärer Dichte angereichert werden können.

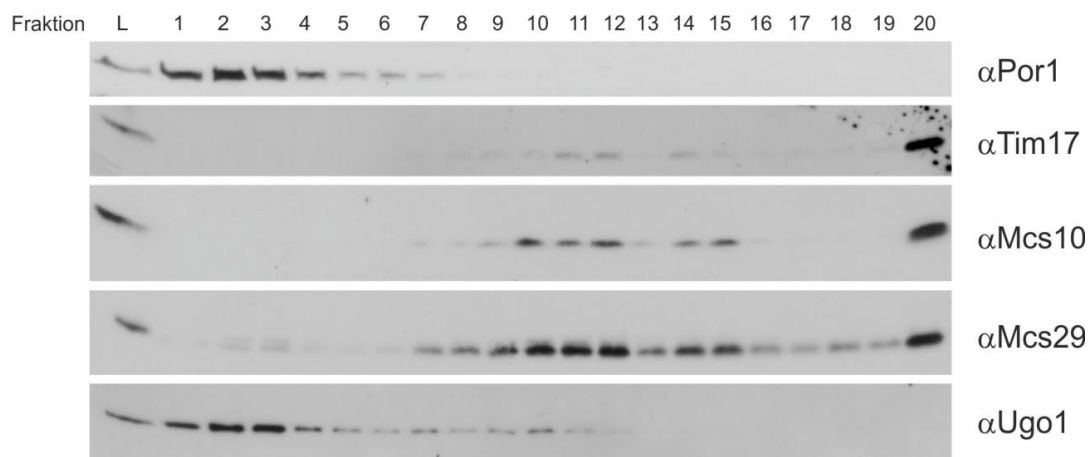


Abbildung 34. Deletion von *FCJI* führt zu einer veränderten Verteilung der Mcs-Proteine und Ugo1 in submitochondrialen Vesikeln.

Ein *Fcj1*-Deletionsstamm wurde auf Lactat-Medium bei 24°C kultiviert und die Mitochondrien isoliert. Aus den isolierten Mitochondrien wurden mittels Beschallung Vesikel generiert und diese über einen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung der angegebenen Antikörper analysiert.

Auf der Basis dieser Ergebnisse konnte hier eine Interaktion der MICOS-Komponenten Mcs19 und Mcs27 mit dem TOB-Komplex nachgewiesen werden. Eine Subpopulation von TOB bildet somit zusammen mit MICOS eine stabile Kontaktstelle zwischen mitochondrialer Außen- und Innenmembran aus. Überdies konnte durch die Interaktion von *Fcj1* mit Ugo1 gezeigt werden, dass die Kontaktstellen mit TOB nicht die einzige sind. Ob diese Interaktion allerdings ausschließlich über *Fcj1* möglich ist und *Fcj1* somit unabhängig von MICOS in der Innenmembran vorhanden ist, ist zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt.

3 Diskussion

Im Zentrum der vorliegenden Arbeit stehen zwei grundlegende Fragen: Besteht die Möglichkeit der lateralen Freisetzung von importierten Proteinen aus dem Kanal des TOM-Komplexes in die mitochondriale Außenmembran? Wie ist die molekulare Zusammensetzung von Kontaktstellen zwischen den beiden mitochondrialen Membranen und welche Funktion haben diese Kontaktstellen?

Um in Erfahrung zu bringen ob es möglich ist mitochondriale Membranvesikel zu generieren und aufzutrennen, in welchen Kontaktstellenproteine angereichert sind, sollte ein Fusionsprotein hergestellt werden, das die beiden Membranen der Mitochondrien, die Außenmembran und die innere Grenzmembran (inner boundary membrane/IBM), permanent überspannt. Schon früher wurde gezeigt, dass insbesondere Vorstufenproteinen, an die IgG oder ProteinA gebunden wurde, zum Steckenbleiben in der Translokase der mitochondrialen Außenmembran tendieren (Schulke et al., 1997; Schwaiger et al., 1987). Die Verwendung eines Fusionsproteins, das nach dem Import in der TOM-Pore verbleibt, würde zu starken Kontaminationen der Kontaktstellenprotein-enthaltenden Vesikel mit Außen- und Innenmembranproteinen führen und daher keine Aussage über die spezifische Anreicherung anderer Proteine zulassen. Aufgrund dessen müsste zunächst geklärt werden, ob eine laterale Freisetzung des Fusionsproteins GFP-Tim23 aus dem TOM-Komplex stattfinden kann. Falls dies der Fall ist, erfüllt GFP-Tim23 alle erforderlichen Voraussetzungen um als Markerprotein zur Identifizierung von Kontaktstellenproteinen zu dienen, da es beide mitochondrialen Membranen überspannen sollte (Vogel et al., 2006).

3.1 Die Lokalisation der GFP-Domäne des Fusionsproteins GFP-Tim23 ist abhängig von der Wachstumstemperatur

Zunächst ist festzuhalten, dass fest gefaltete Domänen den TOM-Komplex nicht passieren können. Fusion von IgG an Tim23 selbst führt zu cytosolischer Lokalisation der IgG-Domäne (Donzeau et al., 2000). Ob das Fusionsprotein die TOM-Pore verlassen kann, wurde bislang noch nicht gezeigt.

In der hier vorgelegten Arbeit wurde ein Fusionsprotein aus GFP und Tim23 im Detail hinsichtlich seiner Topologie nach Expression in Hefezellen, die defizient in der Wildtypform von Tim23 waren, untersucht. Überraschenderweise stellte sich eine Abhängigkeit der Lokalisation von zwei Variablen heraus: der Wachstumstemperatur und der

Zusammensetzung des Wachstumsmediums. Der Einfluss der Temperatur stellte sich als besonders gravierend heraus. Wurden GFP-Tim23 exprimierende Zellen bei 24°C kultiviert, war die GFP-Domäne an der Oberfläche der Mitochondrien exponiert, bei Kultivierung bei 37°C war diese im intermembran Bereich (intermembrane space/IMS) lokalisiert (Abbildung 35). Erklärungen hierfür ergeben sich aus den physikalischen Eigenschaften von GFP und den Gegebenheiten des mitochondrialen Proteinimports. Die reife, gefaltete Form von GFP ist ein sehr stabiles Protein. GFP wurde erstmals 1962 aus der Meeresqualle *Aequorea victoria* isoliert (Shimomura et al., 1962). Deren natürliches Habitat ist der Nordwest-Pazifik; wohl deswegen liegt das Temperaturoptimum für die Faltung von GFP unter 20°C. Bei Temperaturen um 37°C hingegen faltet die Wildtypform dieses Proteins nur noch sehr ineffizient.

In dieser Arbeit wurde eine Form von GFP verwendet, die sich in den Punktmutationen Serin 65 zu Threonin und Glutamin 80 zu Arginin von der Wildtypform unterscheidet. Keine der beiden Mutationen hat Einfluss auf das Temperaturoptimum der Faltung des Proteins (Tsien, 1998). Der Proteinimport in die Mitochondrien hingegen ist bei höheren Temperaturen effizienter als bei niedrigeren (Gaume et al., 1998). Ein Zusammenspiel von Faltungseffizienz von GFP und Effizienz des Proteinimports bei Änderung der Wachstumstemperatur von 24°C auf 37°C bietet sich demnach als Erklärung für die unterschiedliche Lokalisation der GFP-Untereinheit des Fusionsproteins an.

Eine andere Erklärung könnte die spontane Entfaltung von GFP durch thermische Energie sein. Dieses Modell wurde von Gaume und Kollegen für die Entfaltung von DHFR vorgeschlagen. Hier wurde eine spontane Entfaltung der DHFR-Untereinheit des Fusionsproteins Su9-DHFR mit Erhöhung der Temperatur beobachtet. Diese korrelierte mit

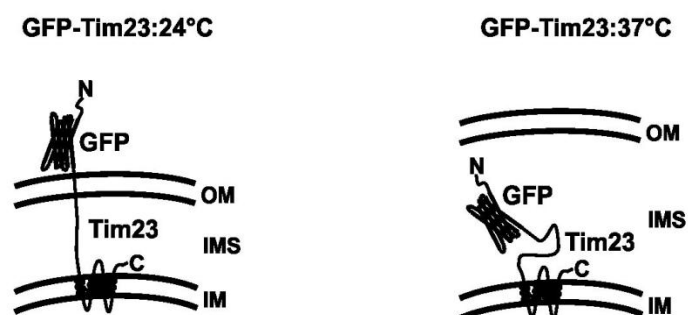


Abbildung 35. Die Topologie des Fusionsproteins ist abhängig von der Wachstumstemperatur.

(links) Topologie des Fusionsproteins bei Zellwachstum bei 24°C.

(rechts) Topologie des Fusionsproteins bei Zellwachstum bei 37°C.

Abkürzungen: OM, Außenmembran; IMS, Intermembranbereich; IM, Innenmembran

der Steigerung der Importeffizienz (Gaume et al., 1998). Gleichzeitig war der Import eines analogen Fusionsproteins mit einer mutierten und daher nicht zur Faltung fähigen Variante von DHFR nicht temperaturabhängig. Ähnliche Ergebnisse erhielten auch Kanamori und Kollegen. Ob gefaltetes GFP durch eine Temperaturerhöhung von 24°C auf 37°C entfaltet werden kann, ist allerdings wenig wahrscheinlich. Es wurde aber schon früher über eine entfaltungsfördernde Wirkung des TOM-Komplexes auf gebundene Substrate spekuliert (Kanamori et al., 1999). Somit könnte eine Kombination aus spontaner Entfaltung durch thermische Energie und dem TOM-Komplex als entfaltungsfördernde Komponente die Ursache für die Lokalisation der GFP-Untereinheit im IMS bei 37°C sein. Welche Erklärung für die unterschiedliche Lokalisation der GFP-Domäne zutrifft bleibt an dieser Stelle offen.

Abschließend lässt sich sagen, dass bei Verwendung von Fusionsproteinen eine genaue Kontrolle der Lokalisation nötig ist. Dies trifft insbesondere auf Proteine der inneren mitochondrialen Membran zu. Interessanterweise kann bei Fusionsproteinen mit GFP durch Veränderungen in den Wachstumsbedingungen direkt auf die submitochondriale Lokalisation Einfluss genommen werden.

3.1.1 GFP-Tim23:37°C führt zu vermindertem Zellwachstum aufgrund von vermindertem Proteinimport

Die Expression von GFP-Tim23 in einem *TIM23*-Deletionsstamm bei 37°C führt zu vermindertem Zellwachstum aufgrund von reduziertem Proteinimport. Überexpression dieses Fusionsproteins bei sonst identischen Bedingungen hat sogar annähernd letale Folgen. Wird derselbe Stamm jedoch bei 24°C kultiviert, kann GFP-Tim23 die Deletion von *TIM23* komplementieren. Wie lässt sich dies erklären?

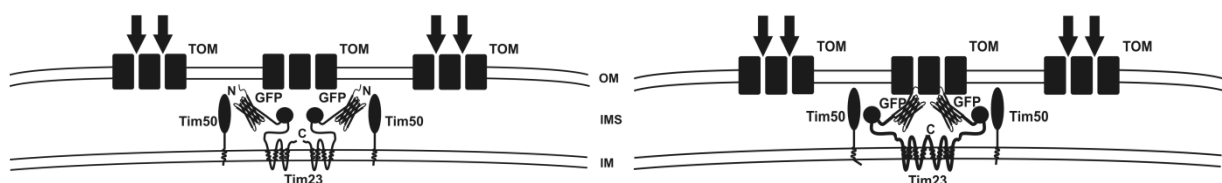


Abbildung 36. Alternative Modelle zur Erklärung der reduzierten Funktionalität der mitochondrialen Proteintranslokasen aufgrund der Präsenz der GFP-Domäne von GFP-Tim23 im IMS.

Links: gestörte Interaktion von Tim50 mit dem N-Terminus von Tim23 durch die GFP-Domäne.

Rechts: Blockierung eines Teils der TOM-Poren durch die GFP-Domäne. Aufgrund der höheren Abundanz des TOM-Komplexes im Vergleich zum TIM23-Komplex können die verbleibenden freien TOM-Kanäle für den Proteinimport genutzt werden. Abkürzungen: OM, Außenmembran; IMS, Intermembranbereich; IM, Innenmembran

Einerseits könnte durch die Präsenz der großen GFP-Domäne im IMS die Interaktion zwischen TIM23 Komponenten, wie Tim50 und Tim23 gestört sein. Andererseits könnte GFP im IMS die TOM-Pore von innen verschließen (Abbildung 36).

Für die erste Erklärung spricht der wesentlich stärkere Importdefekt von TIM23-abhängigen Vorstufenproteinen verglichen mit TIM23-unabhängigen Vorstufenproteinen. Wie kürzlich veröffentlicht wurde, ist die Interaktion von Tim50 mit einer Coiled Coil-Domäne von Tim23 zwischen den Aminosäureresten 68-85 essentiell für die Funktion der Translokase. Störung dieser Interaktion durch Insertion von Punktmutationen führte zu erheblichem Defekt der TIM23-Translokase und verminderter Lebensfähigkeit der Zellen. Allerdings konnte bei diesen Studien kein Importdefekt für TIM23-unabhängige Vorstufenproteine festgestellt werden (Gevorkyan-Airapetov et al., 2009; Tamura et al., 2009).

Für die zweite Erklärung spricht der detektierbare Importdefekt hinsichtlich der TIM23-unabhängigen Vorstufenproteine. Dieser lässt sich durch einen in seiner Funktionalität beeinträchtigten TIM23-Komplex nicht erklären. Für eine Blockade des TOM-Komplexes von IMS Seite könnte zudem die drastische Verschärfung des Phänotyps durch Überexpression von GFP-Tim23 sprechen. Diese sollte bei Störung der Tim23-Tim50 Interaktion keine weitere Auswirkung auf das Zellwachstum nach sich ziehen, wohl aber, wenn dadurch der Großteil der TOM-Poren blockiert wird. Diese sind verglichen mit Wildtyp-Tim23 viermal häufiger (Sirrenberg et al., 1997). Somit wären bei dreifach stärkerer Expression von GFP-Tim23 verglichen mit Wildtyp-Tim23 ca. 75% der TOM-Poren blockiert. Da aber der Importdefekt von Tim23-Substraten klar stärker ist, kann dieses Modell ebenfalls nicht vollständig überzeugen.

Zusammenfassend ist wohl eine Kombination der beiden Erklärungen wahrscheinlich. Dies würde zu generellem Importdefekt führen, mit besonders starker Ausprägung auf den Import TIM23-abhängiger Vorstufenproteine.

3.1.2 Laterale Freisetzung aus der TOM-Pore in die Außenmembran ist möglich

Zur Klärung der Frage, ob eine Freisetzung von Vorstufenproteinen lateral aus dem TOM-Komplex möglich ist, wurden verschiedene Fusionsproteine von GFP mit Tim23 verwendet. Diese müssen den TOM-Komplex passieren, da Tim23 über den TOM-TIM22-Weg importiert wird (Kaldi et al., 1998). Bei Wachstum der Zellen bei 24°C war die GFP-Untereinheit cytosolisch lokalisiert. Mittels Import- und Co-Isolierungsexperimente konnte gezeigt werden, dass in diesem Fall GFP-Tim23 den TOM-Kanal verlassen hat. Der

Austausch der ersten 20 Aminosäuren von Tim23 durch eine hydrophile Sequenz hingegen führte sowohl zu Importdefekten, als auch zu Co-Reinigung von TOM-Komponenten. Fusionsproteine, bei welchen die N-terminalen Aminosäurereste 1-20 mit α -helikalen Transmembransegmente (TMS) von Außenmembranproteinen ersetzt wurden, konnten hingegen in die Außenmembran inseriert werden. Dies legt den Schluss nahe, dass die Sequenz entscheidend dafür ist, ob eine Freisetzung erfolgen kann.

Die Suche nach Sequenzelementen, die für eine laterale Sortierung nötig sind, gestaltet sich allerdings schwierig. Der N-Terminus von Tim23 weist laut Strukturvorhersage im Gegensatz zu dem TMS Tom22- und Mim1 β -Faltblatt-Struktur auf. So erscheint eine geringe Sequenzähnlichkeit nicht überraschend. Allerdings konnte auch zwischen den α -helikalen TMS von Tom22 und Mim1 keine Ähnlichkeit in Form einer Konsensussequenz festgestellt werden. Alle drei Sequenzen weisen aber, laut Vorhersageprogramm, Phosphorylierungsstellen auf. Wie kürzlich gezeigt wurde, können derartige Modifikationen maßgeblichen Einfluss auf die Importkompetenz des TOM-Komplexes haben (Schmidt et al., 2011). Ob Phosphorylierung von Vorstufenproteinen Einfluss auf den Import oder die Sortierung hat, wurde bislang nicht gezeigt. Weiter tragen Tom22 und Mim1 in den Regionen um die TMS geladene Aminosäuren. Schon früher konnte die Wichtigkeit solcher Ladungen für die laterale Sortierung von Vorstufenproteinen mit Stopp-Transfer-Sequenzen durch den TIM23-Komplex gezeigt werden. Sie zeichnet sich durch 20 ungeladene Aminosäuren, gefolgt von zwei sauren Aminosäuren aus. Das Fehlen dieses Peptids führt zu fehlerhafter Lokalisation (Rojo et al., 1998; van Loon et al., 1986). Ein „Stopp“ in der TOM-Pore könnte zur seitlichen Sortierung nötig sein. Tiefere Temperaturen und dadurch langsamerer Import und stabileres GFP könnten zu längerem Aufenthalt in der Pore führen. Dies könnte wiederum zu erhöhter Freisetzung aus dem TOM-Komplex in die Außenmembran führen. Ob die geladenen Randbereiche der Transmembranbereiche von Tom22 und Mim1 eine ähnliche Funktion haben, bleibt aber noch zu klären.

3.1.3 Insertionsmechanismus in die mitochondriale Außenmembran

Die hier präsentierten Ergebnisse zeigen, dass laterale Freisetzung aus dem TOM-Komplex grundsätzlich möglich ist. Über den Mechanismus, der dem Austritt aus der TOM-Pore in die Lipidumgebung der Außenmembran zu Grunde liegt, lässt sich aber lediglich spekulieren. Es lassen sich wenigstens drei Modelle vorgeschlagen. (1) Der Import von α -helikalen Vorstufenproteinen wird zunächst von den Rezeptoren des TOM-Komplexes vermittelt. Die Insertion in die Membran geschieht aber nicht durch den TOM-Komplex. Dies könnte an der

Protein-Lipid-Kontaktstelle außerhalb des Komplexes geschehen. (2) Die Proteinvorstufen treten in die TOM-Pore ein. Diese wird durch ein Tom40- β -Barrel dargestellt. Die Insertion geschieht anschließend durch Öffnung des β -Barrel-Proteins (Abbildung 37, links). (3) Die TOM-Pore besteht nicht aus einem Tom40-Molekül, sondern aus mehreren, die zusammen eine Pore bilden. Sterische Veränderungen innerhalb des Komplexes führen zur Öffnung des Kanals zwischen zwei Tom40-Molekülen (Abbildung 37, rechts) (Rapaport, 2005).

Der Tim23-Teil der hier untersuchten Fusionsproteine muss die TOM-Pore durchqueren (Kaldi et al., 1998). Daher kann Modell 1, für die hier verwendeten Fusionsproteine ausgeschlossen werden.

Wie Oomen und Kollegen zeigten, ist der Innendurchmesser des β -Barrel-Proteins NalP, einem Transporter der Außenmembran von *Neisseria meningitidis*, groß genug, um eine gefaltete α -Helix aufzunehmen. Die β -Barrel-Struktur von NalP weist 12 Faltblätter und einen Innendurchmesser von 10 Å auf (Oomen et al., 2004). Für *Neurospora crassa* hingegen wurde ein Innendurchmesser des TOM-Kanals von ca. 20 Å bestimmt (Ahting et al., 1999). Für humanes Tom40 wurden aufgrund von Homologieanalysen mit humanem VDAC 19 Faltblätter mit einem Durchmesser von ca. 30 Å postuliert (Zeth, 2010). Somit wäre entsprechend Modell 2 ein β -Barrel ausreichend für den Import von mitochondrialen Proteinen, zumal diese, während des Transports durch den TOM-Komplex, entfaltet sind (Gaume et al., 1998; Kanamori et al., 1999). Es bleibt aber die Frage zu klären, ob die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem N- und C-terminalen Faltblatt des β -Barrels kontinuierlich geöffnet und geschlossen werden können (Abbildung 37, links).

Zwar konnte die Struktur des TOM-Komplexes noch nicht bestimmt werden, doch konnte mittlerweile einiges über seinen Aufbau in Erfahrung gebracht werden. So besteht der Komplex wohl nicht nur aus einer einzigen Pore. Elektronenmikroskopischen Analysen zufolge sind 2-3 Poren pro Komplex vorhanden. Weiter sind nach den stöchiometrischen Analysen von Künkele und Kollegen sechs bis acht Tom40-Moleküle pro Komplex enthalten (Ahting et al., 1999; Künkele et al., 1998). Dies könnte auf Porenbildung durch mehrere Tom40-Moleküle, wie in Modell 3 beschrieben, hindeuten. Überdies ist dieser Komplex in seinem strukturellen Aufbau überaus dynamisch. So konnte der Austausch von Tom40-Untereinheiten zwischen verschiedenen TOM-Komplexen gezeigt werden (Rapaport et al., 1998b). Wenn ganze Untereinheiten zwischen den Komplexen migrieren können, ist es gut vorstellbar, dass auch eine strukturelle Änderung stattfinden könnte. Diese könnte eine Öffnung eines Kanals, der von mehreren Tom40 β -Barrels gebildet wird, zur Folge haben (Abbildung 37, rechts).

Eine genaue Aussage wird sich wohl erst treffen lassen, wenn die Struktur Tom40 und des TOM-Kernkomplexes geklärt ist.

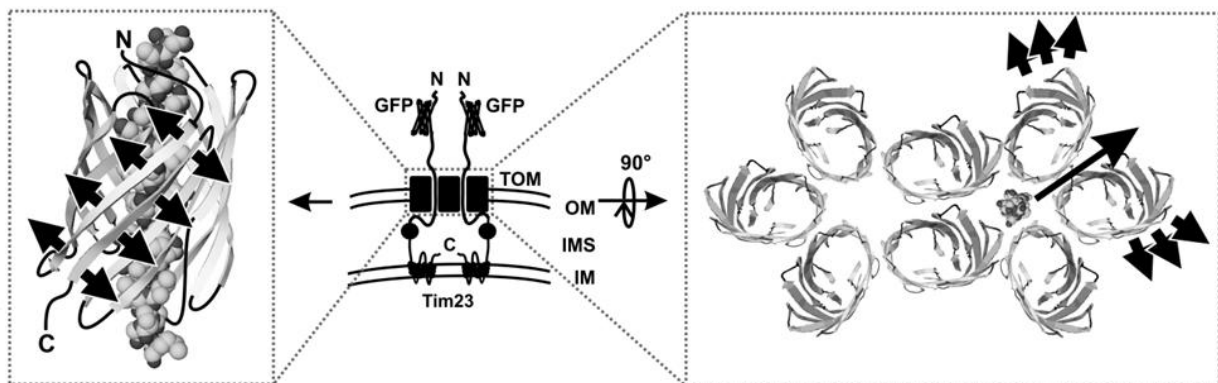


Abbildung 37. Hypothetische Modelle für zwei alternative Mechanismen der Porenöffnung des TOM-Komplexes zur lateralen Freisetzung von α -helikalen Vorstufenproteinen.

Links: Porenöffnung durch Öffnung eines Tom40 β -Barrels zwischen dem N-terminalen und dem C-terminalen Faltblatt

Rechts: Porenöffnung eines Kanals, der aus mehreren Tom40-Molekülen aufgebaut ist.

Die hier gezeigten β -Barrel-Strukturen sind nur schematische Modelle zur räumlichen Darstellung und keine Molekülmodelle. Anfertigung der Modelle mit Swiss-PDBviewer.

3.2 Der MICOS-Komplex

Die Suche nach dem molekularen Aufbau von Kontaktstellen zwischen den beiden mitochondrialen Membranen ist Gegenstand der Forschung seit ihrer Entdeckung durch Hackenbrock (Hackenbrock, 1966). Sowohl von John und Kollegen, als auch von Rabl und Kollegen wurde Mitofilin/Fcj1 in hochmolekularen Komplexen detektiert. In beiden Arbeiten wurde spekuliert, ob dieser Komplex heterooligomer sei und vielleicht sogar in Kontakt mit einem Außenmembranprotein stehe (John et al., 2005; Rabl et al., 2009). Falls dies der Fall wäre, würde dieser Komplex die Eigenschaft einer Kontaktstelle erfüllen. In dieser Arbeit konnten vier mitochondriale Innenmembranproteine und ein IMS-Protein identifiziert werden, die mit Fcj1 interagieren (Ycl057c-a/Mcs10, Ybr262c/Mcs12, Yfr011c/Mcs19, Ygr235c/Mcs27, Ynl100w/Mcs29) und so den MICOS-Komplex (mitochondrial contact site/mitochondriale Kontaktstellen) bilden. MICOS konnte in zwei unterschiedlichen Formen detektiert werden. Diese unterscheiden sich in ihrer Größe. MICOS I ist hierbei mit ca. 1,5 MDa deutlich größer als MICOS II mit 0,7 MDa. Die molekulare Masse von MICOS I passt sehr gut zu den früher bestimmten Größen der Mitofilin-Komplexe. Ein Komplex entsprechend der Größe von MICOS II konnte dort nicht beobachtet werden (John et al., 2005)(Rabl et al., 2009).

Weiterhin konnten Interaktionen von MICOS-Komponenten mit Außenmembranproteinen und somit die Ausbildung von Kontaktstellen nachgewiesen werden (Abbildung 38). Mit dem TOB-Komplex und Ugo1 wurden zwei Interaktionspartner in der Außenmembran identifiziert. Dies ist in zweierlei Hinsicht interessant. Erstens wurden der TOB-Komplex und der Ugo1-Fzo1-Komplex noch nie funktional miteinander in Verbindung gebracht. Zweitens wurde lediglich eine Interaktion von Ugo1 mit Fcj1 beobachtet, nicht aber mit den anderen Mcs-Proteinen. Dies könnte auf die Existenz zweier unabhängig voneinander existierenden Kontaktstellenkomplexen hindeuten (Abbildung 38). Eventuell unterscheiden sich MICOS I und II nicht nur in der Stöchiometrie der Innenmembrankomponenten, sondern auch in den Interaktionspartnern in der Außenmembran. John und Kollegen wiesen einen Mitofilin-enthaltenden Komplex in Säugerzellen nach, der in seiner molekularen Masse MICOS I entspricht (John et al., 2005). Bislang wurde in Säugern kein Homolog zu Ugo1 gefunden. Falls MICOS II ausschließlich mit Ugo1 interagiert, könnte dies das Fehlen dieser kleineren Form in Säugerzellen erklären.

Schon frühere Ergebnisse deuteten auf eine Interaktion von Fzo1 mit einem Innenmembranprotein hin (Fritz et al., 2001). Mit Mgm1 konnte bereits ein Interaktionspartner von Fzo1 und Ugo1 in der Innenmembran gefunden werden (Sesaki et al., 2003; Wong et al., 2003). In höheren Eukaryoten wiederum konnte die Interaktion von Mgm1 mit Mitofilin gezeigt werden (Darshi et al., 2011). Nach diesen Ergebnissen könnte Mgm1 ebenfalls eine Komponente von MICOS sein. Dies konnte aber in keinem der hier durchgeführten Experimente bestätigt werden. Weder Co-Reinigung von Mgm1 mit MICOS-Komponenten noch Co-Lokalisation in submitochondrialen Vesikeln war zu beobachten. Interessanterweise wirken sich die Deletionen von *FCJ1* und *MGMI* auf mitochondriale Morphologie aus. Die Phänotypen sind aber deutlich unterschiedlich. So weisen Zellen des *MGMI*-Deletionsstammes stark fragmentierte Mitochondrien auf, während die Mitochondrien in Zellen der *FCJ1*-Deletionsmutante vergrößert sind (Rabl et al., 2009; Sesaki et al., 2003). Ob diese beiden Proteine auch in Hefe miteinander interagieren bleibt daher noch zu klären.

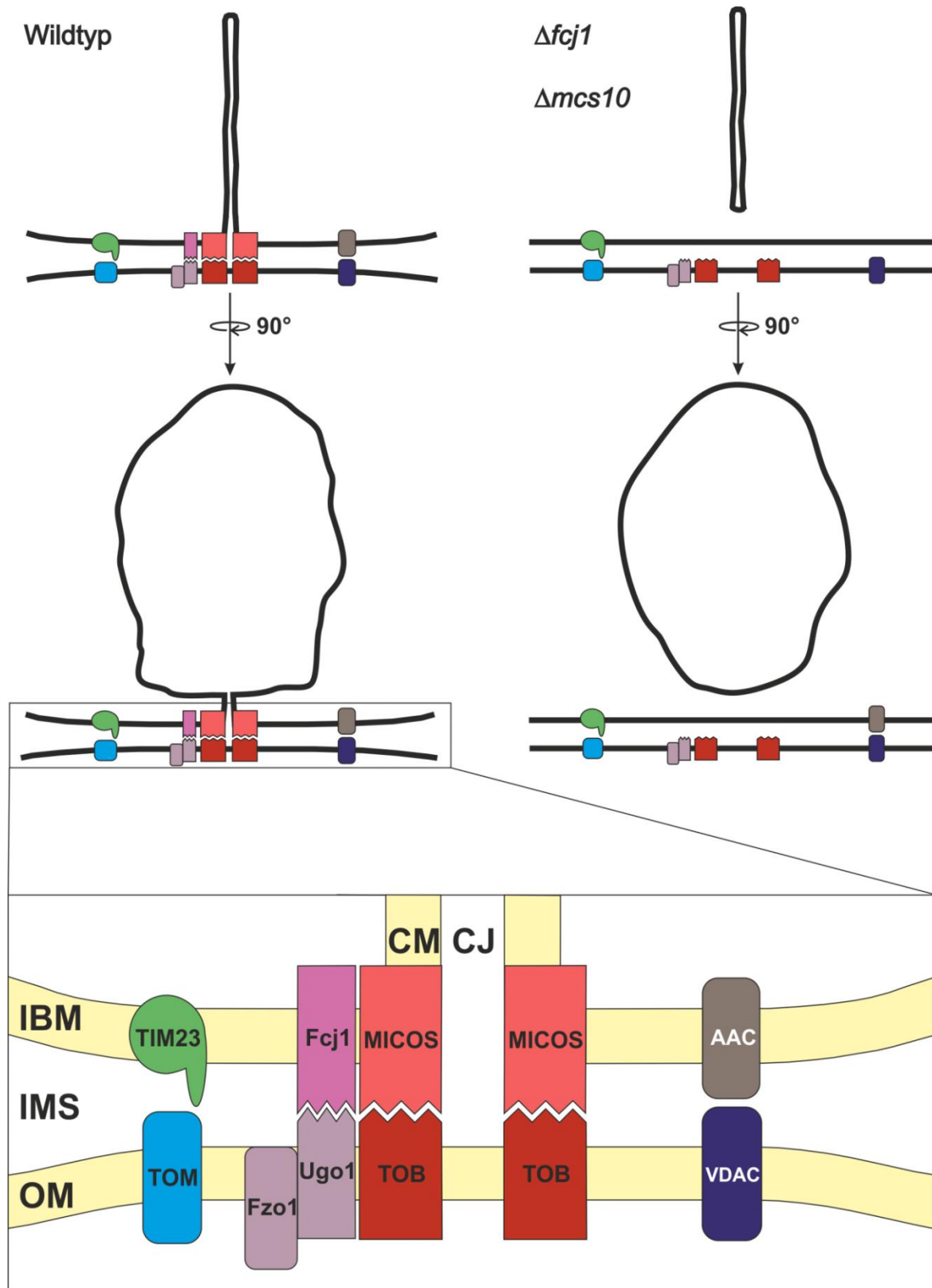


Abbildung 38. Modell des MICOS-Komplexes als strukturgebendes Element.

Oben links: Schematische Darstellung der Architektur in Wildtyp-Mitochondrien in zwei verschiedenen Orientierungen.

Oben rechts: Schematische Darstellung der Architektur in Mitochondrien aus Zellen von *FCJ1*- und *MCS10*-Deletionsmutanten in zwei verschiedenen Orientierungen.

Unten: Vergrößerung einer Crista Junction stabilisiert durch die Kontaktstellen MICOS-TOB und Fcj1-Ugo1-Fzo1. Die transienten oder weniger stabilen Kontaktstellen TIM23-TOM und ANT/AAC-VDAC/Porin sind ebenfalls angezeigt.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im Zuge dieser Arbeit ein Komplex bestehend aus sechs Proteinen identifiziert werden konnte, der stabile Kontaktstellen ausbildet. Eine dieser Komponenten ist Fcj1, ein Protein, das essentiell für die Ausbildung von Crista Junctions ist (Rabl et al., 2009). Ebenso wie Fcj1 sind die anderen Mcs-Proteine präferentiell an den Crista Junctions lokalisiert. Bislang war die Co-Lokalisation von Crista Junctions und Kontaktstellen nicht entdeckt worden (Nicastro et al., 2000; Perkins et al., 1997). In der vorliegenden Arbeit wurde jedoch nachgewiesen, dass permanente Kontaktstellen an Crista Junctions ausgebildet werden. Die Existenz von weiteren anders strukturierten Kontaktstellen, die unabhängig von diesen sind, kann aber keineswegs ausgeschlossen werden, sondern ist sogar sehr wahrscheinlich.

Es stellt sich die Frage, ob die früher als Kontaktstellenproteine vorgeschlagenen Proteine identisch mit den hier dargestellten MICOS-Komponenten sind. Pon und Kollegen generierten mit einer ähnlichen Methode Membranvesikel aus Hefe-Mitochondrien. In Vesikeln intermediärer Dichte waren zwei Proteine angereichert, CSP-1 und CSP-2. Da CSP-1 mit 100 kDa deutlich größer ist als die größte MICOS-Komponente, Fcj1, kann dieses Protein keine der hier beschriebenen MICOS-Komponenten sein. Fcj1 ist mit 61 kDa ähnlich groß wie CSP-2, das eine Größe von 64 kDa aufweist (Pon et al., 1989). Da diese Proteine nicht weiter untersucht worden sind und keine Informationen über die Gene, die diese Proteine kodieren publiziert sind, kann hierzu aber keine weitere Aussage getroffen werden. Lithgow und Kollegen generierten aus Rattenleber-Mitochondrien Membranvesikel durch osmotische Behandlung. In Fraktionen intermediärer Dichte reichte sich ein GTP-bindendes Protein mit einer molekularen Masse von 52 kDa an. Dieses als GBP52 bezeichnete Protein liegt demnach in derselben Größenordnung wie Fcj1. Allerdings weist Fcj1 keine GTP bindende Domäne auf, wie es für GBP52 gezeigt wurde (Kjeldgaard et al., 1996; Lithgow et al., 1991).

3.2.1 MICOS ist wichtig für die mitochondriale Architektur und die Funktion von Mitochondrien

Die Deletion jeder einzelnen Komplex-Komponente hat Auswirkungen auf die mitochondriale Ultrastruktur. Diese reichen von nahezu kompletter Abwesenheit der Crista Junctions bei Deletion von *FCJ1* und *MCS10*, bis zu leichter Reduktion ihrer Anzahl bei Deletion von *MCS29*. Dies zeigt, dass MICOS-Komplex ein strukturelles Element darstellt, das von hoher Bedeutung für die mitochondriale Architektur ist. Die wesentlich stärker ausgeprägten Phänotypen der *FCJ1*- und *MCS10*-Deletionsmutanten verglichen mit den

Deletionsmutanten der anderen Komponenten kann darauf schließen lassen, dass Fcj1 und Mcs10 essentiell für die Integrität des Komplexes sind.

Zwei Proteinen kommt noch eine besondere Funktion zu, Fcj1 und Mcs19. Deletion von *FCJ1* führt nicht nur zu nahezu vollständigem Verlust der Crista Junctions, sondern auch zu Verlust oder starken Reduktion der Kontaktstellen. So sind Msc10 und Mcs29 nach Auftrennung von submitochondrialen Vesikeln im Dichtegradienten nicht mehr in Fraktionen intermediärer Dichte, sondern in Fraktion hoher Dichte angereichert. Diese sind charakteristisch für Innenmembranproteine wie Tim17. Weiter ist die Subpopulation von Ugo1-enhaltenden Vesikeln in Fraktionen intermediärer Dichte nicht mehr nachzuweisen. Somit könnte dem Komplex Ugo1-Fcj1, falls dieser unabhängig existiert, eine weitere Rolle in der Bildung permanenter Kontaktstellen, vielleicht in direkter Nachbarschaft zu Crista Junctions, zukommen. Mcs19 hingegen ist nicht nur für Ausbildung oder Stabilität der Crista Junctions nötig, sondern ist auch für die Gestalt der Cristae von Bedeutung. In Mitochondrien eines *MCS19*-Deletionsstammes sind Verzweigungen innerhalb der Cristae zu beobachten. Mcs19 interagiert mit dem TOB-Komplex. Somit könnte Deletion dieses Proteins zu gestörter Interaktion zwischen MICOS und dem TOB-Komplex führen. Um den Kontakt zur Außenmembran ausbilden zu können, muss MICOS hauptsächlich in der IBM lokalisiert sein. Der fehlende Kontakt zur Außenmembran könnte eine Umverteilung von MICOS von der IBM in die Cristamembran zur Folge haben. Dies könnte die Ursache für Verzweigungen innerhalb der Cristae sein.

Interessanterweise korreliert mit dem Ausmaß an veränderter Ultrastruktur mit der Auswirkung auf die Lebensfähigkeit der Zellen auf respiratorischem Medium. Hackenbrock beobachtete eine reversible Kondensation des Matrixraumes bei Änderung des metabolischen Zustandes der Zelle. An einigen wenigen Stellen aber blieb der Kontakt zwischen innerer Grenzmembran und Außenmembran bestehen (Hackenbrock, 1966). Dies legt den Schluss, dass diese Verbindungen wichtig für den erneuten Wechsel vom kondensierten zum orthodoxen Zustand sind. Somit besteht eine enge Verknüpfung zwischen mitochondrialer Architektur und Funktion. John und Kollegen beschrieben als primären Effekt der Herunterregulation von Mitofilin die geänderte mitochondriale Architektur. Sekundär resultierte daraus eine Verringerung der Effizienz der oxidativen Phosphorylierung (John et al., 2005). Dies lässt den Schluss zu, dass bei Verlust der Kontaktstellen und/oder Crista Junctions strukturelle Änderungen im Mitochondrium, die für effiziente oxidative Phosphorylierung nötig sind, nicht mehr vorgenommen werden können.

3.2.2 Mitochondriale Architektur und mögliche molekulare Funktionen

Worin könnten der Zusammenhang zwischen mitochondrialer Architektur und Funktion auf molekularer Ebene liegen?

Die Komplexe der Atmungskette sind hauptsächlich in der Cristamembran lokalisiert. Der Ort der Insertion der Untereinheiten ist aber offensichtlich die IBM (Vogel et al., 2006). Daher müssen die Proteine über laterale Diffusion in die Cristamembran transloziert werden. Bei dieser Translokation muss der MICOS-Komplex überwunden werden. Somit könnte dieser Komplex eine Rolle in der Diffusionskontrolle spielen. Dieser hochmolekulare Komplex könnte die Diffusion von nicht assemblierten Untereinheiten aus der IBM in die Cristamembran zulassen. Dort könnte die Assemblierung der Komplexe stattfinden. Für diese Komplexe könnte MICOS eine unüberwindbare Hürde darstellen. Eine solche Funktion der Crista Junctions wurde schon früher diskutiert (Vogel et al., 2006).

Der MICOS-Komplex könnte auch auf die Substrate der Atmungskette oder auf deren lokale Konzentration Einfluss nehmen. Die flaschenhalsähnliche Struktur der Crista Junctions könnte von erheblicher Bedeutung für die Ausbildung lokaler Konzentrationsgradienten von Metaboliten wie ADP sein (Mannella et al., 2001). Eine Steuerung dieser Gradienten könnte somit auf die Effizienz der Atmungskette Einfluss nehmen. Somit ist eine regulatorische und damit effizienzsteigernde Wirkung von MICOS auf die oxidative Phosphorylierung in Betracht zu ziehen.

Kürzlich konnte die Präsenz von MICOS auch in Säugerzellen nachgewiesen werden (Alkhaja et al., 2011). Somit könnte diesem Komplex eine weitere Funktion zukommen. 85% des gesamten mitochondrial gespeicherten Cytochrom *c* befindet sich im Intracristalraum (Bernardi und Azzone, 1981). Freisetzung des Cytochrom *c* ist ein wichtiger Schritt in der Induktion des programmierten Zelltods, der Apoptose. Bislang ist bekannt, dass Bax/Bak zur Permeabilisierung der Außenmembran führt (Goldstein et al., 2005; Goldstein et al., 2000). Es wurde vorgeschlagen, dass die schnelle Freisetzung des gesamten Cytochrom *c* durch eine von tBid induzierte Weitung der Crista-Öffnungen eingeleitet wird (Scorrano et al., 2002). Angesichts der Bedeutung des MICOS-Komplexes für die Organisation der Crista Junctions könnte eine Rolle von tBid in der Modifikation dieses Komplexes liegen.

Bemerkenswerterweise sind vier Proteine des MICOS-Komplexes sogenannte AIM-Proteine, (Mcs12/Aim5; Mcs19/Aim13; Mcs27/Aim37; Fcj1/Aim28; Altered inheritance rate of mitochondria/veränderte Vererbungsrate von Mitochondrien) (Hess et al., 2009). Deletionsmutanten in diesen Genen zeigen eine erhöhte Verlustrate der mitochondrialen DNA. Die Präsenz eines zwei Membranen überspannenden (mitochondriale Innen- und

Außenmembran) oder sogar drei Membranen überspannenden Komplexes (mitochondriale Innen- und Außenmembran und ER-Membran), der wichtig für die Vererbung der mtDNA ist, wurde schon früher postuliert (Kornmann et al., 2009; Meeusen und Nunnari, 2003). Ob der MICOS-Komplex direkt an der Vererbung der mtDNA beteiligt ist oder mit den Proteinkomplexen, die mit den mitochondrialen Nukleoiden interagieren, co-lokalisiert bleibt an dieser Stelle offen.

3.2.3 Relevanz der Ergebnisse aus den Experimenten in Hefe für höhere Eukaryoten

Die Bedeutung des homologen MICOS-Komplexes in Zellen höherer Eukaryoten erscheint erheblich. Respiration ist in eukaryotischen Zellen essentiell. Sowohl Crista Junctions als auch Kontaktstellen, die primären Wirkungsorte von MICOS, sind in Mitochondrien verschiedenster Organismen und Gewebe zu finden. Die beiden Komponenten, deren Deletionen die stärksten Phänotypen nach sich ziehen, Fcj1 und Mcs10, sind bis zu Säugern konserviert. Ein Sequenz-Abgleich von Mcs10 und Homologen Proteinen stellt zwei konservierte Motive eindrucksvoll heraus: ein GX₃G Motiv und ein GXGXGXG Motiv. Das erste könnte ein Oligomerisierungsmotiv darstellen. Bei letzterem sind die mit X bezeichnet Aminosäurereste ausschließlich hydrophober Natur (Abbildung 39). Ob dieses Motiv ebenfalls eine Rolle in der Komplexbildung spielt bleibt allerdings noch zu klären.

| | | |
|--------------|---|-----|
| S.c. Mcs10 | MSEQAQTQPPAKSTPSKDSNKNKNGSSVSTILDTKWDIVLSNMLVKMTAMGFG | 50 |
| N.c. NCU0649 | ...MSDSTSSPVAAAPSTAMTRPVSEALLNEKWDRCLSNLLIKSTLGLG | 46 |
| D.w. GK18838 |MSEVSSPTTFAEDRKGLKLLDRCLSDGLIKMAGGFA | 35 |
| C.e. CE25901 |MAPGASAPAASRSEDEVGQKIDRCFADSLKVTGGVA | 37 |
| M.m. UPF0327 |MSESELGRKWDRCMADTVVKGLTGFG | 26 |
| H.s. C1ORF15 |MSESELGRKWDRCLADAVVKIGTGFG | 26 |
| | | |
| S.c. Mcs10 | VGVFTSVLFFKRRAFPVWLGIGFVGRGYAEGDAIFRSSAGLRSSKV... | 97 |
| N.c. NCU0649 | FGVVFSLVIFKRRAWPAFVGVGFCAGRAYEECNTSLKQAAREIRAQA... | 93 |
| D.w. GK18838 | IGSIVSILFLKRRLLWPAWIGAGFGICMAYRTCERDMNAME..... | 75 |
| C.e. CE25901 | IGIVASVAFFKRSRSPWIWFGSGVGLGTGWSNCRHDFASPYVLHGKRVPAQ | 87 |
| M.m. UPF0327 | LGIVFSLTFFKRRMWPLAFGSGVGLGMAYSNCOHDFQAPYLLHGKYVKEQ | 76 |
| H.s. C1ORF15 | LGIVFSLTFFKRRMWPLAFGSGMGLGMAYSNCOHDFQAPYLLHGKYVKEQ | 76 |
| | | |
| S.c. Mcs10 | | 97 |
| N.c. NCU0649 | | 93 |
| D.w. GK18838 | | 75 |
| C.e. CE25901 | QDSQGKPAYNIITEQHKQ | 105 |
| M.m. UPF0327 | | 76 |
| H.s. C1ORF15 | EQ..... | 78 |

Abbildung 39. Abgleich der Aminosäuresequenzen von Hefe Mcs10 mit möglichen Homologen höherer Eukaryoten. Abkürzungen: S.c., *Saccharomyces cerevisiae*; N.c., *Neurospora crassa*; D.w., *Drosophila willisonii*; C.e., *Caenorhabditis elegans*; M.m., *Mus musculus*; H.s., *Homo sapiens*
 Farbcode: schwarz, 100%; rot, >75%; türkis, >50% Sequenzidentität

Im Fall von Fcj1/Mitofilin beschränkt sich die Sequenzkonservierung auf die C-terminale Domäne (Rabl et al., 2009). Diese ist im IMS lokalisiert und wahrscheinlich wichtig für die Interaktion des Komplexes mit den Proteinen in der Außenmembran. Die MICOS-Komponenten Mcs12, Mcs19, Mcs27 und Mcs29 sind zumindest auf der Ebene der Aminosäuresequenz nicht konserviert. Auch scheint der MICOS-Komplex in Säugern kleiner zu sein als in Hefe (Alkhaja et al., 2011). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass dort einige Komponenten nicht anwesend sind.

Bemerkenswert sind in diesem Zusammenhang die Ergebnisse einiger aktueller Veröffentlichungen. So konnte im Laufe dieser Arbeit die Interaktion zwischen Mitofilin und dem Homolog des TOB-Komplexes in Säugern gezeigt werden (Xie et al., 2007). Unter den dort mittels Co-Immunopräzipitation mit Mitofilin gereinigten Proteinen ist eines besonders interessant, ChChD3. Dieses Protein wurde als lösliches IMS-Protein identifiziert, das sowohl mit dem TOB-Komplex als auch mit Mitofilin und dem Säuger Homolog von Mcs10, MINOS1, interagiert. Essentiell für die Interaktion mit dem TOB-Komplex ist die Myristoylierung des N-Terminus von ChChD3. Die C-terminale Domäne von ChChD3 wiederum soll wichtig für die Interaktion mit Mitofilin sein. Hier weist ChChD3 zwei CX₉C-Motive auf (Alkhaja et al., 2011; Darshi et al., 2011). Zwischen den beiden CX₉C-Motiven liegen zehn Aminosäuren. Das daraus resultierenden CX₁₀C ist bei höheren Eukaryoten wie etwa *Caenorhabditis elegans* ebenfalls konserviert. Obwohl auf der Ebene der Aminosäuresequenz keine Homologie zu einer MICOS-Komponente festzustellen ist, besteht eine gewisse Ähnlichkeit zu Mcs19. Auch Mcs19 liegt löslich im IMS vor und interagiert sowohl mit dem TOB-Komplex als auch mit Fcj1. Weiter trägt Mcs19 ein N-terminales Myristoylierungs-Motiv sowie das C-terminale CX₁₀C-Motiv. Da sowohl die beiden CX₉C-Motive, als auch die für ChChD3 typischen Coiled Coil Bereiche bei Mcs19 nicht vorhanden sind, bleibt die Frage offen, ob es sich bei Mcs19 um ein Homolog von ChChD3 handelt.

In einer weiteren kürzlich veröffentlichten Arbeit wurde das *Caenorhabditis elegans* Protein MOMA-1 als eventuelles Homolog zu Mcs27 und Mcs29 beschrieben (Head et al., 2011). Zwar ist die Sequenzähnlichkeit zwischen diesen Proteine äußerst gering, doch weisen sie auch einige Gemeinsamkeiten auf. MOMA-1 besitzt wie Mcs27 und Mcs29 zwei Transmembransegmente und zwischen diesen vier positive Ladungen. Durch gleichzeitige Herunterregulation von MOMA-1 und dem Mitofilin Homolog IMMT-1 beziehungsweise dem ChChD3 Homolog CHCH-3 konnte deren Interaktion gezeigt werden. Etwas verwirrend erscheint, dass MOMA-1 in dieser Studie als Protein beschrieben wurde, das hauptsächlich in der Außenmembran lokalisiert ist. Eine duale Lokalisation in Außen- und Innenmembran

wurde allerdings diskutiert (Head et al., 2011). Bemerkenswert ist jedenfalls, dass neben den ubiquitär vorkommenden Proteinen Fcj1/Mitofilin und Mcs10 mit ChChD3/CHCH-3 und MOMA-1 Proteine beschrieben wurden, die miteinander interagieren und deren Herunterregulation zu veränderter mitochondrialer Ultrastruktur führen (Darshi et al., 2011; Head et al., 2011). Überdies sind die beschriebenen mitochondrialen Phänotypen sehr ähnlichen zu denen der MICOS-Deletionsmutanten. Dies lässt den Schluss zu, dass der hier identifizierte MICOS-Komplex, als strukturelles Element, nicht nur in Hefe sondern auch in höheren Eukaryoten bis hin zum Säuger von eminenter Bedeutung für die mitochondriale Architektur und Funktion ist.

4 Zusammenfassung

Der weitaus größte Teil der mitochondrialen Proteine ist im Kern der Zelle kodiert und wird nach Synthese im Cytosol als Vorstufenprotein in die Mitochondrien transportiert. Während dieses Prozesses passieren annähernd alle Proteinvorstufen der verschiedenen Subkompartimente den TOM-Komplex in der mitochondrialen Außenmembran. Der TOM-Komplex besteht aus einem Protein-leitenden Kanal, der durch das β -Barrel Protein Tom40 dargestellt wird, den Rezeptoren Tom20, Tom22 und Tom70 und den kleinen Untereinheiten Tom5, Tom6 und Tom7. Es ist relativ gut verstanden wie Vorstufenproteine von den Rezeptoren erkannt werden, den TOM-Komplex durchqueren und zu ihrem endgültigen Bestimmungsort gelangen. Ob sich die TOM-Pore öffnen kann, um Proteinvorstufen lateral in die Außenmembran zu entlassen, ist bislang allerdings nicht bekannt.

Um dies zu untersuchen wurden in dieser Arbeit Fusionsproteine aus GFP und Tim23 verwendet, wobei ist GFP N-terminal an Tim23 fusioniert war. Die Wildtypform von Tim23 weist C-terminal vier hydrophobe Segmente auf, über die das Protein in der Innenmembran verankert ist, wohingegen der N-Terminus im intermembran Bereich lokalisiert ist. Abhängig von der Proteinimportaktivität der TIM23-Translokase können ca. 20 Aminosäurereste des N-Terminus von Tim23 ins Cytosol exponiert werden. Für GFP-Tim23 konnte schon früher ein interessantes Verhalten gezeigt werden. GFP-Tim23 passiert die TOM-Pore, die Tim23-Domäne wird in die Innenmembran integriert, die GFP-Domäne aber verbleibt auf der Oberfläche der mitochondrialen Außenmembran. Daraus ergeben sich zwei Möglichkeiten der Lokalisation; das Protein steckt im Kanal des TOM-Komplexes oder es wird in die Außenmembran inseriert. In dieser Arbeit wird zunächst gezeigt, dass durch Änderung der Wachstumstemperatur Einfluss auf die Topologie von GFP-Tim23 genommen werden kann. Während die GFP-Domäne des Fusionsproteins bei Wachstum von GFP-Tim23 exprimierenden Zellen bei 24°C auf der Oberfläche der Außenmembran lokalisiert ist, ist diese bei einer Wachstumstemperatur von 37°C im intermembran Bereich präsent. Weiter wird hier gezeigt, das GFP-Tim23 tatsächlich lateral aus dem TOM-Kanal freigesetzt wird, wenn die GFP-Domäne im Cytosol lokalisiert ist. Die Freisetzung ist abhängig von der Aminosäuresequenz des Segments, das sich am N-terminalen Ende der Tim23-Domäne des Fusionsproteins befindet. Da eine Freisetzung des Vorstufenproteins aus der TOM-Pore erfolgt, entsteht ein Protein, das sowohl in die mitochondriale Innenmembran als auch in die

mitochondriale Außenmembran integriert ist. Dieser Befund belegt, dass der TOM-Komplex nicht nur als Protein-Translokase, sondern auch als Insertase in die Außenmembran fungieren kann. Dies stellt einen neuen Weg der Topogenese von Proteinen in Mitochondrien dar.

Diese Untersuchungen wurden auch im Hinblick auf eine zweite Fragestellung durchgeführt. Ihnen liegt die Intention zu Grunde, ein Werkzeug für die Untersuchung der molekularen Zusammensetzung von Kontaktstellen zwischen der Außenmembran und der inneren Grenzmembran zu schaffen. Mitochondrien sind durch eine Membranhülle, bestehend aus diesen beiden Membranen, vom Cytosol abgegrenzt. An sehr begrenzten Stellen, den sogenannten Kontaktstellen, sind diese fest miteinander verbunden. Obwohl die Existenz dieser Strukturen schon lange bekannt ist, blieb ihr molekularer Aufbau bislang unbekannt. Da GFP-Tim23 in beide mitochondrialen Membranen integriert ist, kann es als Markerprotein für diese Strukturen verwendet werden.

Unter Verwendung des beide Membranen überspannenden Fusionsproteins GFP-Tim23 als Markerprotein wurde in dieser Arbeit ein Verfahren zur Erzeugung von Membranvesikeln aus Hefe-Mitochondrien und deren Auftrennung etabliert, um eine Fraktion zu erhalten, in der Kontaktstellenproteine spezifisch angereichert sind. Auf dieser Grundlage konnten sechs Proteine identifiziert werden, die eine annähernd identische Verteilung wie GFP-Tim23 aufweisen und somit die Kriterien für Kontaktstellenproteine erfüllen. Die Identifizierung erfolgte unter Verwendung von quantitativer hochauflösender Massenspektrometrie in Form der SILAC-Methode (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture). Es handelt sich bei den sechs identifizierten Proteinen um Fcj1, das Mitofilin der Hefe, und um fünf bisher nicht charakterisierte membranintegrierte oder -assoziierte Proteine, die Mcs10, Mcs12, Mcs19, Mcs27 und Mcs29 genannt wurden. Mcs steht hierbei für „mitochondrial contact sites“. Diese Proteine der Innenmembran interagieren alle miteinander und bilden einen bislang unbekanntem hochmolekularen Komplex, der als MICOS-Komplex (mitochondrial contact site complex/mitochondrialer Kontaktstellen-Komplex) bezeichnet wurde. Weiterhin wurde nach Interaktionspartnern von MICOS in der Außenmembran gesucht. Mit dem TOB-Komplex und dem Ugo1-Fzo1-Komplex wurden zwei Proteinkomplexe identifiziert, die mit MICOS in Kontakt stehen. Die bisher bekannten Funktionen dieser Komplexe sind die Insertion von β -Barrel-Membranproteinen in die Außenmembran und der Fusion der mitochondrialen Außenmembranen. Daher repräsentieren diese Interaktionen offenbar zusätzliche Funktionen dieser beiden Komplexe. Über Immunogold-Elektronenmikroskopie konnte gezeigt werden, dass der MICOS-Komplex in der Innenmembran bevorzugt an den Stellen lokalisiert ist, an welchen die innere

Grenzmembran mit der Cristamembran in Verbindung steht, den Crista Junctions. Hierzu wird zudem gezeigt, dass der MICOS-Komplex für die Bildung und/oder für die Stabilität der Crista Junctions essentiell ist, da Deletion von einzelnen MICOS-Komponenten zur Reduktion bis hin zum fast vollständigen Verschwinden von Crista Junctions führt. Diese Störung der mitochondrialen Architektur resultiert zudem in einer Reduktion der respiratorischen Kompetenz bis hin zu ihrem fast vollständigen Verlust. Diese Ergebnisse belegen nachdrücklich die enge Verknüpfung von Architektur und Funktion der Mitochondrien.

5 Summary

The vast majority of mitochondrial proteins are encoded in the nucleus, synthesized in the cytosol as precursor proteins and subsequently transported into mitochondria. During this process, essentially all precursor proteins of the different subcompartments cross the mitochondrial outer membrane through the TOM complex. The TOM complex is made up by a protein conducting channel that is formed by the β -barrel protein Tom40, the receptors Tom20, Tom22 and Tom70 and the small subunits Tom5, Tom6 and Tom7. It is quite well understood how precursor proteins are recognized by the receptors, pass through the TOM complex and reach their final destination. However, it is not known whether the TOM pore can also open laterally to mediate insertion of precursor proteins into the outer membrane.

In the present study GFP-Tim23 fusion proteins were used to analyze this problem. In this artificial protein GFP is fused to the N-terminus of Tim23. The wild type form of Tim23 is integrated with four C-terminally located hydrophobic segments into the inner membrane whereas the N-terminal part is located in the intermembrane space. Depending on the protein import activity of the TIM23 translocase the N-terminal 20 amino acid residues of Tim23 can be exposed on the surface of the outer membrane. An interesting behavior of GFP-Tim23 upon import was shown before; GFP-Tim23 passes the TOM pore, the Tim23 domain is integrated in the inner membrane but the GFP domain remains on the outer surface of the mitochondria facing the cytosol. This results in two possible locations: The protein gets either stuck in the channel of the TOM complex or it is released into the outer membrane. It is shown here, that the topology of GFP-Tim23 can be altered by changing the growth temperature. Upon growth on 24°C the GFP domain is present on the surface of the outer membrane whereas it is located in the intermembrane space when the yeast strain expressing this fusion protein is grown on 37°C. Furthermore, it is shown in this study, that GFP-Tim23 can indeed be released laterally from the TOM channel when the GFP domain is facing the cytosol. The release is dependent on sequence determinants present in the N-terminal segment of the Tim23 domain of the fusion protein. As a result the GFP-Tim23 fusion protein spans both, the inner and the outer mitochondrial membrane. Therefore, the TOM complex can act not only as a protein translocase but also as an insertase that mediates lateral release into the outer membrane. This represents a new topogenesis pathway of proteins in mitochondria.

The experiments were also performed to be able to address another question. A tool should be generated to analyze the molecular basis of contact sites between the outer membrane and the inner boundary membrane of mitochondria. Mitochondria are surrounded by an envelope consisting of these two membranes. At limited sites, called contact sites, these two membranes are firmly connected. Although the presence of these structures is known since a long time, their molecular nature remained unknown. Since GFP-Tim23 is integrated in both mitochondrial membranes, it can be used as a marker for these structures.

By using the double membrane spanning GFP-Tim23 as a marker protein, in this study a protocol was designed to generate membrane vesicles from yeast mitochondria and separate them in such a way that a fraction is obtained, in which contact site proteins are specifically enriched. Based on these results six proteins could be identified showing an almost identical distribution as GFP-Tim23 and thus fulfilling the criteria for contact site proteins. The identification was achieved by quantitative high-resolution mass spectrometry using the SILAC approach (Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture). The six proteins identified are Fcj1, the yeast mitofilin, and five uncharacterized membrane integral or associated proteins which were named Mcs10, Mcs12, Mcs19, Mcs27 and Mcs29. Mcs stands for “mitochondrial contact sites”. They all interact with each other and form a novel high molecular mass complex which was termed MICOS complex (mitochondrial contact site complex). Furthermore, a search was performed for interaction partners of MICOS in the outer membrane. Two protein complexes were identified which form contacts with MICOS, the TOB complex and the Ugo1-Fzo1 complex. Their, so far known, functions are the insertion of β -barrel proteins into the mitochondrial outer membrane and the fusion of the outer membranes. These interactions apparently represent additional functions of these complexes of the outer membrane. Immunogold labeling showed that the MICOS complex is located preferentially at the sites where the inner boundary membrane meets the crista membrane, the crista junctions. Deletion of components of the MICOS complex in some cases leads to a virtually complete loss or in other cases to a reduction of crista junctions. This indicates an essential role of the MICOS complex in the formation and/or the stability of crista junctions. In addition the disturbance of the mitochondrial architecture results in a reduction of respiratory competence or the virtually complete loss of it. These results demonstrate an intimate connection between architecture and function of mitochondria.

6 Material und Methoden

6.1 Molekularbiologische Methoden

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

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden 4 ml LB/AMP-Medium (6.5.1) mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C kultiviert. 2 ml dieser Kultur wurden bei 16000 xg für 1 min pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl Puffer-P1 resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte durch Zugabe von 200 µl Puffer-P2. Das Mischen erfolgte hierbei vorsichtig durch invertieren, um die genomisch DNA nicht zu scheren. Diese Bruchstücke würden im Folgenden zu Kontamination der Plasmid-DNA führen. Die Neutralisation des pH-Wertes und Ausfällung der Proteine und der genomischen DNA erfolgte durch Zugabe von 150 µl eiskalten Puffer-P3. Durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 xg und 4°C wurde das Präzipitat pelletiert. Der Plasmid-DNA enthaltende Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von 600 µl Isopropanol präzipitiert. Die DNA wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 xg und 4°C pelletiert und das DNA-Pellet mit 600 µl 70%-igem, -20°C kaltem Ethanol gewaschen. Das DNA-Pellet wurde vollständig getrocknet und anschließend in 30 µl sterilem Milliporewasser aufgenommen. Nach Bestimmung der Konzentration (6.1.3) wurde diese auf 1 µg/µl eingestellt und die DNA bei -20 gelagert.

Puffer-P1 (Lagerung bei 4°C)

50 mM Tris-Base, 10 mM EDTA, 0.1 mg/ml RNase A

Puffer-P2 (Lagerung bei 25°C)

0.2 M NaOH, 1% (w/v) SDS

Puffer-P3 (Lagerung bei 4°C)

60 ml 3 M Kaliumacetat, 11.5 ml Eisessig, 28,5 ml H₂O

6.1.2 Isolierung von genomischer DNA aus *S.cerevisiae*

Zur Gewinnung von genomischer DNA aus *S.cerevisiae* wurde entweder der Stamm W303-Wildtyp oder YPH499-Wildtyp über Nacht in YPD-Medium bei 30°C kultiviert. Die Isolierung der DNA erfolgte mit Hilfe eines Kits zur Extraktion von genomischer DNA aus eukaryotischem Gewebe nach Angaben des Herstellers (Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega).

6.1.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Die Konzentration von DNA in wässriger Lösung wurde über die Extinktion bei 260 nm (OD_{260}) bestimmt. Hierzu wurde DNA aus Plasmid-Minipräparationen 1:100 in Wasser verdünnt und in eine UV-Küvette überführt. Die Konzentration der DNA wurde unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors vom Spektrophotometer (BioPhotometer plus, Eppendorf) berechnet. Dabei entsprach die OD_{260} von eins einer DNA-Konzentration von 50 ng/ml.

6.1.4 Amplifikation von DNA durch Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der spezifischen Vervielfältigung von DNA-Fragmenten über mehrere Reaktionszyklen. Ein Zyklus besteht aus den Schritten Denaturierung der doppelsträngigen (ds) DNA, Anlagerung der komplementären Oligonukleotide (Primer) und Synthese der DNA durch thermostabile DNA-Polymerase (Saiki, 1985 und 1988). Ein Reaktionsansatz mit einem Volumen von 50 µl enthielt 2 U Polymerase, je 50 pmol der beiden Primer, 100 µM der vier Desoxribonukleosidtriphosphate, 50 ng genomische oder 5 ng Plasmid-DNA in 1x Reaktionspuffer. Die Zusammensetzung des Reaktionspuffers richtete sich nach der Art der Polymerase und wurde vom Hersteller bereitgestellt. Aufgrund der zusätzlichen 3'-5'-Exonuklease-Aktivität („proof reading“) wurde für präparative Ansätze stets Pfu-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus* (Promega) verwendet. Für Test-PCRs zur Kontrolle der erfolgreichen Klonierung wurde GoTaq-Polymerase (Promega) verwendet. Jede PCR wurde mit einem initialen Denaturierungsschritt von 5 Minuten bei 95°C eingeleitet, um sämtliche doppelsträngige Matrizen-DNA aufzuschmelzen. Hierauf folgte die Amplifikationsphase, die sich aus 25-35 Zyklen mit folgenden Einzelschritten zusammensetzte; Denaturierung der ds-DNA für 30 Sekunden bei 95°C, Anlagerung der Primer für 30 Sekunden bei 45-65°C und Synthese der DNA entsprechend der Länge der Matrize und der verwendeten Polymerase (Pfu-Polymerase:

ca. 0,5 kb pro Minute; Taq-Polymerase: ca. 1 kb pro Minute) bei 72°C. Im Anschluss an den letzten Zyklus folgte eine finale Inkubation bei 72°C für 10 Minuten, um eventuell noch unvollständige DNA-Stränge zu komplettieren. Die PCR-Produkte wurden zur Reinigung auf präparative Agarosegele aufgetragen und über Mikrozentrifugationssäulchen isoliert (6.1.6).

6.1.5 Agarosegelelektrophorese

DNA-enhaltende Proben wurden mit 5x Auftragspuffer gemischt und auf Agarosegele (1–2% (w/v) Agarose in TAE-Puffer) aufgetragen. Die elektrophoretische Trennung der DNA wurde bei konstanter Spannung von 15 V/cm durchgeführt. Zur Detektion der DNA unter UV-Licht wurde die Agarose in noch flüssigem Zustand mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Mit Hilfe von Größenstandards (100 bp- bzw. 1 kb-ladder; New England Biolabs/NEB) wurden die Größen der Fragmente abgeschätzt.

5x Auftragspuffer

0,25% Xylencyanol, 0,25% Orange G, 40% Glycerin

TAE-Puffer

20 mM Natriumacetat; 1 mM EDTA; 40 mM Tris/Acetat; pH 7,4

6.1.6 Reinigung von PCR-Produkten

DNA-Fragmente wurden entweder aus Agarosegelen ausgeschnitten und daraus extrahiert, oder schon in Lösung vorliegend über Minizentrifugationssäulchen gereinigt. Hierzu wurde ein Kit der Firma Promega nach Anweisung des Herstellers verwendet (Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System).

6.1.7 Restriktionsverdau

Der sequenzspezifische Verdau von DNA erfolgte mit Hilfe von Endonukleasen der Firma New England Biolabs (NEB) unter Verwendung der vom Hersteller empfohlenen Puffer. Pro Mikrogramm DNA wurden 2 U des entsprechenden Enzymes eingesetzt und die Ansätze zwischen einer und vier Stunden bei 37°C inkubiert. Bei einem analytischen Restriktionsverdau erfolgte die elektrophoretische Trennung der Fragmente sofort (6.1.5). Reaktionsansätze zu präparativen Zwecken wurden erst über Minizentrifugationssäulchen gereinigt (6.1.6).

6.1.8 Ligation

Zur Ligation von DNA-Fragmenten und Vektoren wurden T4-DNA-Ligase (NEB) und der vom Hersteller mitgelieferte 10 x Puffer verwendet. Das zu inserierende Fragment wurde relativ zum Vektor in fünffachem molarem Überschuss eingesetzt. Die Abschätzung der Konzentrationen erfolgte durch den Vergleich der Signalintensitäten der mit Ethidiumbromid gefärbten DNA unter UV-Licht nach der Agarosegelelektrophorese (6.1.5). Pro 15 µl Reaktionsansatz wurde 1 Unit T4-Ligase eingesetzt. Die Ligationen wurden 6-12 h bei 16°C inkubiert. Je 1 µl der Ansätze wurde zur Transformation von elektrokompenten *Escherichia coli* (*E.coli*) verwendet.

6.1.9 Klonierungsstrategien

6.1.9.1 Klonierung von Vektoren zur Expression in *S.cerevisiae*

Klonierung von pRS315-His6-GFP-Tim23

Das Plasmid pRS315-His6-GFP-Tim23 wurde in zwei Schritten generiert. Zur Amplifikation des endogenen Tim23 Promotors (560 Basenpaare vor dem Startkodon) und der kodierenden Sequenz wurde das Plasmid pRS315-GFP-Tim23 (Vogel et al., 2006) als Matrize verwendet (6.1.4). Die Insertion des hexahistidyl-Tags erfolgte über den Primer 6xHis_GFP_Xma1(s). Im ersten Schritt wurde der Promotorbereich von Tim23 mittels *SacI* und *XmaI* in den Vektor pRS315 kloniert (Sikorski und Hieter, 1989). Im zweiten Schritt wurde die kodierende Sequenz in das Plasmid pRS315proTIM23 unter Benutzung von *XmaI* und *HindIII* kloniert (6.1.7; 6.1.8).

S.c.proTim23-SacI(s)

5`-CCCGAGCTCACTGTGACGTCGATGCATGCGC-3`

S.c.proTim23-XmaI(as)

5`-TAAACCCGGGGTACCGATTGTGTGTGATCTGTTA-3`

6xHis-GFP -XmaI(s)

5`-TAAACCCGGGATGCACCACCACCACCACAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGG-3`

GFP-ScTIM23-as(HindIII)

5`-CCCAACGTTTCATTTTTCAAGTAGTCTTTTCTTGACAC-3`

Klonierung von pRS315-GFP-Tom22TMS- Δ 20Tim23, pRS315-GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 und pRS315-GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23 in pRS315

Zur Generation dieser Konstrukte wurde die kodierende Sequenz von GFP unter Benutzung von pRS315-GFP-Tim23 (Vogel et al., 2006) als Matrize mittels PCR amplifiziert (6.1.4). Das resultierende Fragment wurde über Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *PstI* zunächst in den Vektor pDrive (Qiagen) kloniert (6.1.7; 6.1.8).

GFP-KpnI(s)

5'-GGGGTACCATGAGTAAAGGAGAAGAAGACTTTTCACTGG-3'

GFP-PstI(as)

5'-CCCTGCAGCTGTTACAAACTCAAG-3'

Die kodierenden Bereiche der Sequenzen Tom22TMS (Aminosäuren (AS) 92-126), Mim1TMS (AS 29-68) und Tom22SOL (AS 22-57), die anstelle der ersten 20 AS in die Fusionsproteine inseriert werden sollten, wurden mittels PCR unter Benutzung von genomischer *S.cerevisiae*-DNA amplifiziert (6.1.4). Die resultierenden Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *PstI* und *SacI* in das Plasmid pDrive-GFP kloniert (6.1.7; 6.1.8). Um Oligomerisierung des Fusionsproteins GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23 zu vermeiden (Popov-Celeketic et al., 2008b), wurden hier über die Primer zusätzlich zwei Punktmutationen eingefügt (Gly63→Ile and Ala67→Ile).

Tom22TMS-PstI(s)

5'-CTGCAGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATAACAAAATTCACAAAATCCGGAAACCTTGCTTG-3'

Tom22TMS-SacI(as)

5'-GAGAGCTCCTTAGGCTTGGTTGTATCTTGCATTTTCGATTAGCTGTTGTTTCGGCAAG-3'

Tom22SOL-PstI(s)

5'-CTGCAGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATAACAAAATCAGGCCATCGTGGAAGAAAAG-3'

Tom22SOL-SacI(as)

5'-GAGAGCTCCTTAGGCTTGGTTGTATCTTGTGTTTCATTTTCATCAAATTCATCTTC-3'

Mim1TMS-PstI(s)

5'-CTGCAGGGATTACACATGGCATGGATGAACTATAACAAAAGTGCCGACGAGAGCCCCTTG-3'

Mim1TMS-SacI(as)

5'-GAGAGCTCCTTAGGCTTGGTTGTATCTTGGTGAATAAATAGCTCGATGAAGCCG-3'

Die kodierende Sequenz von $\Delta 20$ Tim23 wurde mittels PCR von pRS315-GFP-Tim23 (Vogel et al., 2006) amplifiziert (6.1.4). Das resultierende Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *SacI* und *NotI* in die Plasmide pDrive-GFP-Tom22TMS, pDrive-GFP-Mim1TMS und pDrive-GFP-Tom22SOL, kloniert (6.1.7; 6.1.8).

ScTIM23delta20-SacI(s)

5`-GAGCTCTCGTTGAAGCAGAGTTTAG-3`

ScTIM23-NotI(as)

5`-GCGGCCGCTCATTTTTCAAGTAGTCTTTTCTTGAC-3`

Diese Konstrukte (pDrive-GFP-Tom22TMS Δ -20Tim23, pDrive-GFP-Mim1TMS Δ -20Tim23 und pDrive-GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23) dienten als Matrizen zur DNA-Amplifikation (6.1.4) die Klonierung in den Hefe-Expressionsvektor. Die so erhaltenen DNA-Fragmente wurden über die Restriktionsschnittstellen *XmaI* und *HindIII* in das Plasmid pRS315proTim23 kloniert (6.1.7; 6.1.8). Hierbei wurden auch Primer verwendet, über die hexahistidyl-Tags inseriert wurden.

GFP-XmaI(s)

5`-TAAACCCGGGATGAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGG-3`

6xHis-GFP-XmaI(s)

5`-TAAACCCGGGATGCACCACCACCACCACAGTAAAGGAGAAGAAGAACTTTTCACTGG-3`

GFP-ScTIM23-as(HindIII)

5`-CCCAACGTTTCATTTTTCAAGTAGTCTTTTCTTGACAC-3`

6.1.9.2 Klonierungsstrategien für Vektoren zur Expression in *E.coli*

Klonierung von pMAL-cRI-($\Delta 1-13$)Ybr262

Das Fragment des offenen Leserahmens wurde mittels PCR (6.1.4) von genomischer *S.cerevisiae*-DNA amplifiziert. Das resultierende Fragment wurde über die Restriktionsschnittstellen *BamHI* und *PstI* in den Vektor pMAL-cRI (NEB) kloniert (6.1.7; 6.1.8).

($\Delta 1-13$)Ybr262-BamHI(s)

5`-CCC GGATCCACTCTCTCTGTGGGAGTAATCG-3`

($\Delta 1-13$)Ybr262-PstI(as)

5`-AAACTGCAGCTAATTCTTACCCAGGAGTAG-3`

6.1.10 Verwendete Plasmide

Tabelle 3 Verwendete Plasmide

| Plasmid | Kodiertes Protein | Ausgangsvektor | Referenz |
|--|--|-----------------------|-----------------------------|
| pGEM4-Por1 | <i>S.cerevisiae</i> Por1 | pGEM4 | (Mayer et al., 1993) |
| pGEM4-Su9(1-69)-DHFR | <i>Neurospora crassa</i> Su9(1-69) fusioniert an <i>Mus musculus</i> Dihydrofolatreduktase | pGEM4 | (Pfanner und Neupert, 1987) |
| pGEM4-AAC | <i>Neurospora crassa</i> AAC | pGEM4 | (Pfanner et al., 1987) |
| pGEM4-CCHL | <i>S.cerevisiae</i> CCHL | pGEM4 | (Steiner et al., 1995) |
| pGEM4-Dld1(1-72)-DHFR | <i>S.cerevisiae</i> Dld1(1-72) fusioniert an <i>Mus musculus</i> Dihydrofolatreduktase | pGEM4 | (Rojo et al., 1998) |
| pRS315-GFP-Tim23 | <i>Aequorea victoria</i> GFP fusioniert an <i>S.cerevisiae</i> Tim23 | pRS315 | (Vogel et al., 2006) |
| pRS315-His6-GFP-Tim23 | <i>Aequorea victoria</i> GFP fusioniert an <i>S.cerevisiae</i> Tim23 | pRS315 | Diese Arbeit |
| pRS315-GFP-Tom22TMS- Δ 20Tim23 | <i>Aequorea victoria</i> GFP fusioniert an <i>S.cerevisiae</i> Tim23 mit Austausch der AS 1-20 durch die AS 92-126 von <i>S.cerevisiae</i> Tom22 | pRS315 | Diese Arbeit |
| pRS315-His6-GFP-Tom22TMS- Δ 20Tim23 | <i>Aequorea victoria</i> GFP fusioniert an <i>S.cerevisiae</i> Tim23 mit Austausch der AS 1-20 durch die AS 92-126 von <i>S.cerevisiae</i> Tom22 | pRS315 | Diese Arbeit |
| pRS315-GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 | <i>Aequorea victoria</i> GFP fusioniert an <i>S.cerevisiae</i> Tim23 mit Austausch der AS 1-20 durch die AS 22-57 von <i>S.cerevisiae</i> Tom22 | pRS315 | Diese Arbeit |
| pRS315-His6-GFP-Tom22SOL- Δ 20Tim23 | <i>Aequorea victoria</i> GFP fusioniert an <i>S.cerevisiae</i> Tim23 mit Austausch der AS 1-20 durch die AS 22-57 von <i>S.cerevisiae</i> Tom22 | pRS315 | Diese Arbeit |

| | | | |
|---|--|----------|------------------------------|
| pRS315-GFP-Mim1TMS- Δ 20Tim23 | <i>Aequorea victoria</i> GFP fusioniert an <i>S.cerevisiae</i> Tim23 mit Austausch der AS 1-20 durch die AS 29-68 von <i>S.cerevisiae</i> Mim1 | pRS315 | Diese Arbeit |
| pRS315-His6-Mim1TMS- Δ 20GFP-Tim23 | <i>Aequorea victoria</i> GFP fusioniert an <i>S.cerevisiae</i> Tim23 mit Austausch der AS 1-20 durch die AS 29-68 von <i>S.cerevisiae</i> Mim1 | pRS315 | Diese Arbeit |
| pYX242-Fcj1-His12 | <i>S.cerevisiae</i> Fcj1 | pYX242 | (Rabl et al., 2009) |
| pYX242- His8-Fcj1 | <i>S.cerevisiae</i> Fcj1 | pYX242 | Regina Rabl nicht publiziert |
| pMAL-(Δ 1-13) Ybr262 | <i>S.cerevisiae</i> (Δ 1-13) Ybr262 | pMAL-cRI | Diese Arbeit |
| pQE30-Ycl057c-a | <i>S.cerevisiae</i> Ycl057c-a | pQE30 | Dr. Dejana Mokranjac |

6.1.11 Herstellung elektrokompenter *Escherichia coli* (*E.coli*)

Zur Herstellung elektrokompenter *E.coli* des Stammes XL1-Blue (Agilent Technologies) wurden *E.coli*-Zellen über Nacht in LB-Medium mit 10 μ g/ml Tetrazyklin (LB/Tet) bei 37°C angezogen (6.5.1). Mit dieser Kultur wurden 2 L LB/Tet angeimpft (OD₆₀₀ von 0,1). Die Kultur wurde bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37°C geschüttelt und anschließend für 30 min auf Eis inkubiert. Die weiteren Schritte wurden bei 4°C oder auf Eis durchgeführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 xg geerntet. Das Zellpellet wurde dreimal mit je 500 ml eiskaltem, sterilem 10%-igem (v/v) Glycerol gewaschen. Im Anschluss an den letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 ml 10%-igem (v/v) Glycerol aufgenommen und aliquotiert. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

6.1.12 Transformation von *E.coli*

30 µl elektrokompetente *E.coli* XL1-Blue wurden auf Eis aufgetaut. Pro Transformation wurde 1 µl Ligationsansatz oder 0,5 µg gereinigtes Plasmid eingesetzt. Die Zellen wurden nach 5-minütiger Inkubation in vorgekühlte Elektroporationsküvetten überführt und einem Stromstoß (2,5 kV; 400 Ω; 25 µF; Gene-Pulser, Bio-Rad) ausgesetzt (Dower et al., 1988; Miller et al., 1988). Der Transformationsansatz wurde sofort in 1 ml LB-Medium aufgenommen und für eine Stunde bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei 3000 xg sedimentiert, in LB-Medium resuspendiert und auf LB-Platten mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert (6.5.1). Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.1.13 Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* (*S.cerevisiae*)

Zur Transformation von *S.cerevisiae* wurde der entsprechende Stamm über Nacht auf YP-Medium mit 2% Glucose (YPD) kultiviert (0). Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml YPD-Medium angeimpft (OD₆₀₀ ~ 0,2). Diese Kultur wurde bei 30°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,0 kultiviert, die Zellen aus 1 ml dieser Kultur durch Zentrifugation für 30 Sekunden bei 9000 xg und Raumtemperatur pelletiert und anschließend mit 1 ml sterilem Wasser gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Puffer A gewaschen und anschließend in 100 µl Puffer A resuspendiert. Zur Transformation wurden 50 µl der Zellsuspension mit 50 µg denaturierter Lachsspermien-DNA, 1-2 µg Plasmid-DNA oder PCR-Produkt (zur homologen Rekombination) und 300 µl frisch hergestelltem Puffer B gemischt. Nach Inkubation für 30 min bei 30°C unter Schütteln folgte ein Hitzeschock für 15 min bei 42°C. Die transformierten Zellen wurden daraufhin für 30 Sekunden bei 9000 xg und Raumtemperatur pelletiert, in 1 ml YPD-Medium resuspendiert und für 1 Stunde bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach erneuter Pelletierung erfolgte ein Waschschriff mit 1 ml sterilem Wasser. Das Pellet wurde final in 100 µl sterilem Wasser resuspendiert, auf Medium mit dem entsprechenden Selektionsmarker ausplattiert und bei 30°C inkubiert.

Puffer A

100 mM Lithiumacetat, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7,5

Puffer B

40% (w/v) Polyethylenglycol 6000, 100 mM Lithiumacetat, 10 mM Tris-HCl pH 7,5

6.1.14 Genetische Manipulation von *S.cerevisiae*

6.1.14.1 Deletion von Genen

Die Deletion von Genen erfolgte über homologe Rekombination des *His3*-Gens aus *Saccharomyces pombe* in die entsprechenden Genloki (Longtine et al., 1998). Die Deletionskassette wurde mittels PCR amplifiziert (6.1.4). Als Matrize diente hierbei das Plasmid pFA6aMX6 (Wach et al., 1997). Die verwendeten Primer setzten sich aus den 45 Nukleinsäuren vor dem Startkodon, beziehungsweise den 45 Nukleinsäuren nach dem Stoppkodon des jeweiligen offenen Leserahmens und einer plasmidspezifischen Sequenz zusammen. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde nach Reinigung (6.1.6) in den Stamm YPH499-Wildtyp transformiert (6.1.13). Die Selektion erfolgte über Synthetisches-Medium ohne Histidin (0).

Übersicht über die verwendeten Deletionsprimer

Fcj1-ko-s

5`-CATAAGAACGCATTGAAAAGTCTAAAAAACTAATATTCGTAAAGGCGGATCCCCGGG
TTAATTAA-3`

Fcj1-ko-as

5`-TTGAGGTGTAATGACGTACATCTCTTTTCTCTTTGTATTATTCTTATCGATGAATTCGAG
CTCG-3`

YBR262C-ko-s

5`-CAGAACAGACAGTGGACTAAGAACCAGCAGATAACGGAGAGAATCCGGATCCCCGGGT
TAATTAA-3`

YBR262C-ko-as

5`-ATATACATGAGGATGTTTCGTTACAGTAGGAGAAATAGAAAGCTCGATCGATGAATTC
GAGCTCG-3`

YCL057C-A-ko-s

5`-CTTTGCTACGAGAGGGAATAAACACGGAAAAAGACAAAATATACCCGGATCCCCGGG
TTAATTAA-3`

YCL057C-A-ko-as

5`-TATTATTTTTTTTTTTGAATATATATAAAGCATCGTCGCTTAAGAATCGATGAATTCGA
GCTCG-3`

YFR011C-ko-s

5`-CAAGAACAAAAACAAGGTGGTATATCGACTAATACAGAGTCAATCCGGATCCCCGGGTT
AATTAA-3`

YFR011C-ko-as

5`-AATGGCGAATTCTTTTTGGTTCGAGTTTATGTATACTTTTTCTTATATCGATGAATTCGAG
CTCG-3`

YGR235C-ko-s

5`-AGGATATACAAAATAACTACTGTATTTGATATAGCACGGAAACACGGATCCCCGGGT
AATTAA-3`

YGR235C-ko-as

5`-TGTATGTATTTATAAGATGAATAAGCGCCAGGTGCTAAACAGAGTATCGATGAATTCG
AGCTCG-3`

YNL100W-ko-s

5`-GTCAAAGACAGAAGCAGCACACCATTTACCAATACAGCTTCCAAACGGATCCCCGGGT
AATTAA-3`

YNL100W-ko-as

5`-TTACTATGGACATGATAATGAACAAAAAAGATATCCGCTTGATAATCGATGAATTCG
AGCTCG-3`

6.1.14.2 Insertion von chromosomalen C-terminalen Protein-Tags

Die Insertionen von chromosomalen C-terminalen Protein-Tags erfolgten ebenfalls über homologe Rekombination. Der jeweilige Tag wurde zusammen mit einer Selektionskassette mittels PCR amplifiziert (6.1.4). Als Matrize dienten hier die Plasmide pYM2 für 3xHA-Tags und pYM9 für 6xHis-Tags (Knop et al., 1999). Die verwendeten sense-Primer setzten sich aus den 45 Nukleinsäuren vor dem Stoppkodon des jeweiligen offenen Leserahmens und einer plasmidspezifischen Sequenz zusammen. Als antisense-Primer konnten die entsprechenden Deletionsprimer (6.1.14.1) verwendet werden. Das amplifizierte DNA-Fragment wurde nach Reinigung (6.1.6) in den Stamm YPH499-Wildtyp transformiert (6.1.13).

Übersicht über die verwendeten Primer zur Insertion von chromosomalen C-terminalen Protein-Tags

Fcjl-3xHA-s

5`-GTCCAGCGCCTGGTAGAGATTCTTGACTGTGAAATAAGGACGTTGTACCCATACGATGTTCTG
AC-3`

Fcjl-6xHis-s

5`-GTCCAGCGCCTGGTAGAGATTCTTGACTGTGAAATAAGGACGTTGCATCACCATCACCATCACT
AGG-3`

YBR262C-3xHA-s

5`-CAGATAAGAACTCTGTCGATTGGATCTACTCCTGGGGTAAGAATTACCCATACGATGTTTCCTG
AC-3`

YBR262C-6xHis-s

5`-CAGATAAGAACTCTGTCGATTGGATCTACTCCTGGGGTAAGAATCATCACCATCACCATCACT
AGG-3`

YCL057C-A-3xHA-s

5`-GACGCCATCTTTAGATCCAGCGCTGGCCTCAGATCCTCGAAGGTTTACCCATACGATGTTTCCTG
AC-3`

YCL057C-A-6xHis-s

5`-GACGCCATCTTTAGATCCAGCGCTGGCCTCAGATCCTCGAAGGTTTCATCACCATCACCATCACT
AGG-3`

YFR011C-3xHA-s

5`-AATTGTTACGAAGAGATGGAAGAATTCAAGAAGCTCGTTATGGGTTACCCATACGATGTTTCCTG
AC-3`

YFR011C-6xHis-s

5`-AATTGTTACGAAGAGATGGAAGAATTCAAGAAGCTCGTTATGGGTCATCACCATCACCATCACT
AGG-3`

YGR235C-3xHA-s

5`-AAAACAGGGAATGCAATCAAAAATTGGACTGGCGTTAACGTGAAGTACCCATACGATGTTTCCT
GAC-3`

YGR235C-6xHis-s

5`-AAAACAGGGAATGCAATCAAAAATTGGACTGGCGTTAACGTGAAGCATCACCATCACCATCAC
TAGG-3`

YNL100W-3xHA-s

5`-ATAAGGTATGCAAGGGAACAGCTTTATGAAAAGTTGGAGCAAGCATACCCATACGATGTTTCCTG
AC-3`

YNL100W-6xHis-s

5`-ATAAGGTATGCAAGGGAACAGCTTTATGAAAAGTTGGAGCAAGCACATCACCATCACCATCAC
TAGG-3`

6.1.15 Verwendete *S.cerevisiae*-Stämme

Tabelle 4 Verwendete *S.cerevisiae*-Stämme

| Stamm | Genotyp | Referenz |
|-----------------------|---|---|
| W303 α | <i>MATα</i> , <i>ade2-1</i> , <i>his3-11, 15</i> <i>leu2</i> , <i>112</i> <i>trp1</i> , <i>ura23-53</i> , <i>can1-100</i> | (Rothstein und Sherman, 1980) |
| Δ <i>tim23</i> | W303, <i>tim23::HIS3</i> mit 2 μ Plasmid pVT100U[<i>TIM23</i> , <i>URA3</i>] | Zur Verfügung gestellt von Dr. Andreas Reichert |
| YPH499 | <i>MATα</i> <i>ade2-101</i> <i>his3-Δ200</i> <i>leu2- trp1-Δ63</i> <i>ura3-52</i> <i>lys2-801</i> | (Sikorski und Hieter, 1989) |
| Δ <i>fcj1</i> | YPH499, <i>fcj1::HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Δ <i>mcs10</i> | YPH499, <i>ycl057c-a::HIS3</i> | Dr. Dejana Mokranjac |
| Δ <i>mcs29</i> | YPH499, <i>ygr235c::HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Δ <i>mcs27</i> | YPH499, <i>ynl100w::HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Δ <i>mcs19</i> | YPH499, <i>yfr011c::HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Δ <i>mcs12</i> | YPH499, <i>ybr262c::HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Fcj1-6xHis | YPH499; <i>fcj1::FCJ1-6xHis-KAN</i> | Diese Arbeit |
| Mcs10-6xHis | YPH499, <i>ycl057c-a::YCL027C-A -6xHis-KAN</i> | Dr. Dejana Mokranjac |
| Mcs29-6xHis | YPH499, <i>ygr235c::YGR235C-6xHis-KAN</i> | Diese Arbeit |
| Mcs27-6xHis | YPH499, <i>ynl100w::YNL100W-6xHis-KAN</i> | Diese Arbeit |
| Mcs19-6xHis | YPH499, <i>yfr011c::YFR011C-6xHis-KAN</i> | Diese Arbeit |
| Mcs12-6xHis | YPH499, <i>ybr262c::YBR262C-6xHis-KAN</i> | Diese Arbeit |
| Fcj1-3xHA | YPH499; <i>fcj1::FCJ1-3xHA-HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Mcs10-3xHA | YPH499, <i>ycl057c-a::YCL027C-A -3xHA-HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Mcs29-3xHA | YPH499, <i>ygr235c::YGR235C-3xHA-HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Mcs27-3xHA | YPH499, <i>ynl100w::YNL100W-3xHA-HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Mcs19-3xHA | YPH499, <i>yfr011c::YFR011C-3xHA-HIS3</i> | Diese Arbeit |
| Mcs12-3xHA | YPH499, <i>ybr262c::YBR262C-3xHA-HIS3</i> | Diese Arbeit |

6.2 Proteinbiochemische Methoden

6.2.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen nach Bradford

Die Proteinkonzentrationen in Lösungen wurden nach der Methode von Bradford (Bradford, 1976) mit dem Bio-Rad-Proteinassay nach Anleitung des Herstellers bestimmt. Für die Ermittlung der Konzentrationen wurde eine Eichgerade mit Rinderseriumalbumin (BSA) erstellt. Dafür wurden die Extinktionen bei 595 nm bei BSA-Konzentrationen von 1, 3, 6, 9 und 12 μ g/ml gemessen. Die Messungen und Berechnungen der Proteinkonzentrationen der Lösungen erfolgten unter Benutzung des BioPhotometers plus (Eppendorf).

6.2.2 Trichloressigsäure-Präzipitation von Proteinen

Um Proteine aufzukonzentrieren oder in einen neuen Puffer zu überführen, wurden diese durch Zugabe von 72% (w/v) Trichloressigsäure (TCA) bis zu einer Endkonzentration von 14% (w/v) präzipitiert. Nach anschließender 30-minütiger Inkubation bei -80°C wurden die gefällten Proteine durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 xg und 4°C pelletiert. Zur Entfernung der Lipide folgte ein Waschritt mit 1 ml eiskaltem Aceton. Das Präzipitat wurde vollständig getrocknet, in Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95°C inkubiert.

6.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch diskontinuierliche SDS-PAGE aufgetrennt (Laemmli, 1970). Hierfür wurden Glasplatten einer Größe von 160×180 mm und Abstandshalter von ca. 1 mm Dicke verwendet. Diese wurden zunächst mit einem Bodengel abgedichtet. Die Acrylamidkonzentration im Trenngel variierte je nach benötigter Auflösung zwischen 10% und 18% und die Konzentration an Bisacrylamid zwischen 0,08% und 0,13%. Die Elektrophorese erfolgte bei 30 mA für 2-3 h. Anschließend wurden die Proteine auf Nitrozellulose transferiert (6.2.5).

Bodengel

1% Agarose in SDS-Laufpuffer

Trenngel

10-18% Acrylamid; 0,08-0,13% Bisacrylamid; 375 mM Tris/HCl pH 8,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,1% APS; 0,03% TEMED)

Sammelgel

5% Acrylamid; 0,03% Bisacrylamid; 60 mM Tris/HCl pH 6,8; 0,1% SDS (zur Polymerisation 0,05% APS; 0,1% TEMED)

SDS-Laufpuffer

50 mM Tris/HCl pH 8,3; 0,38 M Glycin; 0,1% SDS

SDS-Auftragspuffer (Laemmli-Puffer):

60 mM Tris/HCl, 2% SDS, 5% β -Mercaptoethanol, 10% Glycerin, 0,02% Bromphenolblau, pH 6,8

6.2.4 Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE)

Zur Bestimmung der Größe von Proteinkomplexen unter nativen Bedingungen wurde BN-PAGE durchgeführt. Dazu wurden zunächst 150 µg isolierte Mitochondrien (6.3.6) durch Zentrifugation für 12 min bei 17600 xg und 4°C pelletiert. Das Pellet wurde in 20 µl BN-Puffer nach Schägger resuspendiert und 15 min bei 4°C mit 3% (w/v) Digitonin solubilisiert (Wittig et al., 2006). Um große Membranbruchstücke zu entfernen, erfolgte ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 15000 xg und 4°C (TLA55-Rotor, Beckman Coulter). Die Probenvorbereitung und der Lauf der Blau-Native-Polyacrylamid-Gelelektrophorese erfolgte nach Angaben des Herstellers (NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System, Invitrogen). Nach der Elektrophorese wurden die Proteine durch Semidry-Western Blot Verfahren (7V, 130 mM für 1h bei 4°C) auf PVDF-Membran (Roth) übertragen (6.2.6). Die Analyse der Proteinkomplexe erfolgte mittels Immunodekoration (6.4.3).

BN-Puffer

50 mM NaCl, 50 mM Imidazol/HCl, 2 mM 6-Aminohexansäure, 1 mM EDTA, pH 7,0 (bei 4°C)

6.2.5 Transfer von Proteinen auf Nitrozellulosemembran

Mittels SDS-PAGE getrennte Proteine (6.2.3) wurden durch Elektrophorese auf Nitrozellulosemembranen transferiert (Blotting) (Towbin et al., 1979). Der Western Blot wurde ausschließlich im Semidry-Verfahren durchgeführt. Hierbei wurde zunächst die Nitrozellulosemembran ca. 15 min mit entsalztem Wasser angefeuchtet und anschließend in Blot-Puffer äquilibriert. Ein in Blot-Puffer getränktes Whatman Filterpapier wurde auf die Graphitelektrode (Anode) gelegt und die äquilibrierte Nitrozellulosemembran darauf gegeben. Das Trenngel wurde ebenfalls kurz in Blot-Puffer äquilibriert und auf der Membran platziert. Nachdem ein weiteres in Blot-Puffer getränktes Whatman Filterpapier auf das Trenngel gegeben wurde, wurden mit Hilfe einer Rolle Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten entfernt und die Blot-Kammer mit der zweiten Elektrode (Kathode) geschlossen. Der Proteintransfer auf die Membran wurde bei Raumtemperatur 1 h mit 1,5 mA/cm² durchgeführt. Nach dem Transfer wurden die Proteine mit Ponceau-Lösung gefärbt. Vor Beginn der Immunodekoration (6.4.3) wurde die Membran vollständig mit TBS entfärbt.

Blot-Puffer

150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol; 0,02% (w/v) SDS, 20 mM Tris

Ponceau S-Lösung

0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA

TBS

10 mM Tris/HCl; 150 mM NaCl; pH 7,5

6.2.6 Transfer von Proteinen auf PVDF-Membran

Mittels BN-PAGE aufgetrennte Proteinkomplexe (6.2.4) wurden durch Elektrophorese auf PVDF-Membranen gebロットet. Der Vorgang verlief mit einigen Unterschieden im Wesentlichen wie der Transfer auf Nitrozellulosemembran. Alle Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Die Membran wurde vor Benutzung für 15 min in absolutem Methanol aktiviert und 5 min in BN-Blott-Puffer äquiliibriert. Um die Epitope für Antikörper besser erreichbar zu machen, wurde das Gel für 5 min in SDS-Laufpuffer inkubiert und anschließend kurz in BN-Blot-Puffer gewaschen. Nach dem Proteintransfer auf die Membran wurden die Proteine 15 min mit 8% Essigsäure auf der Membran fixiert. Die Entfärbung der Coomassie-gefärbten Membran erfolgte schrittweise mit Methanol (25% - 100%). Vor Beginn der Immunodekoration (6.4.3) wurde die Membran vollständig mit 100% Methanol entfärbt.

BN-Blot-Puffer

NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System, Invitrogen

6.2.7 Synthese von radioaktiv markiertem Vorstufenprotein

Zur Synthese von mit ³⁵S-markierten Vorstufenproteinen wurden pGEM4-Konstrukte mit den entsprechenden Genen unter Kontrolle des SP6-Promotors benutzt. Radioaktiv markierte Vorstufenproteine ausgehend von den Konstrukten pGEM4-AAC (Pfanner et al., 1987) und pGEM4-CCHL (Steiner et al., 1995) wurden mit Hilfe des TNT Coupled Reticulocyte Lysate Systems (Promega) nach Angaben des Herstellers synthetisiert. Radioaktiv markierte Proteinorstufen ausgehend von den Konstrukten pGEM4-Por1 (Mayer et al., 1993), Su9(1-69)-DHFR (Pfanner und Neupert, 1987) und Dld1(1-72)-DHFR (Rojo et al., 1998) wurden durch getrennte Transkriptions- und Translationsreaktionen synthetisiert. Zur in vitro Transkription wurden 20 µl 5 x Transkriptions-Puffer mit 10 µl 0,1 M DTT, 4 µl RNasin (40 U/µl) (Promega), 20 µl Nukleosidtriphosphat-Mix (jeweils 2,5 mM), 5,2 µl 2,5 mM

m7G(5')ppp(5')G, 3 µl Sp6-Polymerase (25 U/µl) (Biozym), 28 µl H₂O und 10 µl Plasmid (1 µg/µl) gemischt. Nach einer Inkubation für 1 h bei 37°C wurde die Transkription durch Zugabe von 10 µl 10 M LiCl und 300 µl 96%-igem Ethanol mit anschließender Inkubation für 30 min bei -20°C gestoppt. Die präzipitierte RNA wurde durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 xg und 4°C pelletiert und der Überstand verworfen. Nach vollständiger Trocknung wurde die RNA in 100 µl destilliertem Wasser mit 40 U RNasin resuspendiert. Die RNA wurde entweder sofort verwendet oder bei -20°C gelagert. Zur in vitro Translation wurden 50 µl Nuklease-behandeltes Kaninchen-Retikulozytenlysate (Promega) mit 20 U RNasin, 1,75 µl Aminosäuren-Mischung ohne Methionin (jeweils 1 mM), 6 µl ³⁵S-markiertem Methionin (≤1200Ci/mmol, 10mCi/ml) (MP Biomedicals), 3,5 µl 15 mM Magnesiumacetat und 12,5 µl RNA gemischt. Nach einer Inkubation für 60-90 min bei 30°C wurde der Einbau von ³⁵S-markiertem Methionin durch Zugabe von 6 µl 58 mM nicht markiertem Methionin und 12 µl 1,5 M Saccharose gestoppt. Nach einer Zentrifugation für 30 min bei 90000 xg und 2°C wurde der Überstand aliquotiert und entweder sofort verwendet oder bei -80°C gelagert.

Transkriptions-Puffer

50 mM NaCl, 30 mM MgCl₂, 10 mM Spermidine, 200 mM Tris/HCl, pH 7,5

6.2.8 Autoradiographie und densitometrische Quantifizierung

Die bei in vitro Importexperimenten (6.3.9) mit radioaktiv markiertem Vorstufenprotein erhaltenen Nitrozellulosemembranen wurden mit Hilfe einer Rotlichtlampe vollständig getrocknet. Hierauf wurde ein Röntgenfilm (Kodak BioMax MR, SIGMA) 1-7 Tage exponiert. Die Quantifizierung erfolgte mit dem Programm „image-master“ (Amersham Biosciences).

6.2.9 Affinitätschromatographie von getagten Proteinen

6.2.9.1 Affinitätschromatographie Proteinen mit hexahistidyl-Tag

Zur Identifizierung von Interaktionspartnern wurden isolierte Mitochondrien von Hefe-Stämmen verwendet, die His-getagte Varianten von mitochondrialen Proteinen exprimierten (6.1.15). Die Identifikation erfolgte durch Bindung des getagten Proteins an Ni-NTA-Agarose (Qiagen) und Co-Präzipitation der Interaktionspartner. Hierzu wurden 1 mg isolierter Mitochondrien (6.3.6) 20 min im Rotationsschüttler bei 4°C in 1 ml Digitonin-Lysepuffer oder Triton-Lysepuffer solubilisiert. Durch Zentrifugation für 20 min bei 90000 xg und 4°C

(TLA55-Rotor, Beckman Coulter) wurden nicht solubilisierete Mitochondrien pelletiert. 5% des Überstandes wurden zur Kontrolle abgenommen, die darin enthaltenen Proteine mit TCA präzipitiert (6.2.2) und in Laemmli-Puffer aufgenommen (T/total Lysat). 100 µl Ni-NTA-Suspension wurden dreimal mit 1 ml entsalztem Wasser bei Raumtemperatur gewaschen und mit zweimal 500 µl Äquilibriumspuffer bei 4°C äquilibriumiert. Das solubilisierete Material wurde auf die äquilibriumierten Ni-NTA-Beads aufgetragen, woraufhin die Bindung für 1 h auf dem Rotationsschüttler bei 4°C erfolgte. Anschließend wurden 5% des Überstandes zur Kontrolle abgenommen, die darin enthaltenen Proteine mit TCA präzipitiert (6.2.2) und in Laemmli-Puffer aufgenommen (Ü/Überstand). Zur Reduktion der unspezifischen Bindungen wurde die Ni-NTA-Agarose dreimal mit 400 µl Äquilibriumspuffer bei 4°C gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 2 x Laemmli-Puffer mit 300 mM Imidazol (E/Eluat). Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immundekoration analysiert (6.2.3; 6.2.5; 6.4.3; 6.4.4).

Digitonin-Lysepuffer

50 mM $K_xH_yPO_4$, 50 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF, 1% (w/v) Digitonin, pH 8,0

Triton-Lysepuffer

50 mM $K_xH_yPO_4$, 50 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF, 1% (v/v) TritonX-100, pH 8,0

Äquilibriumspuffer

50 mM $K_xH_yPO_4$, 50 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 1 mM PMSF, 0,05% (w/v) Digitonin bzw. 0,05% (v/v) TritonX-100, pH 8,0

6.2.9.2 Affinitätschromatographie Proteinen mit MBP-Tag (Maltose bindendes Protein)

Das bei -20°C gelagerte Pellet einer *E.coli*-Kultur, in der die Expression von MBP-(Δ1-13)Ybr262c induziert wurde (6.3.1), wurde auf Eis aufgetaut und in 10 ml MBP-Lyse-Puffer resuspendiert. Nach Inkubation für 1 h bei 4°C im Rotationsschüttler erfolgte das Öffnen der Zellen durch Ultraschallbehandlung (12 x 10 sek. mit 10-sekündiger Unterbrechung; Output Control: 4; Duty Cycle: 60%; Branson Sonifier 250). Anschließend wurden zelluläre Bruchstücke von der cytosolischen Fraktion, in der sich das exprimierte Protein befand, durch Zentrifugation für 30 min bei 33000 xg und 4°C getrennt. Währenddessen würden 600 µl Amylose-Beads (NEB) dreimal mit 1 ml entsalztem Wasser bei Raumtemperatur gewaschen

und mit dreimal 1 ml MBP-Äquilibriumspuffer bei 4°C äquilibriumiert. Das Lysat wurde zusammen mit den äquilibriumierten Amylose-Beads für 1,5 h bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Im Anschluss daran wurde die Amylose-Matrix zur Reduktion der unspezifischen Bindungen dreimal mit 1 ml MBP-Äquilibriumspuffer bei 4°C gewaschen. Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit 500 µl Elutions-Puffer. Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktion wurde nach Bradford bestimmt (6.2.1). Bis zur weiteren Verwendung wurde das Eluat bei 4°C gelagert.

MBP-Lyse-Puffer

20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 x Roche Complete Protease Inhibitor, 1 mg/ml Lysozym, DNase; pH 7,4

MBP-Äquilibriumspuffer

20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA; pH 7,4

Elutions-Puffer

20 mM Tris/HCl, 200 mM NaCl, 1 mM EDTA, 10 mM Maltose; pH 7,4

6.3 Zellbiologische Methoden

6.3.1 Kultivierung von *E.coli* zur Expression von MBP-(Δ1-13)Ybr262c

Das Fusionsprotein MBP-(Δ1-13)Ybr262c wurde als Antigen zur Herstellung eines polyklonalen Antikörpers in *E.coli* exprimiert. Hierzu wurde das Plasmid pMAL-(Δ1-13)Ybr262 in den *E.coli*-Stamm XL-1 Blue (Agilent Technologies) transformiert (6.1.12). Die frisch transformierten Zellen wurden direkt zu 50 ml LB/AMP-Medium (6.5.1) gegeben und die Kultur über Nacht bei 37°C geschüttelt. 200 ml LB/AMP wurden mit der Vorkultur angeimpft ($OD_{600} = 0,2$) und unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Bei einer OD_{600} von 0,5 wurde die Genexpression durch Zugabe von 1 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Nach weiteren 3 Stunden Inkubation wurden die Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 3000 xg und 4°C geerntet. Das Zellpellet wurde einmal mit 50 ml destilliertem Wasser gewaschen und schließlich bei -20°C gelagert.

6.3.2 Kultivierung von *S.cerevisiae*

Die Hefestämme wurden wie früher beschrieben kultiviert (Sherman, 2002). Zur Lagerung über längere Zeiträume wurden Zellen in steriler, 15%-iger (v/v), wässriger Glycerollösung

resuspendiert und bei -80°C tiefgefroren. Diese Dauerkulturen wurden auf YPD-Kulturplatten ausgestrichen und bei 30°C inkubiert. Zur Selektion, bei dem später beschriebenen SILAC-Experiment (6.3.11) und bei der Analyse der Wachstumsphänotypen (6.3.4) der in dieser Arbeit generierten Deletionsstämme (6.1.15) wurden Synthetische-Medien (S-Medium) verwendet. Für alle weiteren Kultivierungen wurden Vollmedien (YPD- oder Lactat-Medium) verwendet (0). Die Wachstumstemperatur lag wie angezeigt bei 24°C , 30°C oder 37°C .

6.3.3 Austausch von Plasmiden in *S.cerevisiae* mittels 5-Fluororotsäure (5-FOA)

Im Zuge dieser Arbeit sollten Hefe-Stämme generiert werden, die ausschließlich Fusionen aus *GFP* und *TIM23* exprimieren, nicht aber Wildtyp-*TIM23*. Da *Tim23* essentiell ist, wurden hierzu die entsprechenden Plasmide (6.1.10) in den Deletionsstamm W303 $\Delta tim23$ transformiert (6.1.13; 6.1.15). Die transformierten Zellen wurden auf SD-Medium ohne Leucin ausplattiert (0). Heterotrophie für Leucin zeigten nur Zellen, die ein pRS315-Plasmid trugen. Somit konnten die gewachsenen Zellen entweder nur das gewünschte Konstrukt tragen, oder dieses und das ursprüngliche Plasmid pVT100U-Tim23. Dies trägt das *URA3*-Gen, das das Protein Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase kodiert. Um auf Kolonien zu selektieren, die ausschließlich das transformierte Konstrukt trugen, wurden Einzelkolonien auf 5-FOA-Medium ausgestrichen. Zellen die das Gen *URA3* beinhalten und somit Orotidin-5'-phosphat-Decarboxylase exprimieren, setzten 5-FOA über mehrere Zwischenschritte zu Fluorodeoxyuridin um. Dies ist ein Inhibitor der Thymidylatsynthetase. Dieses Protein ist für das Überleben der Zelle essentiell. Somit konnten auf diesem Medium nur Zellen überleben, die das transformierte Konstrukt, nicht aber das vorher enthaltene Plasmid in sich trugen (Boeke et al., 1984).

6.3.4 Analyse des Wachstumsphänotyps von *S.cerevisiae*

Zur Analyse der Auswirkung genetischer Manipulationen wurde die Wachstumsgeschwindigkeit der Mutanten bestimmt. Der Wachstumsphänotyp wurde zunächst auf Nährbodenplatten untersucht. Hierzu wurden die zu analysierenden Stämme auf Flüssigmedium kultiviert und durch mehrmaliges Verdünnen in der exponentiellen Phase gehalten. Die Kulturen wurden mit sterilem Wasser auf die gleiche Zelldichte verdünnt. Ausgehend von diesen Suspensionen wurden Verdünnungsreihen hergestellt (1:10, 1:100, 1:1000, 1:10000) und davon jeweils 3 μl auf YPD-Platten, Lactat-Platten oder Platten mit

Minimalmedium (SD oder SLac) getropft (0). Das Wachstum der Stämme wurde nach zwei- bis dreitägiger Inkubation bei 24°C, 30°C oder 37°C ausgewertet.

Alternativ wurde die Wachstumsgeschwindigkeit in Flüssigmedium photometrisch analysiert. Die zu untersuchenden Stämme wurden auf YPD- oder Lactat-Medium (0) kultiviert, durch mehrmaliges Verdünnen in der logarithmischen Phase gehalten und zu Beginn des Experiments auf die gleiche Zelldichte verdünnt. Anschließend wurde in Abständen von einer Stunde die OD₆₀₀ von der frühen bis zur späten logarithmischen Wachstumsphase gemessen.

6.3.5 Gewinnung von mitochondrialem Rohextrakt – „Mitochondrien-Schnell-Präparation“

Zur Überprüfung der erfolgreichen genetischen Manipulation von *S.cerevisiae* wurde mitochondrialer Rohextrakt untersucht. Auf diese Weise kann in einem Experiment die Genexpression und die mitochondriale Lokalisation der getagten Proteinvariante getestet werden. Dies ist von Bedeutung, da Tags am N- oder C-Terminus zu falscher Lokalisation führen können. Die zu überprüfenden Stämme und der korrespondierende Wildtyp-Stamm wurden über Nacht in YPD bei 30°C kultiviert (0). Von diesen Kulturen wurde die Zelldichte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt, ein Volumen entsprechend einer OD₆₀₀ von 10 abgenommen und die Zellen durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 xg und Raumtemperatur pelletiert. Die Zellen wurden im Anschluss in 800 µl SMK⁸⁰-Puffer mit 1 mM PMSF resuspendiert und dazu Glasperlen mit einer Durchschnittsgröße von 0,5 mm gegeben. Der Zellaufschluss erfolgte durch viermaliges vortexen für 30 Sekunden, unterbrochen durch einer jeweils 30-sekündigen Inkubation auf Eis. Die Zellrückstände wurden zusammen mit den Glasperlen mittels Zentrifugation für 3 min bei 1000 xg und 4°C sedimentiert. Der Überstand wurde abgenommen und daraus die Mitochondrien durch Zentrifugation für 10 min bei 20000 xg und 4°C pelletiert. Die Mitochondrien wurden schließlich in 20 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. 50 µl des Überstandes wurden mit Hilfe von TCA präzipitiert (6.2.2) und ebenfalls in 20 µl Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE, Western Blot und Immunodekoration unter Verwendung spezifischer Antikörper (6.2.3; 6.2.5; 6.4.3; 6.4.4).

SMK⁸⁰-Puffer

0,6 M Sorbitol, 80 mM KCl, 20 mM MOPS pH 7,4

6.3.6 Isolierung von Mitochondrien aus *S.cerevisiae*

Die Isolierung von Mitochondrien aus Hefe erfolgte nach der von Daum beschriebenen Methode (Daum et al., 1982). Ausgehend von einer 100 ml Kultur wurden die Zellen wiederholt verdünnt und somit das Volumen der Kultur erhöht (Endvolumen: 4-12 l). Die Zellen der Hauptkultur wurden bei einer OD₆₀₀ zwischen 0,6 und 1,2 durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 xg und Raumtemperatur geerntet. Anschließend wurde das Zellpellet mit 50-100 ml entsalztem Wasser gewaschen und das Feuchtgewicht der Zellen bestimmt. Daraufhin wurden diese in 2 ml Puffer 1 pro g Feuchtgewicht resuspendiert und 10 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 50-100 ml 1,2 M Sorbitol wurden die Zellen zum Verdau der Zellwände in 6,6 ml Puffer 2 pro g Feuchtgewicht für 40-60 min bei 30°C geschüttelt. Die so entstandenen Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation für 5 min bei 700 xg und 4°C geerntet und in 6,6 ml eiskaltem Homogenisierungspuffer pro g Feuchtgewicht resuspendiert. Die Zellmembranen wurden mit Hilfe eines Teflon-homogenisators durch 10-15 Stöße aufgebrochen. Der Homogenisator wurde mit demselben Volumen Homogenisierungspuffer gewaschen. Danach wurden unaufgeschlossene Sphäroplasten, Zellkerne und Membranbruchstücke für 5 min bei 1200 xg und 4°C abzentrifugiert und der Überstand zur Erhöhung der Reinheit erneut bei gleichen Bedingungen zentrifugiert. Anschließend wurde die Suspension für 12 min bei 11000 xg und 4°C zentrifugiert, um die Mitochondrien zu pelletieren. Das Pellet wurde in 30 ml SM-Puffer resuspendiert und zweimal für 5 min bei 1300 xg und 4°C zentrifugiert. Final wurden die Mitochondrien durch Zentrifugation des Überstands für 12 min bei 12000 xg und 4°C pelletiert, in ca. 0,5 ml SM-Puffer aufgenommen, in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80°C gelagert.

Puffer 1

100 mM Tris, 10 mM DTT

Puffer 2

1,2 M Sorbitol, 0,45 mg/ml Zymolyase und 20 mM K_xH_yPO₄ pH 7,4

Homogenisierungspuffer

0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 0,2% BSA, 1 mM PMSF, 10 mM Tris/HCl pH 7,4

SM-Puffer

0,6 M Sorbitol, 20 mM MOPS pH 7,4

6.3.7 Bestimmung der Topologie von mitochondrialen Proteinen durch Proteasebehandlung

Zur Bestimmung der Topologie von mitochondrialen Proteinen wurden je 50 µg Mitochondrien in eiskaltem SM-Puffer, Schwell-Puffer oder Lyse-Puffer im Verhältnis 1:10 verdünnt und 20 min auf Eis inkubiert. Der osmotische Schock durch die Inkubation mit Schwell-Puffer führt zu einem Anschwellen des Matrixraumes und aufgrund dessen zum Zerreißen der Außenmembran. Mitochondrien mit zerstörter Außenmembran werden als Mitoplasten bezeichnet. In Mitoplasten ist der Intermembranraum (intermembrane space/IMS) geöffnet und dadurch sind Innenmembranproteine für Proteinase K (PK) zugänglich. Die Inkubation in Lyse-Puffer führt zur Zerstörung der mitochondrialen Membranhülle, wodurch Matrixproteine für PK zugänglich gemacht werden. Einerseits wurden intakte Mitochondrien und Mitoplasten unbehandelt belassen andererseits parallel zusammen mit lysierten Mitochondrien mit 100 µg/µl PK versetzt. Die Proteolyse wurde nach 30 min durch Inkubation mit 1 mM PMSF für 10 min gestoppt. Nach Zentrifugation für 20 min bei 20000 xg und 4°C wurde das pelletierte Material in 500 µl SM-Puffer resuspendiert. Um noch aktive PK zu inaktivieren, wurden anschließend die Proteine mit TCA (6.2.2) präzipitiert. Die Präzipitate wurden in Laemmli-Puffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodekoration analysiert (6.2.3; 6.2.5; 6.4.3; 6.4.4).

SM-Puffer

0,6 M Sorbitol, 20 mM MOPS pH 7,4

Schwell-Puffer

20 mM MOPS pH 7,4

Lyse-Puffer

0,1% (v/v) TritonX-100, 20 mM MOPS pH 7,4

6.3.8 Bestimmung der Membranassoziation von mitochondrialen Proteinen durch alkalische Extraktion

Mit Hilfe von alkalischer Extraktion wurde die Assoziation von Proteinen mit den mitochondrialen Membranen untersucht. Hierzu wurden 100 µg isolierte Mitochondrien mit SM-Puffer auf eine Konzentration von 1 mg/ml verdünnt, mit gleichem Volumen einer 200 mM Natriumkarbonatlösung versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Trennung der Membranproteine von den löslichen Proteinen wurden die Proben für 30 min bei 91000 xg und 4°C (TLA55-Rotor; Beckman Optima MAX-XP Ultrazentrifuge) zentrifugiert. Der

Überstand wurde abgenommen und die darin enthaltenen Proteine mit TCA gefällt (6.2.2). Die pelletierten Membranproteine und die präzipitierten löslichen Proteine wurden anschließend in Laemmli-Puffer aufgenommen und mittels SDS-PAGE, Western Blot und Immunodekoration analysiert (6.2.3; 6.2.5; 6.4.3; 6.4.4).

6.3.9 Import von Vorstufenprotein in Mitochondrien

Für in vitro Importexperimente von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen (6.2.7) wurden 25 µg Mitochondrien mit SI-Puffer mit 2 mM ATP, 2 mM NADH, 5 mM Kreatinphosphat und 100 µg/ml Kreatinkinase im Verhältnis 1:33 verdünnt. Der Import wurde durch Zugabe von 1 µl Retikulozytenlysat gestartet und die Reaktionsansätze bei 25°C für 1, 3, 9 und 20 min inkubiert. Die Reaktion wurde durch fünffache Verdünnung mit kaltem SEMK⁸⁰-Puffer gestoppt. Um nicht importierte Proteinvorstufen zu entfernen, wurde PK bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml zugegeben. Nach einer Inkubation für 15 min auf Eis wurde die Proteolyse durch Zugabe von 2 mM PMSF gestoppt. Nach Pelletierung der Mitochondrien durch Zentrifugation für 10 min bei 25000 xg und 4°C wurden diese in Laemmli-Puffer aufgenommen und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt (6.2.3). Die Analyse erfolgte über Western Blot und Autoradiographie (6.2.5; 6.2.8).

Der Import von rekombinantem prä-Su9-DHFR-His6 wurde im Wesentlichen identisch durchgeführt. Der Import im 50 µg Mitochondrien wurde durch Zugabe von 1 µg rekombinantem Protein gestartet. Die Analyse erfolgte über SDS-PAGE und Immunoblotting unter Verwendung eines spezifischen Antikörpers gegen den hexahistidy-Tag (penta-His; Qiagen) (6.2.3; 6.2.5; 6.4.4).

SI-Puffer

3% BSA, 0,5 M Sorbit, 80 mM Kaliumchlorid, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM Kaliumphosphat, 1 mM Manganchlorid, 50 mM Hepes/KOH pH 7,4

SEMK⁸⁰-Puffer

0,6 M Sorbitol, 1 mM EDTA, 80 mM KCl, 20 mM MOPS pH 7,4

6.3.10 Subfraktionierung von Mitochondrien

Zur Generierung und Trennung von Vesikeln bestehend aus reiner Außenmembran, reiner Innenmembran und Vesikeln bestehend aus beiden Membranen wurde das Protokoll von Pon L. et al. modifiziert (Pon et al., 1989). Die Hefezellen wurden in Lactat-Medium (0) bei 24°C kultiviert und die Mitochondrien isoliert (6.3.6). Zu den Mitochondrien wurde sofort nach der Isolierung 20 ml Schwell-Puffer mit 0,5 mM EDTA, 1,0 mM PMSF und 1x Protease Inhibitor Cocktail (Roche) tröpfchenweise gegeben und die Suspension für 30 min auf Eis unter Rühren inkubiert. Im Anschluss wurden die Mitochondrien nach Zugabe von 2,5 M Saccharose bis zu einer Konzentration von 0,5 M für 15 min unter Rühren geschrumpft. Zur Generierung der Vesikel wurden die Proben auf Eis mit Ultraschall behandelt (3 x 30 sek. mit 30-sekündiger Unterbrechung; Output Control: 0; Duty Cycle: 60%; Branson Sonifier 250). Die Abtrennung von noch intakten Mitochondrien erfolgte durch Zentrifugation für 20 min bei 20000 xg und 4°C. Der Überstand wurde zur Aufkonzentration der Vesikel mit 200 µl 2,5 M Saccharose unterschichtet und für 100 min bei 118000 xg und 4°C zentrifugiert (SW 41 Ti Rotor, Beckman Coulter). Dieser Überstand wurde Großteils abgenommen und die Vesikel im verbliebenen Überstand und der 2,5 M Saccharose resuspendiert. Die Suspension wurde durch 10 Stöße mit einem Teflonpotter homogenisiert und die Saccharosekonzentration mittels Refraktometer bestimmt. Nach Einstellung der Saccharosekonzentration mit 2,5 M Saccharose bzw. mit entsalztem Wasser auf eine Konzentration von 1,3 M wurde die Suspension unter einen linearen Saccharose-Gradienten von 0,8 M bis 1,25 M Saccharose (Saccharose in 20 mM MOPS pH 7,4 mit 0,5 mM EDTA) geschichtet. Die Membranvesikel wurden durch Dichtegradienten-Zentrifugation bis zum Erreichen des Gleichgewichts (24 h bei 200.000 g und 4°C (SW 41 Ti Rotor, Beckman Coulter) getrennt. Der Gradient wurde in 21 Fraktionen mit je 600 µl Volumen aufgeteilt, die in den Fraktionen enthaltenen Proteine zweimal mit TCA gefällt (6.2.2) und in Laemmli-Puffer aufgenommen. Die Analyse der Fraktionen erfolgte durch SDS-PAGE, Western Blot und Immunodekoration (6.2.3; 6.2.5; 6.4.3). Für SILAC-Analysen (6.3.11) erfolgte die Fraktionierung in Protein LoBind Reaktionsgefäße (Eppendorf). Die Proben wurden sofort nach der Fraktionierung in flüssigem Schickstoff tiefgefroren und bis zur Analyse bei -80°C gelagert.

6.3.11 Quantitative massenspektrometrische Analyse von mitochondrialen Vesikeln (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture/SILAC)

SILAC ist eine Form der quantitativen Massenspektrometrie (Ong et al., 2002). Hierbei werden zwei Kulturen parallel auf definierten Medien kultiviert. Die Medien der beiden zu vergleichenden Kulturen unterscheiden sich in den zugesetzten Aminosäuren. Eine Kultur wächst in Medium mit unmarkierten, leichten Aminosäuren mit den Isotopen Wasserstoff, ^{12}C oder ^{14}N . Die Referenzkultur allerdings wächst in Medium mit Aminosäuren, die mit schweren, stabilen Isotopen wie Deuterium, ^{13}C oder ^{15}N markiert sind. Durch Inkorporation dieser Aminosäuren wird somit das gesamte Proteom der Referenzkultur markiert. Nach paralleler Herstellung der Proben werden leichte und schwere Proben gemischt und massenspektrometrisch analysiert. Da sich die durch Proteolyse generierten Peptide in ihrer Masse unterscheiden, überlagern sich die Identifikationsausschläge der gleichen Peptide nicht, sondern bilden sogenannte SILAC-Paare. Somit können durch diese Technik, wie bei herkömmlicher Massenspektrometrie, einerseits Proteine in den Proben identifiziert werden. Andererseits kann somit durch Vergleich der Ausschläge eine Quantifizierung eines Proteins in der Probe relativ zur Referenzprobe vorgenommen werden. Um Anreicherung von Proteinen in einzelnen Fraktionen darzustellen, wird häufig als Referenzprobe ein sogenannter SILAC-Standard verwendet. Dies ist eine markierte Probe oder eine definierte Mischung markierter Proben, die als Referenz für jede zu analysierende Fraktion verwendet wird. Somit stellt sich das Ergebnis als Anreicherung des Proteins in einzelnen Fraktionen relativ zum Standard dar.

In dem in dieser Arbeit beschriebenen Experiment wurden die Zellen zuerst auf SLac Medium (0), das entweder Lysin mit den Isotopen ^{12}C und ^{14}N (SIGMA) oder ^{13}C und ^{15}N (Cambridge Isotope Laboratories) enthält, bei 24°C kultiviert. Dabei wurde der Lysin-auxotrophe Hefestamm YPH499-Wildtyp verwendet. Die Mitochondrien wurden isoliert (6.3.6) und subfraktioniert (6.3.10). Da das Interesse Proteinen galt, die spezifisch in Fraktionen intermediärer Dichte angereichert waren, wurde für die Analyse als SILAC-Standard eine Mischung zu gleichen Anteilen aus Fraktion 9-13 verwendet. Sämtliche Schritte der Probenvorbereitung wurden in LoBind Reaktionsgefäßen (Eppendorf) durchgeführt. Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und $15\ \mu\text{l}$ jeder zweiten Fraktion des leichten Gradienten mit $15\ \mu\text{l}$ des Standards gemischt. Nach Zugabe von $60\ \mu\text{l}$ Denaturierungspuffer folgte eine Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Cystein-Reste durch Inkubation mit $5,5\ \text{mM}$ 2-Iodoacetamid für 1h alkyliert. Die Proben wurden mit dem zweifachen Probenvolumen mit Wasser verdünnt und über Nacht mit

der Endopeptidase LysC (Wako Bioproducts) verdaut. Das Verhältnis von Protein zu Enzym lag jeweils bei 1:20. Vor der Massenspektrometrie schließlich erfolgte eine Ansäuerung der Proben mit 1% (v/v) Trifluoressigsäure und die Entfernung der Salze und Aufkonzentration der Proben mittels C18 StageTips.

Die Reverse Phasentrennung der Peptide wurde mit Hilfe eines Easy nLC Nanoflow HPLC Systems (Thermo Fisher Scientific) durchgeführt. Anschließend wurden die Peptidmischungen auf eine RepoSil-Pur C₁₈-AQ (Dr. Maisch) Säule geladen (Beadgröße: 1,8 µm; Länge: 40 cm; Durchmesser: 75 µm) (Thakur et al., 2011) und mit einem nicht-linearen Gradienten von 5-60% Acetonitril über 5 h eluiert. Die Analyse der Peptide erfolgte mit einem LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer (Thermo Fisher Scientific) wie schon früher beschrieben (Forner et al., 2006; Olsen et al., 2004).

Die Analyse der Rohdaten erfolgte unter Verwendung MaxQuant-Software (Cox und Mann, 2008). Mittels Mascot (Perkins et al., 1999) wurden die Ausschläge im Chromatogramm gegen eine Datenbank abgeglichen. Diese enthielt die Translationen aller Geneinträge der Saccharomyces Genome Database (Stand: 12.12.2007) sowie Translationen der Sequenzen in entgegengesetzter Richtung und die 175 meistbeobachteten Kontaminationen. Die Proteinquantifizierung in der hier durchgeführten Analyse basiert ausschließlich auf Sequenzen, die nur einem einzigen Protein zugeordnet werden konnten.

Die Prozessierung der Proben und deren Analyse wurden von Dirk Walther (Max-Planck-Institut für Biochemie AK Matthias Mann; Proteomics and Signal Transduction) durchgeführt.

Denaturierungspuffer

9M Harnstoff, 3M Thioharnstoff, 1,5mM DTT, 100mM Tris/HCl pH 8

6.3.12 Fixierung von Hefezellen

6.3.12.1 Chemische Fixierung von Hefezellen zur Einbettung in Kunstharz

Zur chemischen Fixierung von Hefezellen wurden die einzelnen Stämme zunächst aus einer Dauerkultur frisch auf einer Agarplatte ausgestrichen (6.3.2). Mit dieser Kultur wurde Lactat-Medium (0) angeimpft und die Kultur daraufhin für mindestens zwei Tage bei 30°C unter Schütteln kultiviert. Durch mehrmaliges Verdünnen wurde die Kultur in diesem Zeitraum stets in der logarithmischen Phase gehalten. Die zur Fixierung verwendete Hauptkultur wurde bei einer OD₆₀₀ von 0,5-0,8 durch Zentrifugation für 5 min bei 3000 xg und Raumtemperatur geerntet. Nach einem Waschschrift mit 10 ml 2,5%-iger

Saccharoselösung wurde das Zellpellet in 1 ml, auf 30°C vorgewärmten Fixierpuffer aufgenommen und für 2 h bei 30°C inkubiert. Die nun fixierten Zellen wurden zunächst mit 1 ml DTT-Puffer gewaschen und daraufhin im selben Puffer für 10 min bei 30°C inkubiert. Nach einem Waschschriff mit 1 ml Sorbitol-Puffer erfolgte das Öffnen der Zellenwände durch Inkubation für 30 min in 0,5 ml desselben Puffers, dem 5 mg/ml Zymolyase und 0,05 mg/ml Glucoronidase zugesetzt wurden. Abschließend wurden die Zellen einmal in 1 ml Kakodylatpuffer gewaschen, im selben Puffer wieder resuspendiert und bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

Die Fixierung und Einbettung der in dieser Arbeit generierten Deletionsstämme (6.1.15) wurde von Christian Körner (Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie, LMU München) und Sabine Tost (Anatomisches Institut, LMU München) durchgeführt.

Fixierpuffer

0,15 M Natriumkakodylat pH 6,8, 5 mM MgCl₂, 2,5% Saccharose, 3% Glutaraldehyd; pH 6,8

DTT-Puffer

100 mM Tris/HCl; 1,2 M Sorbitol, 25 mM DTT; 5 mM Na₂-EDTA; pH 8,0.

Sorbitol-Puffer

1,2 M Sorbitol; 0,1 M Kaliumphosphat/Zitronensäure pH 5,8

Kakodylatpuffer

0,15 M Natriumkakodylat, 5 mM MgCl₂, 2,5% Saccharose; pH 6,8

6.3.12.2 Chemische Fixierung von Hefezellen zur Immunogold-Elektronenmikroskopie

Die Fixierung von Hefezellen zur Immunogold-Elektronenmikroskopie wurde von Dr. Fulvio Reggiori und Janice Griffith (Department of Cell Biology and Institute of Biomembranes, University Medical Centre Utrecht) durchgeführt. Dazu wurden Hefezellen in YP-Medium mit 2% Glycerol oder Lactat-Medium bis zur logarithmischen Phase kultiviert. Anschließend wurden die Zellen nach einer modifizierten Methode von Tokuyasu (Tokuyasu, 1973) chemisch fixiert (Griffith et al., 2008).

6.3.13 Elektronenmikroskopie

6.3.13.1 Elektronenmikroskopie von in Kunstharz eingebetteten Hefezellen

Zur Analyse der mitochondrialen Ultrastruktur der in dieser Arbeit generierten Deletionsmutanten (6.1.15) wurden Zellen dieser Stämme elektronenmikroskopisch untersucht. Die chemisch fixierten Zellen (6.3.12.1) wurden 3 min bei 1000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert, in 1% Thiocarbohydrazid resuspendiert und bei Raumtemperatur inkubiert. Nachdem die Zellen zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen wurden, erfolgte die Färbung für je 6 min in 1% OsO₄ und 1% Kaliumferrocyanid bei Raumtemperatur. Die gefärbten Zellen wurden zunächst viermal mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend mit Ethanol dehydriert. Nach zwei Waschschritten mit Propylenoxid erfolgte die Einbettung in Araldit (Serva). Mit Hilfe eines Ultracut E Ultramikrotoms (Reichert Jung) wurden Schnitte mit einer Stärke von 45 nm angefertigt, welche auf Kupfergrids überführt wurden. Die Kontrastierung der Schnitte erfolgte durch jeweils 5-minütige Inkubation in Uranylacetat- und Bleinitratlösung. Die Analyse der Schnitte wurde an Transmissionselektronenmikroskopen der Hersteller Philips bzw. Zeiss durchgeführt (CM 10, Philips bzw. EM 900, Zeiss).

Die elektronenmikroskopische Analyse der in dieser Arbeit generierten Deletionsstämme (6.1.14.1; 6.1.15) wurde von Christian Körner (Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie, LMU München) und Sabine Tost (Anatomisches Institut, LMU München) durchgeführt.

6.3.13.2 Immunogold-Elektronenmikroskopie

Die Submitochondriale Lokalisierung der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen MICOS-Komponenten erfolgte mittels Immunogold-Elektronenmikroskopie. Dazu wurden die hierfür fixierten Hefezellen (6.3.12.2) wie früher beschrieben in 12% Gelatine eingebettet, bei 4°C in 1 mm³ Blöcke aufgeteilt und in flüssigen Stickstoff tiefgefroren (Griffith et al., 2008). Die Anfertigung von Schnitten der Stärke von 45-60 nm erfolgte mit Hilfe eines UCT Ultramikrotoms (Leica) bei -120°C. Anschließend wurden die Schnitte aufgetaut und auf Kupfergrids überführt.

Zur Markierung der Proteine wurden die Schnitte auf den Kupfergrids zunächst entweder mit anti-HA-Antikörper (erhalten von Guojun Gu, Washington University) oder anti-Porin-Antikörper (Molecular Probes/Invitrogen) inkubiert. Anschließend folgte die Inkubation mit

Sekundärantikörper, an den Goldpartikel mit einer Größe von 10 nm gekoppelt wurden. Dessen Herstellung erfolgte nach der Methode von Slot und Geuze (Slot und Geuze, 1985). Die Analyse erfolgte mit Hilfe eines JOEL 1010 Transmissionselektronenmikroskops (JOEL, Tokio, Japan).

Die Immunogold-Elektronenmikroskopie der in dieser Arbeit generierten Stämme (6.1.14.2; 6.1.15) wurde von Dr. Fulvio Reggiori und Janice Griffith (Department of Cell Biology and Institute of Biomembranes, University Medical Centre Utrecht) durchgeführt (ausführliche Beschreibung der Methode siehe Griffith et al., 2008).

6.4 Immunologische Methoden

6.4.1 Herstellung von polyklonalen Antikörpern

Gegen die Proteine Ycl057c-a/Mcs10 und Ybr262c/Mcs12 wurden polyklonale Antikörper generiert. Zunächst wurden die Antigene His6-Ycl057c-a und MBP-(Δ 1-13)Ybr262c rekombinant in einem *E.coli*-Expressionsstamm exprimiert und daraus aufgereingt (6.2.9.2; 6.3.1). Diese gereinigten Proteine wurden zur Immunisierung von Kaninchen verwendet.

Zur Primärimmunisierung wurden 200 μ l (1 μ g/ μ l) des Antigens mit demselben Volumen TiterMax Gold (Sigma) gemischt. Die Injektion erfolgt subkutan an mindestens drei Stellen. Weitere Immunisierungen mit je 200 μ g Antigen wurden im Abstand von vier Wochen durchgeführt. Hierbei wurde TiterMax Gold durch Freund's Adjuvant Incomplete (Sigma) ersetzt. Ab der zweiten Immunisierung wurden dem Kaninchen, im Abstand von acht bis zehn Tage nach der Injektion 20-25 ml Blut entnommen, aus dem Serum gewonnen wurde. Hierzu wurde das geronnene Blut für 5 min bei 3000 xg und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde in eine neues Zentrifugationsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 12 Minuten bei 12000 xg und 4°C wurde der Überstand in ein frisches 15 ml Schraubdeckelgefäß überführt und für 30 Minuten auf 56°C erhitzt, um das Komplementsystem zu inaktivieren. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

6.4.2 Affinitätsreinigung von Antikörpern

Zur Affinitätsreinigung von Antikörpern wurden die jeweiligen Antigene an Sulfolink Coupling Gel (Thermo Fisher Scientific) gekoppelt. Hierzu wurde 1 ml Säulenmaterial mit 6 ml Kopplungspuffer äquilibriumiert und anschließend für 45 min mit 1 mg Antigen in 1 ml desselben Puffers bei Raumtemperatur inkubiert. Der Durchfluss wurde verworfen und das Säulenmaterial mit 3 ml Kopplungspuffer gewaschen. Daraufhin wurden die noch freien Bindungsstellen der Säule durch Inkubation mit Blockpuffer für 45 min bei Raumtemperatur geblockt. Der Durchfluss wurde wiederum verworfen und die Säule mit 16 ml 1 M NaCl gewaschen. Nach dem Waschen des Säulenmaterials mit je 10 ml Waschpuffer 1, Elutionspuffer 2, Waschpuffer 2, Elutionspuffer 3 und erneut mit Waschpuffer 1 erfolgte die Bindung des Antikörpers. 6 ml Antiserum wurden hierzu mit 24 ml Waschpuffer 1 mit 1 mM PMSF und 1 x Roche Complete Protease Inhibitor gemischt. Die Antiserumlösung wurde unter Verwendung einer peristaltischen Pumpe auf die Säule aufgetragen und der Durchfluss zweimal erneut aufgetragen. Anschließend erfolgten zwei Waschschrte mit 10 ml Waschpuffer 1 bzw. 10 ml Waschpuffer 3. Schließlich wurde der Antikörper durch aufeinanderfolgende Zugabe von je 10 ml Elutionspuffer 1, Elutionspuffer 2 und Elutionspuffer 3 eluiert. Das Eluat wurde in Fraktionen von je 1 ml gesammelt. In diesen wurde der vorherrschende pH durch Zugabe von je 100 µl Neutralisierungspuffer 1 (Elution 1 und 2) bzw. Neutralisierungspuffer 2 (Elution 3) neutralisiert. Die Proteinkonzentration der einzelnen Fraktionen wurde nach Bradford (6.2.1) bestimmt. Die Fraktionen mit hohem Proteingehalt wurden mittels Western Blot (6.2.5) und Immunodekoration (6.4.3) auf ihren Antikörpergehalt untersucht. Die Fraktionen mit hoher Konzentration des gewünschten Antikörpers wurden bei -20°C gelagert. Die Säule wurde anschließend mit 10 ml Waschpuffer 1 gewaschen und mit 0,05% (w/v) Natriumazid in 2 ml des gleichen Puffers bei 4°C gelagert.

Kopplungspuffer

50 mM Tris, 5 mM EDTA; pH 8,5

Blockpuffer

50 mM Cystein, 50 mM Tris, 5 mM EDTA; pH 8,5

Waschpuffer 1

10 mM Tris/HCl; pH 7,5

Waschpuffer 2

10 mM Tris/Base; pH 8,8

Waschpuffer 3

500 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl; pH 7,5

Elutionspuffer 1

100 mM Natriumcitrat; pH 4,0

Elutionspuffer 2

100 mM Glycin/HCl; pH 2,5

Elutionspuffer 3

100 mM Na₃PO₄; pH 11,5

Neutralisierungspuffer 1

1 M Tris/Base; pH 8,8

Neutralisierungspuffer 2

1 M Glycin/HCl; pH 2,5

6.4.3 Immundekoration von Proteinen mit spezifischen Antikörpern

Für Antikörper, die aus Kaninchenplasma gewonnenen wurden, wurde in der Regel folgendes Protokoll angewendet. Nach dem Proteintransfer auf die Nitrozellulose- oder PVDF-Membranen (6.2.5; 6.2.6) wurden die noch freien Bindungsstellen durch Inkubation in Blocklösung für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C abgesättigt. Daraufhin folgte die Dekoration der Proteine mit spezifischen Antiseren oder affinitätsgereinigten Antikörpern für ca. 3 h bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4°C. Je nach Stärke des Antikörpers wurden diese zwischen 1:250 und 1:5000 in Blocklösung verdünnt. Nach drei Waschschritten (5 min in TBS, 10 min in TBS/T und 5 min in TBS) folgte eine Inkubation für 1 h bei Raumtemperatur mit Zweitantikörper (Goat Anti Rabbit-IgG Horseradish Peroxidase, Bio-Rad), der gegen Immunglobulin G von Kaninchen gerichtete war. Dieser wurde 1:10000 in Blocklösung verdünnt. Anschließend wurden die Membranen wie oben beschrieben dreimal gewaschen. Die gebundenen Zweitantikörper wurden schließlich über die Peroxidase mittels Chemolumineszenz nachgewiesen. Die hierbei stattfindende Reaktion wurde durch Zugabe der Lösungen ECL1 und ECL2 gestartet. Die beiden Lösungen wurden erst kurz vor der Anwendung im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Detektion der Signale erfolgte durch Exposition der Membranen auf Röntgenfilmen (Fuji).

TBS/T

TBS mit 0,05% TritonX-100

Blocklösung

5% (w/v) Magermilchpulver in TBS-Puffer

ECL1

100 mM Tris/HCl; 0,044% (w/v) Luminol; 0,0066% (w/v) p-Coumarinsäure; pH 8,5

ECL2

100 mM Tris/HCl; 0,024% (w/v) H₂O₂; pH 8,5

6.4.4 Immundetektion von Proteinen mit käuflich erworbenen Antikörpern

Für die Dekoration von hexahistidyl- und dreifach-HA-Tags wurden käuflich erworben Antikörper verwendet (anti-penta-His, Qiagen; anti-HA, Roche). Die Anwendung dieser Antikörper erfolgte nach Angaben der Hersteller.

6.5 Medien

6.5.1 *E.coli*-Medien

LB-Medium

10g/L Bacto-Trypton, 5g/L Hefeextrakt, 10g/L Natriumchlorid

LB/AMP-Medium

Autoklaviertes LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin

LB/Tet-Medium

Autoklaviertes LB-Medium mit 10 µg/ml Tetrazyklin

6.5.2 *S.cerevisiae*-Medien

Lactat-Medium:

3 g/L Hefeextrakt; 0,5 g/L Calciumchlorid; 0,5 g/L Natriumchlorid; 0,6 g/L Magnesiumchlorid; 1 g/L Kaliumdihydrogenphosphat; 1 g/L Ammoniumchlorid; 3 mg/L Eisen-(III)-chlorid; 2% (w/v) Lactat; pH mit NaOH auf 5,5 eingestellt

Synthetisches-Medium (S-Medium):

1,7 g/L Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/L Ammoniumsulfat mit 2% (w/v) Glukose (SD) oder 2% (w/v) Lactat (SLac)

Auxotrophiemarker:

Adenin 20 mg/L; Uracil 20 mg/L; Histidin 30 mg/L; Leucin 30 mg/L; Lysin 30 mg/L; Methionin 30 mg/L; Tryptophan 30 mg/L

YP-Medium:

1% (w/v) Hefeextrakt; 2% (w/v) Bacto-Pepton; pH mit HCl auf 5 eingestellt

Glukose wurde als 40% (w/v) konzentrierte Stammlösungen separat autoklaviert und dem autoklavierten YP-Medium zugegeben (YPD)

YPD-G418

YPD-Medium mit 500 µg/ml Geneticin (G418; Kanamycinderivat)

5-Fluororotsäure-Medium

1,7 g/L Yeast Nitrogen Base ohne Aminosäuren und Ammoniumsulfat; 5 g/L Ammoniumsulfat mit 2% (w/v) Glukose, 50 mg/L Uracil, 1 g/L 5-Fluororotsäure

Auxotrophiemarker:

Adenin 20 mg/L; Histidin 30 mg/L; Leucin 30 mg/L; Lysin 30 mg/L; Methionin 30 mg/L; Tryptophan 30 mg/L

Für die Herstellung von Kulturplatten wurden sämtlichen Medien vor dem Autoklavieren zusätzlich zu den Inhaltsstoffen des entsprechenden Flüssigmediums 2% (w/v) Agar zugefügt.

6.6 Chemikalien und Geräte

6.6.1 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agfa-Gevaert, München

Entwickler, Fixierer für Röntgenfilme

Agilent Technologies, Böblingen

E. coli XL-1 Blue

AppliChem, Darmstadt

Tris, Ampicillin, Magermilchpulver, APS, H₂O₂

Beckton Dickenson, Heidelberg

Bacto-Trypton

Biorad, München

Proteinstandard und Reagenzien zur Proteinbestimmung, Meerrettich-Peroxidasegekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-Antikörper

Biozym, Hessisch Oldendorf

Sp6-Polymerase

Braun, Melsungen

Kanülen, Spritzen

Cambridge Isotope Laboratories, Andover (USA)

¹³C, ¹⁵N-markiertes Lysin

Eppendorf, Hamburg

Protein LoBind Reagenzgefäße

Fuji, Düsseldorf

Medical X-ray Film Super RX 13 x 18 cm

GE Healthcare, München

Bacto-Pepton

Gerbu, Gaiberg

DTT, HEPES, MOPS

Greiner, Kremsmünster

15- und 50 ml Reaktionsgefäße

Fermentas, St. Leon-Rot

Molekulargewichts-Standards für SDS-PAGE

Invitrogen, Groningen (NL)

anti-Porin-Antikörper, Yeast Nitrogen Base, NativePAGE Novex Bis-Tris Gel System

Metabion, Martinsried

Oligonukleotide

MP Biomedicals, Solon, Ohio (USA)

³⁵S-markiertem Methionin (≤ 1200 Ci/mmol, 10 mCi/ml)

New England BioLabs, Schwalbach

Amylose-Matrix, DNA Ladder 1 kb, DNA Ladder 100 bp, pMAL-cRI, Restriktionsendonukleasen und 10 x Puffer für Restriktionsendonukleasen, Desoxynukleosid-triphosphate, T4-DNA-Ligase und dazugehöriger 10 x Puffer

peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen

Elektroporationsküvetten

Promega, Heidelberg

GoTaq-Polymerase, Kaninchen-Retikulozytenlysate, Pfu-DNA-Polymerase, pGEM4, Pure Yield Plasmid Midi Prep System, RNasin, TNT Coupled Reticulocyte Lysate System, Wizard Genomic DNA Purification Kit, Promega Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System

Qiagen, Hilden

Monoklonaler Anti-His-Antikörper, Ni-NTA-Agarose, pQE30

Roche Applied Sciences, Mannheim

Monoklonaler Anti-HA-Antikörper, Proteinase K, Proteaseinhibitor Complete, EDTA-free

Carl Roth, Karlsruhe

Roti®-PVDF-Membran, Saccharose

Sarstedt, Bad Homburg

Reaktionsgefäße, Petrischalen, Pipettenspitzen

Schleicher & Schüll, Kassel

Whatman Filterpapiere, Sterilfilter

Seikagaku, Tokyo (Japan)

Zymolyase 20T

Serva, Heidelberg

Acrylamid, Agar-Agar, Agarose, Araldit-Kit CY-212, Bisacrylamid, Bis-Tris, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Geneticin/G418, Hefeextrakt, Lysozym, PMSF, Polyvinylpyrrolidon K15/MW 10000, Ponceau S, SDS, Serva Blau G, TEMED

Thermo Fisher Scientific, Bremen

Sulfolink Coupling Gel

6.6.2 Geräte

Autoklav

Varioclav® 400E ; H + P Labortechnik, Oberschleißheim

Brutschränke, Inkubatoren

Heraeus Christ, Osterode

CCD-Kamera für Fluoreszenzmikroskop

AxioCam MRm; Carl Zeiss, Jena

Chromatographiesystem

Liquid Chromatography Controller LCC-500, Pump P-500, Pharmacia, Erlangen

Elektroporationssystem

Gene Pulser; BioRad, München

Entwicklermaschine

Curix 60®; Agfa-Gevaert, München

Feinwaagen

Sartorius, Mainz

Fraktionensammler

Pharmacia LKB * Frac-100, Pharmacia, Erlangen

Gelkammern

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

HPLC System

Easy nLC Nanoflow HPLC System, Thermo Fisher Scientific, Bremen

Kolbenhubpipetten

Abimed, Düsseldorf

Magnetrührer

MR 3001 K; Heidorph Multipette Eppendorf, Hamburg

Massenspektrometer

LTQ Orbitrap XL Massenspektrometer, Thermo Fisher Scientific, Bremen

Peristaltische Pumpe

P-1; Amersham Biosciences, Freiburg

Photometer

BioPhotometer plus; Eppendorf, Hamburg

Quarzküvetten

Hellma

Reinstwasseranlagen

PureLab Plus; ELGA Berkefeld GmbH, Celle

Rotoren

JA-10, JA-25.50, JLA-8.1000, SW 41 Ti, TLA55-Rotor

Semydry Blotapparatur

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Spannungsquellen

Electrophoresis Power Supply EPS 600; Amersham Biosciences, Freiburg

Sterilbank

BDK, Sonnenbühl-Genkingen

Thermocycler

Mastercycler gradient; Eppendorf, Hamburg

Thermomixer

Thermomixer compact; Eppendorf, Hamburg

Tieftemperaturschneidesystem

EM FCS; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar

Transiluminator

GDS-7900 System, Modell LM-26E; UVP, Upland (USA)

Transmissionselektronenmikroskop

CM 10, Philips

EM 900, Zeiss

JOEL 1010 Transmissionselektronenmikroskop; JOEL, Tokio, Japan

Überkopfschüttler

Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München

Ultramikrotom

Ultracut E; Fa. Reichert-Jung

UCT Ultramikrotoms, Leica

Ultraschallgerät

Branson Sonifier 250; G. Heinemann, Schwäbisch Gmünd

Vortex-Mixer

Bender und Hobein, München

Wärmeschränke

Memmert, Hannover

Zentrifugen

Allegra X-22 R, Avanti J-20 XP, Avanti J-25, Beckman Coulter, Krefeld

Zentrifugen (Ultrazentrifugen)

Optima L8-M, Optima L-90K, Optima LE-80K, Optima MAX-XP, Beckman Coulter, Krefeld

Zentrifugen (Tischzentrifugen)

5415D, 5810R, Eppendorf, Hamburg

Zentrifugen (Kühlzentrifuge)

3K30, Sigma, München

Microfuge® 22R Centrifuge, Beckman Coulter, Krefeld

7 Literaturverzeichnis

- Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T., Kohda, D. (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* 100, 551-560.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W., 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., Nussberger, S. (1999). The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol* 147, 959-968.
- Alconada, A., Kubrich, M., Moczko, M., Honlinger, A., Pfanner, N. (1995). The mitochondrial receptor complex: the small subunit Mom8b/Isp6 supports association of receptors with the general insertion pore and transfer of preproteins. *Mol Cell Biol* 15, 6196-6205.
- Alkhaja, A.K., Jans, D.C., Nikolov, M., Vukotic, M., Lytovchenko, O., Ludewig, F., Schliebs, W., Riedel, D., Urlaub, H., Jakobs, S., Deckers, M. (2011). MINOS1 is a conserved component of Mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Mol Biol Cell*.
- Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D.P., Lisowsky, T., Tokatlidis, K. (2005). Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome c. *J Mol Biol* 353, 937-944.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457-465.
- Andersson, S.G., Zomorodipour, A., Andersson, J.O., Sicheritz-Ponten, T., Alsmark, U.C., Podowski, R.M., Naslund, A.K., Eriksson, A.S., Winkler, H.H., Kurland, C.G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* 396, 133-140.
- Bernardi, P., Azzone, G.F. (1981). Cytochrome c as an electron shuttle between the outer and inner mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 256, 7187-7192.
- Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W., Brunner, M. (1995). The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell* 81, 1085-1093.
- Beutner, G., Ruck, A., Riede, B., Welte, W., Brdiczka, D. (1996). Complexes between kinases, mitochondrial porin and adenylate translocator in rat brain resemble the permeability transition pore. *FEBS Lett* 396, 189-195.
- Bihlmaier, K., Mesecke, N., Terziyska, N., Bien, M., Hell, K., Herrmann, J.M. (2007). The disulfide relay system of mitochondria is connected to the respiratory chain. *J Cell Biol* 179, 389-395.

- Bleazard, W., McCaffery, J.M., King, E.J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J., Shaw, J.M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* 1, 298-304.
- Boeke, J.D., LaCroute, F., Fink, G.R. (1984). A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol Gen Genet* 197, 345-346.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54.
- Brdiczka, D., Dolken, G., Krebs, W., Hofmann, D. (1974). The inner boundary membrane of mitochondria. Localization and biochemical characterization, possible functions in biogenesis and metabolism. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 355, 731-743.
- Brdiczka, D., Schumacher, D. (1976). Iodination of peripheral mitochondrial membrane proteins in correlation to the functional state of the ADP/ATP carrier. *Biochem Biophys Res Commun* 73, 823-832.
- Brix, J., Rudiger, S., Bukau, B., Schneider-Mergener, J., 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.
- Burger, G., Gray, M.W., Lang, B.F. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* 19, 709-716.
- Chance, B., Williams, G.R. (1955). Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. *J Biol Chem* 217, 409-427.
- Chen, H., McCaffery, J.M., Chan, D.C. (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130, 548-562.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141, 280-289.
- Claypool, S.M., Oktay, Y., Boonthueung, P., Loo, J.A., Koehler, C.M. (2008). Cardiolipin defines the interactome of the major ADP/ATP carrier protein of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* 182, 937-950.
- Cox, J., Mann, M. (2008). MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. *Nat Biotechnol* 26, 1367-1372.
- Daems, W.T., Wisse, E. (1966). Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res* 16, 123-140.
- Darshi, M., Mendiola, V.L., Mackey, M.R., Murphy, A.N., Koller, A., Perkins, G.A., Ellisman, M.H., Taylor, S.S. (2011). ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function. *J Biol Chem* 286, 2918-2932.
- Daum, G., Gasser, S.M., Schatz, G. (1982). Import of proteins into mitochondria. Energy-dependent, two-step processing of the intermembrane space enzyme cytochrome b2 by isolated yeast mitochondria. *J Biol Chem* 257, 13075-13080.

- Dekker, P.J., Martin, F., Maarse, A.C., Bomer, U., Muller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J., Pfanner, N. (1997). The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44. *EMBO J* 16, 5408-5419.
- Dembowski, M., Kunkele, K.P., Nargang, F.E., Neupert, W., Rapaport, D. (2001). Assembly of Tom6 and Tom7 into the TOM core complex of *Neurospora crassa*. *J Biol Chem* 276, 17679-17685.
- Detmer, S.A., Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 870-879.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W., Brunner, M. (2000). Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* 101, 401-412.
- Dower, W.J., Miller, J.F., Ragsdale, C.W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res* 16, 6127-6145.
- Egner, A., Jakobs, S., Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *P Natl Acad Sci USA* 99, 3370-3375.
- Endo, T., Yamamoto, H., Esaki, M. (2003). Functional cooperation and separation of translocators in protein import into mitochondria, the double-membrane bounded organelles. *J Cell Sci* 116, 3259-3267.
- Fawcett, D.W. (1981). Mitochondria. In Saunders WB (ed): "The Cell." Philadelphia.
- Forner, F., Foster, L.J., Campanaro, S., Valle, G., Mann, M. (2006). Quantitative proteomic comparison of rat mitochondria from muscle, heart, and liver. *Mol Cell Proteomics* 5, 608-619.
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B. (1998). The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440, 325-331.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* 152, 683-692.
- Fukushima, N.H., Brisch, E., Keegan, B.R., Bleazard, W., Shaw, J.M. (2001). The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 12, 2756-2766.
- Gaume, B., Klaus, C., Ungermann, C., Guiard, B., Neupert, W., Brunner, M. (1998). Unfolding of preproteins upon import into mitochondria. *EMBO J* 17, 6497-6507.
- Gebert, N., Chacinska, A., Wagner, K., Guiard, B., Koehler, C.M., Rehling, P., Pfanner, N., Wiedemann, N. (2008). Assembly of the three small Tim proteins precedes docking to the mitochondrial carrier translocase. *EMBO Rep* 9, 548-554.
- Gevorkyan-Airapetov, L., Zohary, K., Popov-Celeketic, D., Mapa, K., Hell, K., Neupert, W., Azem, A., Mokranjac, D. (2009). Interaction of Tim23 with Tim50 Is essential for protein translocation by the mitochondrial TIM23 complex. *J Biol Chem* 284, 4865-4872.
- Goldstein, J.C., Munoz-Pinedo, C., Ricci, J.E., Adams, S.R., Kelekar, A., Schuler, M., Tsien, R.Y., Green, D.R. (2005). Cytochrome c is released in a single step during apoptosis. *Cell Death Differ* 12, 453-462.

- Goldstein, J.C., Waterhouse, N.J., Juin, P., Evan, G.I., Green, D.R. (2000). The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol* 2, 156-162.
- Gray, M.W. (1992). The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol* 141, 233-357.
- Griffin, E.E., Graumann, J., Chan, D.C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* 170, 237-248.
- Griffith, J., Mari, M., De Maziere, A., Reggiori, F. (2008). A cryosectioning procedure for the ultrastructural analysis and the immunogold labelling of yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Traffic* 9, 1060-1072.
- Grumbt, B., Stroobant, V., Terziyska, N., Israel, L., Hell, K. (2007). Functional characterization of Mia40p, the central component of the disulfide relay system of the mitochondrial intermembrane space. *J Biol Chem* 282, 37461-37470.
- Hackenbrock, C.R. (1966). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol* 30, 269-297.
- Hackenbrock, C.R. (1968a). Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A* 61, 598-605.
- Hackenbrock, C.R. (1968b). Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. II. Electron transport-linked ultrastructural transformations in mitochondria. *J Cell Biol* 37, 345-369.
- Hackenbrock, C.R., Miller, K.J. (1975). The distribution of anionic sites on the surfaces of mitochondrial membranes. Visual probing with polycationic ferritin. *J Cell Biol* 65, 615-630.
- Head, B.P., Zulaika, M., Ryazantsev, S., van der Blik, A.M. (2011). A novel mitochondrial outer membrane protein, MOMA-1, that affects cristae morphology in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell* 22, 831-841.
- Herlan, M., Bornhovd, C., Hell, K., Neupert, W., Reichert, A.S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol* 165, 167-173.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, C., Neupert, W., Reichert, A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *Journal of Biological Chemistry* 278, 27781-27788.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., Shaw, J.M. (1998a). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *Journal of Cell Biology* 143, 359-373.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., Shaw, J.M. (1998b). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143, 359-373.
- Hess, D.C., Myers, C.L., Huttenhower, C., Hibbs, M.A., Hayes, A.P., Paw, J., Clore, J.J., Mendoza, R.M., Luis, B.S., Nislow, C., Giaever, G., Costanzo, M., Troyanskaya, O.G., Caudy, A.A. (2009). Computationally driven, quantitative experiments discover genes required for mitochondrial biogenesis. *PLoS Genet* 5, e1000407.

- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R., Pfanner, N. (1998). Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins [see comment]. *Nature* 395, 516-521.
- Hoppins, S., Nunnari, J. (2009). The molecular mechanism of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta* 1793, 20-26.
- Hoppins, S.C., Nargang, F.E. (2004). The Tim8-Tim13 complex of *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 279, 12396-12405.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170, 1021-1027.
- Ishihara, N., Eura, Y., Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117, 6535-6546.
- John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M., Rangell, L., Bennett, M.J., Zha, J. (2005). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell* 16, 1543-1554.
- Jones, B.A., Fangman, W.L. (1992). Mitochondrial-DNA Maintenance in Yeast Requires a Protein Containing a Region Related to the Gtp-Binding Domain of Dynamin. *Gene Dev* 6, 380-389.
- Kaldi, K., Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W., Brunner, M. (1998). Biogenesis of Tim23 and Tim17, integral components of the TIM machinery for matrix-targeted preproteins. *EMBO J* 17, 1569-1576.
- Kanamori, T., Nishikawa, S., Nakai, M., Shin, I., Schultz, P.G., Endo, T. (1999). Uncoupling of transfer of the presequence and unfolding of the mature domain in precursor translocation across the mitochondrial outer membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3634-3639.
- Kane, L.A., Youle, R.J. (2010). Mitochondrial fission and fusion and their roles in the heart. *J Mol Med (Berl)* 88, 971-979.
- Kemper, C., Habib, S.J., Engl, G., Heckmeyer, P., Dimmer, K.S., Rapaport, D. (2008). Integration of tail-anchored proteins into the mitochondrial outer membrane does not require any known import components. *J Cell Sci* 121, 1990-1998.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S., 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., 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.
- Kjeldgaard, M., Nyborg, J., Clark, B.F. (1996). The GTP binding motif: variations on a theme. *Faseb J* 10, 1347-1368.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K., Schiebel, E. (1999). Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast* 15, 963-972.
- Koehler, C.M. (2004). New developments in mitochondrial assembly. *Annu Rev Cell Dev Biol* 20, 309-335.

- Koehler, C.M., Jarosch, E., Tokatlidis, K., Schmid, K., Schweyen, R.J., 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, W., Schmid, K., Jarosch, E., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., 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., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G., Or, E. (2000). Tim18p, 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.
- Kornmann, B., Currie, E., Collins, S.R., Schuldiner, M., Nunnari, J., Weissman, J.S., Walter, P. (2009). An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325, 477-481.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.
- Kubrich, M., Keil, P., Rassow, J., Dekker, P.J., Blom, J., Meijer, M., Pfanner, N. (1994). The polytopic mitochondrial inner membrane proteins MIM17 and MIM23 operate at the same preprotein import site. *FEBS Lett* 349, 222-228.
- Kunkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S., Neupert, W. (1998). The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* 93, 1009-1019.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lionaki, E., de Marcos Lousa, C., Baud, C., Vougioukalaki, M., Panayotou, G., Tokatlidis, K. (2008). The essential function of Tim12 in vivo is ensured by the assembly interactions of its C-terminal domain. *J Biol Chem* 283, 15747-15753.
- Lithgow, T., Timms, M., Hoj, P.B., Hoogenraad, N.J. (1991). Identification of a GTP-binding protein in the contact sites between inner and outer mitochondrial membranes. *Biochem Biophys Res Commun* 180, 1453-1459.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., Pringle, J.R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 953-961.
- Mannella, C.A., Marko, M., Penczek, P., Barnard, D., Frank, J. (1994). The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech* 27, 278-283.
- Mannella, C.A., Pfeiffer, D.R., Bradshaw, P.C., Moraru, II, Slepchenko, B., Loew, L.M., Hsieh, C.E., Buttle, K., Marko, M. (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *IUBMB Life* 52, 93-100.
- Margulis, L. (1971). Symbiosis and evolution. *Sci Am* 225, 48-57.
- Martinez-Caballero, S., Grigoriev, S.M., Herrmann, J.M., Campo, M.L., Kinnally, K.W. (2007). Tim17p regulates the twin pore structure and voltage gating of the mitochondrial protein import complex TIM23. *J Biol Chem* 282, 3584-3593.
- Mayer, A., Lill, R., Neupert, W. (1993). Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. *J Cell Biol* 121, 1233-1243.

- Mayer, A., Nargang, F.E., Neupert, W., Lill, R. (1995). MOM22 is a receptor for mitochondrial targeting sequences and cooperates with MOM19. *EMBO J* 14, 4204-4211.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M., Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.
- Meeusen, S., Nunnari, J. (2003). Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol* 163, 503-510.
- Meier, S., Neupert, W., Herrmann, J.M. (2005). Conserved N-terminal negative charges in the Tim17 subunit of the TIM23 translocase play a critical role in the import of preproteins into mitochondria. *J Biol Chem* 280, 7777-7785.
- Meinecke, M., Wagner, R., Kovermann, P., Guiard, B., Mick, D.U., Hutu, D.P., Voos, W., Truscott, K.N., Chacinska, A., Pfanner, N., Rehling, P. (2006). Tim50 maintains the permeability barrier of the mitochondrial inner membrane. *Science* 312, 1523-1526.
- Meinecke, B., Engl, G., Kemper, C., Vasiljev-Neumeyer, A., Paulitschke, H., Rapaport, D. (2008). The outer membrane form of the mitochondrial protein Mcr1 follows a TOM-independent membrane insertion pathway. *FEBS Lett* 582, 855-860.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., Herrmann, J.M. (2005). A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell* 121, 1059-1069.
- Milenkovic, D., Gabriel, K., Guiard, B., Schulze-Specking, A., Pfanner, N., Chacinska, A. (2007). Biogenesis of the essential Tim9-Tim10 chaperone complex of mitochondria: site-specific recognition of cysteine residues by the intermembrane space receptor Mia40. *J Biol Chem* 282, 22472-22480.
- Miller, J.F., Dower, W.J., Tompkins, L.S. (1988). High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 856-860.
- Mokranjac, D., Berg, A., Adam, A., Neupert, W., Hell, K. (2007). Association of the Tim14.Tim16 subcomplex with the TIM23 translocase is crucial for function of the mitochondrial protein import motor. *J Biol Chem* 282, 18037-18045.
- Mokranjac, D., Neupert, W. (2009). Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. *Biochim Biophys Acta* 1793, 33-41.
- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W., Hell, K. (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J* 22, 816-825.
- Mokranjac, D., Popov-Celeketic, D., Hell, K., Neupert, W. (2005). Role of Tim21 in mitochondrial translocation contact sites. *J Biol Chem* 280, 23437-23440.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *Journal of Cell Biology* 151, 367-379.
- Muller, J.M., Milenkovic, D., Guiard, B., Pfanner, N., Chacinska, A. (2008). Precursor oxidation by Mia40 and Erv1 promotes vectorial transport of proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Mol Biol Cell* 19, 226-236.

- Nass, M.M., Nass, S. (1963). Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol* 19, 593-611.
- Neupert, W., Herrmann, J.M. (2007). Translocation of proteins into mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 723-749.
- Nicastro, D., Frangakis, A.S., Typke, D., Baumeister, W. (2000). Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria. *J Struct Biol* 129, 48-56.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Molecular Biology of the Cell* 8, 1233-1242.
- Ohlendieck, K., Riesinger, I., Adams, V., Krause, J., Brdiczka, D. (1986). Enrichment and biochemical characterization of boundary membrane contact sites from rat-liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 860, 672-689.
- Olsen, J.V., Ong, S.E., Mann, M. (2004). Trypsin cleaves exclusively C-terminal to arginine and lysine residues. *Mol Cell Proteomics* 3, 608-614.
- Ong, S.E., Blagoev, B., Kratchmarova, I., Kristensen, D.B., Steen, H., Pandey, A., Mann, M. (2002). Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* 1, 376-386.
- Oomen, C.J., van Ulsen, P., van Gelder, P., Feijen, M., Tommassen, J., Gros, P. (2004). Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *EMBO J* 23, 1257-1266.
- Otsuga, D., Keegan, B.R., Brisch, E., Thatcher, J.W., Hermann, G.J., Bleazard, W., Shaw, J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 143, 333-349.
- Palade, G.E. (1952). The fine structure of mitochondria. *Anat Rec* 114, 427-451.
- Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* 1, 188-211.
- Papic, D., Krumpe, K., Dukanovic, J., Dimmer, K.S., Rapaport, D. (2011). Multispan mitochondrial outer membrane protein Ugo1 follows a unique Mim1-dependent import pathway. *J Cell Biol* 194, 397-405.
- Parone, P.A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F., Martinou, J.C. (2008). Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* 3, e3257.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D., Neupert, W. (2003). Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* 426, 862-866.
- Perkins, D.N., Pappin, D.J., Creasy, D.M., Cottrell, J.S. (1999). Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20, 3551-3567.
- Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M., Frey, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* 119, 260-272.
- Pfanner, N., Hoeben, P., Tropschug, M., Neupert, W. (1987). The carboxyl-terminal two-thirds of the ADP/ATP carrier polypeptide contains sufficient information to direct translocation into mitochondria. *J Biol Chem* 262, 14851-14854.

- Pfanner, N., Neupert, W. (1987). Distinct steps in the import of ADP/ATP carrier into mitochondria. *J Biol Chem* 262, 7528-7536.
- Pon, L., Moll, T., Vestweber, D., Marshallsay, B., Schatz, G. (1989). Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J Cell Biol* 109, 2603-2616.
- Popov-Celeketic, D., Mapa, K., Neupert, W., Mokranjac, D. (2008a). Active remodelling of the TIM23 complex during translocation of preproteins into mitochondria. *EMBO J* 27, 1469-1480.
- Popov-Celeketic, J., Waizenegger, T., Rapaport, D. (2008b). Mim1 functions in an oligomeric form to facilitate the integration of Tom20 into the mitochondrial outer membrane. *J Mol Biol* 376, 671-680.
- Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Korner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W., Cyrklaff, M., Neupert, W., Reichert, A.S. (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g. *J Cell Biol* 185, 1047-1063.
- Rapaport, D. (2005). How does the TOM complex mediate insertion of precursor proteins into the mitochondrial outer membrane? *J Cell Biol* 171, 419-423.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., Westermann, B. (1998a). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 20150-20155.
- Rapaport, D., Kunkele, K.P., Dembowski, M., Ahting, U., Nargang, F.E., Neupert, W., Lill, R. (1998b). Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol Cell Biol* 18, 5256-5262.
- Rehling, P., Brandner, K., Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 519-530.
- Rojo, E.E., Guiard, B., Neupert, W., 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, M., Hovius, R., Demel, R.A., Nicolay, K., Wallimann, T. (1991). Mitochondrial creatine kinase mediates contact formation between mitochondrial membranes. *J Biol Chem* 266, 20290-20295.
- Rothstein, R.J., Sherman, F. (1980). Genes affecting the expression of cytochrome c in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics* 94, 871-889.
- Saitoh, T., Igura, M., Obita, T., Ose, T., Kojima, R., Maenaka, K., Endo, T., Kohda, D. (2007). Tom20 recognizes mitochondrial presequences through dynamic equilibrium among multiple bound states. *EMBO J* 26, 4777-4787.
- Scheffler, I.E. (2001). Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* 49, 3-26.
- Schleiff, E., Silviu, J.R., Shore, G.C. (1999). Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J Cell Biol* 145, 973-978.
- Schleyer, M., Neupert, W. (1985). Transport of proteins into mitochondria: translocational intermediates spanning contact sites between outer and inner membranes. *Cell* 43, 339-350.

- Schlossmann, J., Dietmeier, K., Pfanner, N., Neupert, W. (1994). Specific recognition of mitochondrial preproteins by the cytosolic domain of the import receptor MOM72. *J Biol Chem* 269, 11893-11901.
- Schmidt, O., Harbauer, A.B., Rao, S., Eyrich, B., Zahedi, R.P., Stojanovski, D., Schonfisch, B., Guiard, B., Sickmann, A., Pfanner, N., Meisinger, C. (2011). Regulation of mitochondrial protein import by cytosolic kinases. *Cell* 144, 227-239.
- Schmitt, S., Ahting, U., Eichacker, L., Granvogl, B., Go, N.E., Nargang, F.E., Neupert, W., Nussberger, S. (2005). Role of Tom5 in maintaining the structural stability of the TOM complex of mitochondria. *J Biol Chem* 280, 14499-14506.
- Schulke, N., Sepuri, N.B., Pain, D. (1997). In vivo zippering of inner and outer mitochondrial membranes by a stable translocation intermediate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 7314-7319.
- Schwaiger, M., Herzog, V., Neupert, W. (1987). Characterization of translocation contact sites involved in the import of mitochondrial proteins. *J Cell Biol* 105, 235-246.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.
- Sesaki, H., Jensen, R.E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 152, 1123-1134.
- Sesaki, H., Jensen, R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* 279, 28298-28303.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P., Jensen, R.E. (2003). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 14, 2342-2356.
- Sherman, E.L., Go, N.E., Nargang, F.E. (2005). Functions of the small proteins in the TOM complex of *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* 16, 4172-4182.
- Sherman, F. (2002). Getting started with yeast. *Methods Enzymol* 350, 3-41.
- Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y. (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol* 59, 223-239.
- Sideris, D.P., Tokatlidis, K. (2007). Oxidative folding of small Tims is mediated by site-specific docking onto Mia40 in the mitochondrial intermembrane space. *Mol Microbiol* 65, 1360-1373.
- Sikorski, R.S., Hieter, P. (1989). A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122, 19-27.
- Sirrenberg, C., Bauer, M.F., Guiard, B., Neupert, W., Brunner, M. (1996). Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* 384, 582-585.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Becker, K., Bauer, M.F., Walther, E., Neupert, W., Brunner, M. (1997). Functional cooperation and stoichiometry of protein translocases of the outer and inner membranes of mitochondria. *J Biol Chem* 272, 29963-29966.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W., Brunner, M. (1998). Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* 391, 912-915.

- Sjostrand, F.S. (1953). Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* *171*, 30-32.
- Slot, J.W., Geuze, H.J. (1985). A new method of preparing gold probes for multiple-labeling cytochemistry. *Eur J Cell Biol* *38*, 87-93.
- Speer, O., Back, N., Buerklen, T., Brdiczka, D., Koretsky, A., Wallimann, T., Eriksson, O. (2005). Octameric mitochondrial creatine kinase induces and stabilizes contact sites between the inner and outer membrane. *Biochem J* *385*, 445-450.
- Stan, T., Ahting, U., Dembowski, M., Kunkele, K.P., Nussberger, S., Neupert, W., Rapaport, D. (2000). Recognition of preproteins by the isolated TOM complex of mitochondria. *EMBO J* *19*, 4895-4902.
- Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., Lill, R. (1995). Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem* *270*, 22842-22849.
- Tamura, Y., Harada, Y., Shiota, T., Yamano, K., Watanabe, K., Yokota, M., Yamamoto, H., Sesaki, H., Endo, T. (2009). Tim23-Tim50 pair coordinates functions of translocators and motor proteins in mitochondrial protein import. *J Cell Biol* *184*, 129-141.
- Tatsuta, T., Langer, T. (2008). Quality control of mitochondria: protection against neurodegeneration and ageing. *EMBO J* *27*, 306-314.
- Thakur, S.S., Geiger, T., Chatterjee, B., Bandilla, P., Frohlich, F., Cox, J., Mann, M. (2011). Deep and highly sensitive proteome coverage by LC-MS/MS without prefractionation. *Mol Cell Proteomics* *10*, M110 003699.
- Tokuyasu, K.T. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* *57*, 551-565.
- Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* *76*, 4350-4354.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N., Wagner, R. (2001). A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat Struct Biol* *8*, 1074-1082.
- Tsien, R.Y. (1998). The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* *67*, 509-544.
- van der Klei, I.J., Veenhuis, M., Neupert, W. (1994). A morphological view on mitochondrial protein targeting. *Microsc Res Tech* *27*, 284-293.
- van Loon, A.P., Brandli, A.W., Schatz, G. (1986). The presequences of two imported mitochondrial proteins contain information for intracellular and intramitochondrial sorting. *Cell* *44*, 801-812.
- 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., Honlinger, A., Pfanner, N. (1999). Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* *401*, 485-489.
- Vogel, F., Bornhvd, C., Neupert, W., Reichert, A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol* *175*, 237-247.
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., Philippsen, P. (1997). Heterologous HIS3 marker and GFP reporter modules for PCR-targeting in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* *13*, 1065-1075.

- Werner, S., Neupert, W. (1972). Functional and biogenetical heterogeneity of the inner membrane of rat-liver mitochondria. *Eur J Biochem* 25, 379-396.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Prinz, T., Ryan, M.T., Meisinger, C., Pfanner, N., Truscott, K.N. (2003). Biogenesis of yeast mitochondrial cytochrome c: a unique relationship to the TOM machinery. *J Mol Biol* 327, 465-474.
- Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C., Pfanner, N. (2004). Biogenesis of the protein import channel Tom40 of the mitochondrial outer membrane: intermembrane space components are involved in an early stage of the assembly pathway. *J Biol Chem* 279, 18188-18194.
- Wittig, I., Braun, H.P., Schagger, H. (2006). Blue native PAGE. *Nat Protoc* 1, 418-428.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinski, T.J., Cassidy-Stone, A., Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160, 303-311.
- Wurm, C.A., Jakobs, S. (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* 580, 5628-5634.
- Xie, J., Marusich, M.F., Souda, P., Whitelegge, J., Capaldi, R.A. (2007). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin exists as a complex with SAM50, metaxins 1 and 2, coiled-coil-helix coiled-coil-helix domain-containing protein 3 and 6 and DnaJC11. *FEBS Lett* 581, 3545-3549.
- Yamano, K., Yatsukawa, Y., Esaki, M., Hobbs, A.E., Jensen, R.E., Endo, T. (2008). Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import. *J Biol Chem* 283, 3799-3807.
- Zeth, K. (2010). Structure and evolution of mitochondrial outer membrane proteins of beta-barrel topology. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1292-1299.

Im Rahmen dieser Arbeit entstandene Publikationen:

- Harner, M., Korner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F., Neupert, W. (2011a). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J* 30, 4356-4370.
- Harner, M., Neupert, W., Deponte, M. (2011b). Lateral release of proteins from the TOM complex into the outer membrane of mitochondria. *EMBO J* 30, 3232-3241.

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|-------------------|--|
| Å | Ångström |
| α | Antikörper |
| AAC | ADP/ATP-Carrier |
| Abb. | Abbildung |
| Aco | Aconitase |
| ADP | Adenosin-5'-diphosphat |
| AIM | Altered Inheritance rate of Mitochondria |
| AMP | Ampicilin |
| ANT | Adeninnukleotid-Transporter |
| APS | Ammoniumperoxodisulfat |
| ATP | Adenosin-5'-triphosphat |
| AS | Aminosäure |
| BN | Blau Nativ |
| BSA | Rinderserumalbumin |
| bzw. | beziehungsweise |
| ca. | circa |
| CCHL | Cytochrom <i>c</i> Hämlyase |
| <i>C.e.</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| <i>C. elegans</i> | <i>Caenorhabditis elegans</i> |
| CM | Cristamembran |
| Ci | Curie |
| CJ | Crista Junction |
| CS | contact site/Kontaktstelle |
| C-terminal | Carboxyterminal |
| CW | cell wall/Zellwand |
| °C | Grad Celsius |
| D | Dextrose/Glucose |
| DHFR | Dihydrofolatreduktase |
| Dld1 | D-Lactatdehydrogenase |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure |
| DTT | Dithiothreitol |

| | |
|----------------|---|
| D.w. | <i>Drosophila willisonii</i> |
| <i>E. coli</i> | <i>Escherichia coli</i> |
| EDTA | Ethylendiamintetraacetat |
| EM | Elektronenmikroskop |
| ER | Endoplasmatisches Retikulum |
| Fcj1 | formation of crista junction |
| Fis1 | mitochondrial fission |
| Fzo | Fuzzy Onions homolog |
| g | 9,81 m/s ² |
| GBP | GTP-bindendes Protein |
| GFP | grün fluoreszierendes Protein |
| GTP | Guanin-5'-triphosphat |
| HA | Hämagglutinin |
| h | Stunde |
| HCl | Salzsäure |
| HeLa-Zellen | Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks |
| <i>H.s.</i> | <i>Homo sapiens</i> |
| IBM | inner boundary membrane/Innere Grenzmembran |
| ICS | intra cristal space/Intracristalbereich |
| Idh | Isocitrat Dehydrogenase |
| IgG | ImmunglobulinG |
| IM | Innenmembran |
| IMS | inter membrane space/Intermembranraum |
| kb | Kilobasen |
| kD | Kilodalton |
| l | Liter |
| LB | Luria Bertani |
| l-Mgm1 | lange Isoform von Mgm1 |
| LMU | Ludwig-Maximilians-Universität |
| M | molar |
| mM | millimolar |
| Mcs | <u>m</u> itochondrial- <u>c</u> ontact- <u>s</u> ite-Protein; Protein des MICOS-Komplexes |
| MDa | Megadalton |

| | |
|--------------------|--|
| Mgm1 | mitochondrial genome maintenance protein 1 |
| MICOS | Mitochondrial-Contact-Site-Komplex |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| µm | Mikrometer |
| µM | Mikromolar |
| min | Minute |
| <i>M.m.</i> | <i>Mus musculus</i> |
| <i>M. musculus</i> | <i>Mus musculus</i> |
| MOPS | 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure |
| mtDNA | mitochondriale DNA |
| N | Nukleus |
| NADH | Nicotinamidadenindinukleotid, reduziert |
| <i>N.c.</i> | <i>Neurospora crassa</i> |
| nm | Nanometer |
| <i>N. crassa</i> | <i>Neurospora crassa</i> |
| N-terminal | aminoterminal |
| OD | Optische Dichte |
| OM | outer membrane/Außenmembran |
| PAGE | Polyacrylamidgelelektrophorese |
| PCR | Polymerase-Kettenreaktion |
| PEG | Polyethylenglykol |
| Phb | Prohibitin |
| PK | Proteinase K |
| PM | Plasmamembran |
| PMSF | Phenylmethylsulfonylfluorid |
| Por | Porin |
| RNA | Ribonukleinsäure |
| RNase | Ribonuklease |
| RNasin | Ribonukleaseinhibitor |
| ROS | reactive oxygen species |
| RT | Raumtemperatur |
| SDS | Natriumdodecylsulfat |
| sek | Sekunde |

| | |
|----------------------|--|
| <i>S.c.</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| <i>S. cerevisiae</i> | <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| SD | selektives Glukose-Medium |
| sec | Sekunde |
| SILAC | Stable Isotope Labeling with Amino acids in Cell culture |
| SLac | selektives Laktat-Medium |
| s-Mgm1 | short Isoform of Mgm1 |
| SOL | soluble/löslich |
| Su9 | subunit/Untereinheit9 der ATP-Synthase aus <i>N.crassa</i> |
| TBS | Tris gepufferte Saline |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TEMED | N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin |
| TCA | Trichloressigsäure |
| TIM | translocase of the inner membrane |
| TMS | Transmembransegment |
| TOB | topogenesis of mitochondrial outer membrane beta-barrel proteins |
| TOM | translocase of the outer membrane |
| TPI | Triosephosphat Isomerase |
| Tris | 2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propandiol |
| TX-100 | TritonX-100 |
| U | Unit |
| UV | Ultraviolett |
| V | Vakuole |
| VDAC | voltage-dependent anion channel |
| v/v | Volumen pro Volumen |
| vgl. | vergleiche |
| w/v | Gewicht pro Volumen |
| WT | Wildtyp |
| z.B. | zum Beispiel |