

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

**Biogenese von mitochondrialen  
 $\beta$ -Barrel-Membranproteinen -  
Identifizierung des TOB-Komplexes**

Stefan A. Paschen

aus  
Mannheim

2004

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von §13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert und Herrn Prof. Dr. Rudolph Grosschedl betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, den 14.05.2004

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Stefan Pasch'. The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.

Dissertation eingereicht am 14.05.2004

Tag der mündlichen Prüfung: 18.06.2004

1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. Walter Neupert
2. Gutachter: Prof. Dr. Patrick Cramer

***Per aspera ad astra***

# INHALT

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1. Struktur und Biogenese von Mitochondrien .....	1
1.2. Proteinimport in Mitochondrien .....	3
1.2.1. Die Translokase der Außenmembran .....	4
1.2.2. Biogenese von Außenmembranproteinen .....	6
1.2.3. Assemblierung des TOM-Komplexes .....	7
1.2.4. Die TIM23-Translokase .....	8
1.2.5. Die TIM22-Translokase .....	9
1.3. Mitochondriale Evolution .....	10
1.4. Proteintranslokation in Bakterien .....	11
1.4.1. Die Sec-Translokase .....	12
1.4.2. Der Tat-Transporter .....	13
1.4.3. Die Alb3/Oxa1/YidC-Familie .....	14
1.4.4. Biogenese von bakteriellen Außenmembranproteinen .....	14
1.5. Zielsetzung .....	15
<b>2. ERGEBNISSE</b> .....	<b>16</b>
2.1. Identifizierung von neuen Außenmembranproteinen .....	16
2.2. YNL026w kodiert für das Hefe-Homolog von <i>N.c.</i> Tob55 .....	18
2.3. Tob55 ist in allen eukaryotischen Genomen konserviert .....	20
2.4. Antikörper gegen Tob55 .....	22
2.5. Tob55 ist in Mitochondrien lokalisiert .....	23
2.6. Tob55 ist ein integrales Außenmembranprotein .....	23
2.7. Import von Tob55 in isolierte Mitochondrien .....	26
2.8. Tob55 ist essenziell für <i>S. cerevisiae</i> .....	27
2.9. Depletion von Tob55 führt zu aggregierten Mitochondrien .....	29
2.10. Tob55-depletierte Mitochondrien enthalten keine $\beta$ -Barrel-Proteine .....	31
2.11. Der Import von $\beta$ -Barrel-Membranproteinen ist abhängig von Tob55 .....	32
2.12. Tob55 ist Bestandteil des oligomeren TOB-Komplexes .....	35
2.13. Tob55 ist ein $\beta$ -Barrel-Protein .....	37
2.14. Tob55 ist ein kanalbildendes Protein .....	38
2.15. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Tob55 .....	41
2.16. Der Import von Porin ist Tob55-abhängig .....	44
2.17. Tob55 ist für die Biogenese von Tom40 essenziell .....	45

2.18. Mdm10, ein unerkanntes $\beta$ -Barrel-Protein .....	47
2.19. Import und Topologie von Mdm10 .....	48
2.20. Tob55 interagiert mit Vorstufen von $\beta$ -Barrel-Proteinen .....	50
2.21. Tob55 ist Bestandteil von $\beta$ -Barrel-Importintermediaten.....	52
2.22. Der TOB-Komplex übernimmt $\beta$ -Barrel-Vorstufen vom TOM-Komplex .....	54
2.23. Mas37 ist Bestandteil des TOB-Komplexes.....	57
2.24. Tob55 besitzt prokaryotische Homologe.....	58
<b>3. DISKUSSION .....</b>	<b>62</b>
3.1. Identifizierung von Tob55.....	62
3.2. Prokaryotische Homologe von Tob55.....	63
3.3. Funktionelle Charakterisierung des TOB-Komplexes .....	67
3.4. Modell der Funktion von Tob55 .....	71
3.5. Die Rolle der 70 kDa TIM-Komplexe .....	72
3.6. Mas37 als Untereinheit des TOB-Komplexes .....	72
3.7. Ein evolutionär konservierter Biogeneseweg.....	74
3.8. Elektrophysiologische Charakterisierung von Tob55.....	76
3.9. Elektronenmikroskopische Analyse des TOB-Komplexes .....	77
3.10. Ist der TOB-Komplex eine unspezifische Pore? .....	78
3.11. Wie inserieren $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine in die Außenmembran? .....	78
3.12. Bakterielle Proteintoxine .....	79
3.13. Besitzt der TOB-Komplex eine Anfinnen-Käfig-ähnliche Funktion?.....	80
3.14. TOB-Komplex und Apoptose .....	81
<b>4. ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>82</b>
<b>5. MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>84</b>
5.1. Molekularbiologische Methoden .....	84
5.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA .....	84
5.1.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR .....	85
5.1.3. Gelelektrophorese von DNA.....	85
5.1.4. Restriktionsverdau von DNA .....	86
5.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten.....	86
5.1.6. Transformation von <i>E. coli</i> .....	87
5.1.7. Klonierung von pGEM4-Tob55.....	87
5.1.8. Klonierung von pGEM4-Mdm10 .....	88
5.1.9. Klonierung von pQE60-Tob55.....	89

5.2. Methoden der Hefegenetik.....	90
5.2.1. Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	90
5.2.2. Transformation von <i>S. cerevisiae</i> .....	91
5.2.3. Isolierung von chromosomaler DNA aus <i>S. cerevisiae</i> .....	91
5.2.4. Tob55(Gal10)-Hefestamm.....	92
5.2.5. Mas37-Deletionsstamm.....	93
5.3. Proteinchemische Methoden .....	94
5.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	94
5.3.2. Coomassie-Färbung von Gelen .....	94
5.3.3. Blaue Nativgelelektrophorese .....	95
5.3.4. Transfer von Proteinen auf Membranen.....	95
5.3.5. <i>In vitro</i> Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine.....	96
5.3.6. Autoradiographie .....	96
5.3.7. Gelfiltration .....	97
5.3.8. TCA-Fällung von Proteinen .....	97
5.3.9. Reinigung von rekombinantem Tob55 .....	97
5.3.10. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen .....	98
5.3.11. Rückfaltung von rekombinantem Tob55.....	99
5.3.12. Bestimmung der Proteinkonzentration .....	99
5.3.13. Circular-Dichroismus .....	99
5.3.14. Elektrophysiologische Methoden.....	100
5.4. Zellbiologische Methoden .....	101
5.4.1. Proteinextraktion aus Hefe.....	101
5.4.2. Subfraktionierung von Hefezellen .....	101
5.4.3. Isolierung von Mitochondrien aus <i>S. cerevisiae</i> .....	102
5.4.4. <i>In vitro</i> Proteinimport in Mitochondrien.....	103
5.4.5. Alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen.....	103
5.4.6. Ni-NTA-Affinitätsfällung von Tob55 .....	104
5.4.7. Antikörper-Depletion und Antikörper-Shift.....	105
5.4.8. Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen.....	105
5.4.9. Elektronenmikroskopische Methoden .....	106
5.5. Immunologische Methoden.....	107
5.5.1. Gewinnung polyklonaler Antikörper.....	107
5.5.2. Affinitätsreinigung von Antikörpern.....	108
5.5.3. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen .....	109
5.6. Chemikalien und Verbrauchsmaterial .....	110
5.7. Geräte.....	111
5.8. Abkürzungen.....	112
<b>6. LITERATUR .....</b>	<b>114</b>

# 1. EINLEITUNG

Der evolutionäre Erfolg eukaryotischer Organismen beruht unter anderem auf der Kompartimentierung von Stoffwechselprozessen auf verschiedene Zellorganellen. Da diese über eine ihren Aufgaben entsprechende individuelle Proteinausstattung verfügen, müssen neu synthetisierte Proteine spezifisch zu der jeweiligen Organelle transportiert werden. Alle Organellen sind durch mindestens eine biologische Membran vom Cytosol abgegrenzt und verfügen deshalb über entsprechende membranintegrierte Proteintranslokasen. Diese erkennen spezifisch die Vorstufenproteine und vermitteln deren Translokation oder Insertion über oder in die jeweilige Membran (Schatz und Dobberstein, 1996).

## 1.1. Struktur und Biogenese von Mitochondrien

Mitochondrien enthalten eine Reihe von essenzieller Stoffwechselprozesse der eukaryotischen Zelle (Scheffler, 2001). Eine der Hauptaufgaben ist die Bereitstellung von Energie in Form von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) durch oxidative Phosphorylierung. Des Weiteren sind anabole und metabole Reaktionen des Aminosäure-, Lipid- und Fettsäurestoffwechsels in Mitochondrien lokalisiert. Mitochondrien sind für die Biosynthese von Fe/S-Clustern verantwortlich; sie sind auch an der intrazellulären Kalzium-Hömeostase sowie der Regulation von apoptotischen Vorgängen beteiligt (Kuwana und Newmeyer, 2003; Lill und Kispal, 2000; Rutter und Rizzuto, 2000). Dadurch sind Mitochondrien auch von zentraler Bedeutung für die Entstehung von pathologischen Zuständen wie den mitochondrialen Encephalomyopathien oder neurodegenerativen Krankheiten wie Parkinson oder Huntington (DiMauro und Schon, 2003; Orth und Schapira, 2001).

Mitochondrien besitzen mit der inneren und der äußeren Membran zwei Membransysteme, die die beiden wässrigen Kompartimente Matrix und Intermembranraum begrenzen (Frey und Mannella, 2000). Die Fläche der Innenmembran ist durch Invagination in falten- oder röhrenartige Cristae stark vergrößert (Reichert und Neupert, 2002). Die Außenmembran ist aufgrund der Anwesenheit von Porinen für Ionen und Metabolite durchlässig. Im Gegensatz dazu können niedermolekulare Substanzen die

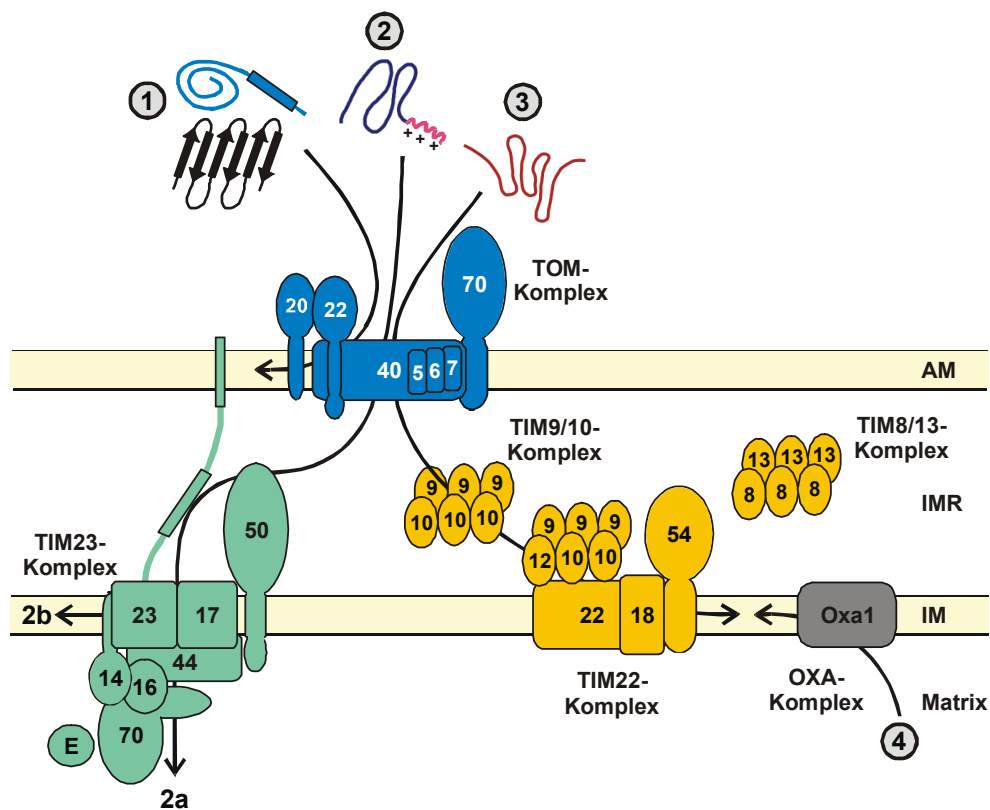
Innenmembran nur mit Hilfe von spezifischen Transportsystemen überqueren. Die Außenmembran enthält im Vergleich zur Innenmembran relativ wenige Proteine, vorherrschend sind Porine, Proteine der Proteintranslokation, Enzyme der Lipid-Biosynthese sowie Proteine, die an der Ausbildung der mitochondrialen Morphologie beteiligt sind. Die Außenmembran von Mitochondrien ist neben der von Chloroplasten die einzige Membran der eukaryotischen Zelle, die  $\beta$ -Barrel-Proteine enthält (Wimley, 2003). Sonst kommen  $\beta$ -Barrel-Membranproteine nur noch in der Außenmembran von Gram-negativen Bakterien vor. In *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*, S.c.) sind bisher drei  $\beta$ -Barrel-Proteine identifiziert worden (Mannella *et al.*, 1996). Por1 und Por2 sind Verwandte bakterieller Porine. Die Funktion von Por2 ist unbekannt, während Por1 den Transport von Ionen und Metaboliten vermittelt (Bay und Court, 2002). Por1 wird auch als VDAC (*voltage-dependent anion-selective channel*) bezeichnet und im Folgenden als Porin bezeichnet. Tom40 bildet den proteinleitenden Kanal der allgemeinen Translokase der Außenmembran (TOM-Komplex) (Ahting *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998). Die Innenmembran enthält vor allem die Proteine der Atmungskette und der ATP-Synthase sowie eine Vielzahl von Metabolittransportern (Scheffler, 2001).

Die Gestalt von Mitochondrien hängt vom jeweiligen Zelltyp ab. In *S. cerevisiae* bilden Mitochondrien ein dynamisches retikuläres Netzwerk, welches sich vornehmlich unterhalb des Zellkortex befindet (Shaw und Nunnari, 2002). Mitochondrien werden nicht *de novo* gebildet. Sie nehmen ständig neu synthetisierte Komponenten auf. Fusions- und Teilungsvorgänge sorgen für die Vermehrung der Mitochondrien und die Erhaltung des mitochondrialen Retikulums. Da etwa 99% der mitochondrialen Proteine im Zellkern kodiert sind, müssen die im Cytosol translatierten Vorstufenproteine in die Mitochondrien importiert werden. Nach Analyse verschiedener mitochondrialer Proteome geht man inzwischen davon aus, dass ungefähr 10% des zellulären Genoms für mitochondriale Proteine kodieren (Andersson *et al.*, 2003). In *S. cerevisiae* entspricht dies etwa 800 Proteinen, während acht Proteine durch das mitochondriale Genom kodiert werden (Borst und Grivell, 1978).



## 1.2. Proteinimport in Mitochondrien

Der Import der nukleär kodierten Vorstufenproteine in die Mitochondrien wird durch verschiedene membranintegrierte Translokasen vermittelt (Abb. 1) (Paschen und Neupert, 2001). Die Außenmembran enthält eine Translokase, den TOM-Komplex (translocase of outer membrane), die von allen importierten Vorstufenproteinen benutzt wird. Dagegen verfügt die Innenmembran über drei Translokasen unterschiedlicher Substratspezifität; die TIM23- und TIM22-Komplexe (translocases of inner membrane) sowie der OXA-Komplex.



**Abb. 1. Biogenesewege von mitochondrialen Proteinen in *S. cerevisiae*.**

1. TOM-Komplex vermittelte Insertion von Proteinen mit einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne sowie von  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen in die Außenmembran. 2. Translokation von Proteinen mit N-terminaler Präsequenz in die Matrix (2a) oder Insertion in die Innenmembran (2b) mittels des TIM23-Komplexes. 3. TIM22-Komplex vermittelte Insertion von hydrophoben Innenmembranproteinen mit internen Importsignalen. 4. Export von nukleär und mitochondrial kodierten Proteinen aus der Matrix in die Innenmembran mittels des OXA-Komplexes. Weitere Details siehe Text. Die Zahlen der Tom- und Tim-Proteine entsprechen der relativen molekularen Masse. 70, mtHsp70; AM, Außenmembran; E, Mge1; IMR, Intermembranraum; IM, Innenmembran.

Mitochondriale Vorstufenproteine werden an cytosolischen Ribosomen synthetisiert und posttranslational importiert. Chaperone halten diese in einer importkompetenten Konformation und verhindern Aggregation hydrophober Vorstufenproteine. Dazu gehören je nach Organismus Mitglieder der Hsp70- oder Hsp90-Familie sowie Faktoren, die möglicherweise spezifisch an mitochondriale Proteine binden (Beddoe und Lithgow, 2002; Young *et al.*, 2003). Die Erkennung der Vorstufenproteine sowie die Sortierung innerhalb der Organelle werden durch Signale vermittelt, die entweder N-terminale Präsequenzen oder interne Sequenzen des betreffenden Vorstufenproteins darstellen (Endo und Kohda, 2002). N-terminale Matrixzielsignale bestehen aus 20-60 Aminosäureresten, darunter mehrere positiv geladene und hydroxylierte Reste. Sie bilden eine amphipathische  $\alpha$ -Helixstruktur aus (Roise und Schatz, 1988). Interne Importsignale sind bisher wenig charakterisiert. Die mitochondrialen Vorstufenproteine werden durch Rezeptoren auf der Oberfläche der Mitochondrien erkannt und an den Translokationskanal des TOM-Komplexes weitergeleitet, der wie alle mitochondrialen Translokasen Proteine nur in einer ungefalteten Konformation transportieren kann (Endo und Kohda, 2002; Rassow *et al.*, 1990).

### **1.2.1. Die Translokase der Außenmembran**

Der TOM-Komplex setzt sich aus sieben Membranproteinen zusammen (Paschen und Neupert, 2001; Ryan *et al.*, 2000). Die Rezeptoren Tom20 und Tom70 exponieren Domänen in das Cytosol und sind über Tom22 lose mit dem Tom-Kernkomplex assoziiert, der aus den restlichen Tom-Proteinen gebildet wird (Dekker *et al.*, 1998; Ryan *et al.*, 2000). Tom20 ist der primäre Rezeptor für Präproteine mit N-terminaler Präsequenz, während Tom70 Proteine mit internen Signalsequenzen erkennt (Endo und Kohda, 2002). Beide verfügen jedoch über eine gewisse redundante Funktion, da nur die Deletion beider Rezeptoren letal ist (Ramage *et al.*, 1993). Tom22 übernimmt die Präproteine anschließend von den Rezeptoren und führt sie dem TOM-Kanal zu (van Wilpe *et al.*, 1999). Tom40 ist das einzige essenzielle Außenmembranprotein und bildet den Translokationskanal des TOM-Komplexes aus (Ahting *et al.*, 2001; Baker *et al.*, 1990; Hill *et al.*, 1998). Dieser ist spannungsabhängig und kationenselektiv und bindet mitochondriale Präsequenzen (Pfanner und Chacinska, 2002). Tom40 enthält einen hohen

Anteil an antiparallelen  $\beta$ -Faltblatt-Strukturen, mit denen es wahrscheinlich in der Außenmembran integriert ist (Ahting *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998; Mannella *et al.*, 1996). Die kleinen Tom-Proteine Tom5, Tom6 und Tom7 scheinen eine eher strukturelle Funktion bei der Assemblierung und Stabilisierung des TOM-Komplexes auszuüben (Pfanner und Wiedemann, 2002; Rapaport, 2002; Ryan *et al.*, 2000).

Elektronenmikroskopische Aufnahmen und 3D-Rekonstitutionen von gereinigten TOM-Komplexen aus *N. crassa* und *S. cerevisiae* zeigten eine Struktur mit zwei bis drei Poren (Ahting *et al.*, 1999; Kunkele *et al.*, 1998; Model *et al.*, 2002). Jede Pore entspricht wahrscheinlich einem proteinleitenden Kanal mit einem Durchmesser von etwa 2.5 nm und kann somit eine größtenteils ungefaltete Polypeptidkette oder bis zu zwei  $\alpha$ -Helix-Strukturen aufnehmen. Bilder von isoliertem Tom40 wiesen Partikel mit nur einer Pore auf, die vermutlich aus einem Tom40-Dimer gebildet wird (Ahting *et al.*, 2001; Dekker *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Der TOM-Kernkomplex von *S. cerevisiae* weist bei Analyse durch Blaue Nativgelelektrophorese (BNGE) ein apparentes Molekulargewicht von 400 kDa auf, der TOM-Holokomplex mit den Rezeptoren 490-600 kDa (Dekker *et al.*, 1998).

Welche Kraft die Translokation von Vorstufenproteinen über die Außenmembran antreibt, ist nicht genau bekannt (Ryan *et al.*, 2000). Nach der "Acid-chain"-Hypothese und der erweiterten "Binding chain"-Hypothese binden die Vorstufenproteine zuerst an die dem Cytosol zugewandte *cis*-Bindungsstelle des TOM-Komplexes, die vermutlich aus den cytosolischen Domänen der Rezeptoren Tom20, Tom70 und Tom22 besteht. Anschließend werden die Vorstufenproteine über weitere Bindungsstellen mit steigender Affinität an die *trans*-Bindungsstelle weitergereicht, die an der Innenseite der Außenmembran lokalisiert ist und unter anderem von Tom40 gebildet wird (Endo und Kohda, 2002; Meisinger *et al.*, 2001; Schatz, 1997). Dabei spielen sowohl ionische als auch hydrophobe Interaktionen eine Rolle. Vollständige Translokation über den TOM-Komplex benötigt neben dem Membranpotential über der Innenmembran die Interaktion mit einem TIM23- oder TIM22-Komplex. Diese übernehmen an die *trans*-Bindungsstelle gebundene Vorstufenproteine (Endo *et al.*, 2003). Kürzlich wurde für Tom40 auch eine Chaperon-ähnliche Funktion vorgeschlagen (Esaki *et al.*, 2003). Tom40 scheint bevorzugt an hydrophobe Segmente von Vorstufenproteinen zu binden und so eine mögliche Aggregation zu verhindern. Dies könnte den Translokationsprozess unterstützen, in dem

Tom40 eine optimale Umgebung für translozierende, entfaltete Vorstufenproteine zur Verfügung stellt (Voos, 2003). Für Intermembranraumproteine scheint die Faltung in die native Konformation sowie die Inkorporation von Co-Faktoren die Translokation irreversibel zu machen (Herrmann und Neupert, 2000).

### 1.2.2. Biogenese von Außenmembranproteinen

Neben den  $\beta$ -Barrel-Proteinen, die in die Lipidschicht mittels anti-paralleler  $\beta$ -Faltblätter eingebettet sind, enthält die mitochondriale Außenmembran nur Proteine mit einer einzigen  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne (Mannella *et al.*, 1996; Rapaport, 2003; Wattenberg und Lithgow, 2001). N-terminal verankerte Proteine wie Tom20 oder Tom70 enthalten diese am N-Terminus, während die *Tail-anchor*-Proteine wie Tom22 oder die kleinen Tom-Proteine mittels einer Transmembrandomäne am C-Terminus inseriert sind (Borgese *et al.*, 2003; Wattenberg und Lithgow, 2001). Die Signal-Ankerdomäne, die für den Import und die Topologie der Proteine verantwortlich ist, besteht aus der Transmembrandomäne sowie geladenen Aminosäureresten, die diese flankieren (Rapaport, 2003; Shore *et al.*, 1995). Bei *Tail-anchor*-Proteinen scheint zusätzlich ein konservierter Prolinrest innerhalb der Transmembrandomäne eine Rolle bei der Membraninsertion zu spielen (Borgese *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu *Tail-anchor*-Proteinen scheinen N-terminal verankerte Proteine unabhängig von den Rezeptoren Tom20 und Tom70 importiert zu werden (Rapaport, 2003). Möglicherweise sind Tom5 und Tom40 an der Erkennung beteiligt. Wie die Vorstufenproteine in die Lipidschicht integriert werden, ist ungeklärt. Die Signal-Ankerdomäne könnte in das Lumen des Translokationskanals des TOM-Komplexes inserieren und anschließend lateral entlassen werden. Dazu müsste sich vermutlich die  $\beta$ -Barrel-Struktur von Tom40 öffnen, was jedoch thermodynamisch problematisch wäre (Gabriel *et al.*, 2001). Möglich wäre auch, dass die Vorstufenproteine an der Grenzschicht zwischen TOM-Komplex und der Lipidphase in die Membran inseriert werden und der TOM-Kanal nicht benötigt wird (Rapaport, 2003; Wattenberg und Lithgow, 2001).

Trotz zahlreicher Untersuchungen ist die Biogenese der mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Membranproteine Porin und Tom40 im Detail nicht verstanden (Gabriel *et al.*, 2001). Diese

enthalten interne Importsignale, die über mehrere Regionen des Vorstufenproteins verteilt sind und so eher strukturelle Erkennungselemente ausbilden (Rapaport, 2003). Für Porin als auch für Tom40 konnte gezeigt werden, dass diese Tom20-abhängig importiert werden und auch der TOM-Kanal an der Biogenese beteiligt ist (Pfanner und Chacinska, 2002; Rapaport, 2003). Die anschließende Assemblierung der Vorstufenproteine in die funktionellen Komplexe schließt mehrere hochmolekulare Intermediate ein, die mittels BNGE unterschieden werden können (Dekker *et al.*, 1996; Model *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999).

### 1.2.3. Assemblierung des TOM-Komplexes

Die Tom-Untereinheiten sind für ihren Import ebenfalls auf den TOM-Komplex angewiesen (Rapaport, 2002). TOM-Komplexe werden nicht *de novo* gebildet; neu synthetisierte Tom-Proteine scheinen eher dynamisch in bereits vorhandene TOM-Komplexe dynamisch integriert zu werden. Von Tom40 konnten mit Hilfe von BNGE verschiedene Assemblierungsintermediate identifiziert werden (Matouschek und Glick, 2001; Model *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999; Rapaport *et al.*, 2001). Nach Translokation über die Außenmembran erscheint das Tom40-Vorstufenprotein in einem frühen Komplex von 250 kDa Größe, dessen Zusammensetzung bisher nicht bekannt ist. Dabei scheint Tom40 noch nicht in die Lipidschicht der Außenmembran integriert zu sein und ist zum Intermembranraum hin exponiert. Anschließend dimerisiert Tom40 und assoziiert mit Tom5 zu einem späten Translokationsintermediat von 100 kDa Größe. Auf dieser Stufe ist das Tom40-Vorstufenprotein bereits in die Membran integriert, so dass dies wahrscheinlich während der Reifung vom 250 kDa zum 100 kDa Intermediat erfolgt (Model *et al.*, 2001). Die Bildung des 100 kDa Intermediates *in vitro* erfordert Temperaturen von mindestens 15°C, während das 250 kDa Intermediat bereits bei 0°C gebildet wird (Model *et al.*, 2001). Anscheinend erfordert die Insertion eines hydrophoben Vorstufenproteins ein dynamisches Verhalten der Lipidphase (Bowie, 2004). Der letzte Schritt ist die Bildung des 400 kDa TOM-Kernkomplexes durch sequentielle Rekrutierung von Tom7, Tom6 und Tom22 durch das 100 kDa Intermediat. Tom6 vermittelt vermutlich die Assemblierung von Tom22, während Tom7 den TOM-Komplex eher zu destabilisieren scheint, wodurch ein kontinuierlicher Austausch von Tom-Proteinen gefördert wird (Dekker *et al.*, 1998; Honlinger *et al.*, 1996). Demnach liegt in der Außenmembran ein dynamisches

Gleichgewicht von assemblierten TOM-Komplexen und Assemblierungsintermediaten vor, wodurch neu importierte Tom-Untereinheiten integriert werden können (Pfanner und Wiedemann, 2002; Rapaport, 2002).

#### 1.2.4. Die TIM23-Translokase

Der TIM23-Komplex ist für die Membranpotential- und ATP-abhängige Translokation von Präproteinen mit N-terminaler Präsequenz über die Innenmembran in die Matrix sowie für die Insertion von Innenmembranproteinen nach einem Stopp-Transfer-Modell verantwortlich (Jensen und Dunn, 2002). Der TIM23-Komplex besteht aus acht essenziellen Proteinen, die einem Präsequenzrezeptor, einem membranintegrierten Translokationskanal sowie dem Importmotor auf der Matrix-Seite zugeordnet werden können (Paschen und Neupert, 2001). Der Rezeptor besteht vermutlich aus der Intermembranraum-Domäne des Innenmembranproteins Tim50, das den Transfer von Präproteinen von der *trans*-Bindungsstelle des TOM-Komplexes zum TIM23-Komplex vermittelt und an die dimere Rezeptor-Domäne von Tim23 im Intermembranraum übergibt (Endo *et al.*, 2003). Bindung einer Präsequenz führt zur Disruption des Tim23-Dimers, wodurch möglicherweise der TIM23-Kanal geöffnet wird (Bauer *et al.*, 1996). Dieser besteht aus den membranintegrierten C-terminalen Regionen von Tim17 und Tim23 (Berthold *et al.*, 1995; Milisav *et al.*, 2001; Truscott *et al.*, 2001). Der N-Terminus von Tim23 ist zusätzlich in die Außenmembran integriert, so dass Tim23 beide mitochondriale Membranen durchspannt (Donzeau *et al.*, 2000). Diese Topologie erleichtert vermutlich durch die Annäherung der beiden Membranen den Transfer von Präproteinen vom TOM zum TIM23-Komplex. Die Funktion des Membranpotentials  $\Delta\psi$  ist nicht bekannt (Herrmann und Neupert, 2000). Der auf der Matrixseite des TIM23-Komplexes lokalisierte Importmotor sorgt anschließend für die ATP-abhängige Translokation der Präproteine über die Innenmembran (Neupert und Brunner, 2002). Dieser setzt sich aus dem Membranprotein Tim14, den beiden peripher assoziierten Proteinen Tim16 und Tim44 sowie dem löslichen mitochondrialen Chaperon Hsp70 (mtHsp70) und seinem Nukleotidaustauschfaktor Mge1 zusammen (Mayer, 2004). mtHsp70 wird durch Tim44 an den Translokationskanal rekrutiert und ist die zentrale Komponente des Importmotors. Für den Mechanismus der mtHsp70-Funktion werden zwei Modelle diskutiert. Das "*Brownian*

*ratchet*"- oder *"Trapping"*-Modell beschreibt mtHsp70 als molekularen Sperrhaken, der die spontane Brownsche Molekularbewegung der translozierenden Polypeptidkette in einen gerichteten Transport umsetzt (Neupert und Brunner, 2002). Nach dem *"Pulling"*-Modell zieht mtHsp70 aktiv an der Polypeptidkette. Die dafür benötigte Kraft soll dabei durch eine ATP-getriebene Konformationsänderung von mtHsp70 generiert werden (Matouschek *et al.*, 2000). In der Matrix wird die N-terminale Präsequenz durch die Matrix-Prozessierungspeptidase (MPP) abgespalten und die Polypeptidkette faltet sich mit Hilfe der mitochondrialen Chaperone mtHsp70 und Hsp60 in seine native Konformation (Neupert, 1997).

### 1.2.5. Die TIM22-Translokase

Der TIM22-Komplex vermittelt die Membranpotential-abhängige Insertion von integralen Innenmembranproteinen wie mitochondriale Carrier oder den Tim-Untereinheiten Tim17, Tim22 und Tim23 (Jensen und Dunn, 2002). Diese Proteine enthalten wenig charakterisierte interne Importsignale. Die zentrale Komponente der 300 kDa TIM22-Translokase ist Tim22, die einzige essenzielle membranintegrierte Untereinheit (Sirrenberg *et al.*, 1996). Es bildet den Insertionskanal aus, der möglicherweise eine spannungsaktivierte, gekoppelte Doppelpore ist (Rehling *et al.*, 2003b). Elektronenmikroskopische Aufnahmen des isolierten TIM22-Komplexes aus *S. cerevisiae* wiesen Partikel mit Kontrastmittel-gefüllten Zentren von je 1.6 nm Durchmesser auf (Rehling *et al.*, 2003a). Der TIM22-Komplex aus *S. cerevisiae* enthält noch zwei weitere nicht-essenzielle Membranproteine, Tim18 und Tim54, deren Funktionen nicht bekannt sind (Jensen und Dunn, 2002). Auf der Intermembranraumseite ist ein 70 kDa TIM9/10/12-Komplex mit der TIM22-Translokase assoziiert (Bauer *et al.*, 2000).

Die Carrier-Vorstufenproteine werden durch Tom70 erkannt und scheinen in einer Schleifen-Struktur in den TOM-Kanal zu inserieren (Wiedemann *et al.*, 2001). Im Intermembranraum werden die Vorstufenstufenproteine noch während sie an den TOM-Komplex gebunden sind von einem löslichen 70 kDa Komplex erkannt. Der TIM9/10-Komplex transportiert die Mitglieder der mitochondrialen Carrier-Familie, während der TIM8/13-Komplex den Import von Tim23 vermittelt (Bauer *et al.*, 2000). Diese verhindern sowohl das Zurückgleiten als auch die Aggregation der hydrophoben Vorstufenproteine.

Anschließend werden diese zur Insertion in die Innenmembran an den TIM22-Komplex übergeben. Der Insertionsmechanismus ist unverstanden. *Peptid-scan*-Experimente ergaben, dass die 70 kDa Komplexe vor allem an die hydrophoben Bereiche der Substratproteine binden (Curran *et al.*, 2002a; Curran *et al.*, 2002b).

Tim9, Tim10 und Tim12 bilden mit Tim8 und Tim13 eine eigene Proteinfamilie, die in allen eukaryotischen Genomen vorkommt und sich durch ein konserviertes, Zinkfinger-ähnliches CX<sub>3</sub>C-Motiv auszeichnet (Bauer *et al.*, 2000; Paschen und Neupert, 2001). Tim8 und Tim13 sind im Gegensatz zu den anderen Mitgliedern keine essenziellen Proteine. Zusammen mit einem temperatursensitiven Allel von Tim10 ist die Deletion von Tim8 jedoch synthetisch letal (Koehler *et al.*, 1999a). Dies scheint auf eine gewisse überlappende Funktion hinzuweisen.

Mutationen in dem humanen Ortholog von Tim8, dem DDP1-Protein (deafness dystonia peptide 1), sind mit einer seltenen neurodegenerativen Krankheit assoziiert, dem Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (Bauer und Neupert, 2001). Dies ist somit die erste mitochondriale Erkrankung, die auf einem Defekt des Proteinimports beruht, obwohl die genaue molekulare Ursache bisher nicht bekannt ist.

### **1.3. Mitochondriale Evolution**

Die evolutionäre Abstammung von Mitochondrien wird durch die Endosymbionten-Theorie beschrieben (Gray *et al.*, 1999). Danach besitzen Mitochondrien einen monophyletischen Ursprung und stammen von einem frei lebenden aeroben  $\alpha$ -Proteobakterium ab (Emelyanov, 2001). Die heutige eukaryotische Zelle ist demnach durch Endosymbiose von aeroben Eubakterien (im Falle von Chloroplasten von photosynthetisch aktiven Cyanobakterien) mit einer anaeroben Proto-eukaryotischen Urzelle entstanden. Mitochondrien weisen noch mehrere typische bakterielle Eigenschaften auf (Gray *et al.*, 1999). Unter anderem besitzen sie ein ringförmiges Genom sowie 70S-Ribosomen und die Kernkomponenten der Atmungskette und der ATP-Synthase gleichen denen der bakteriellen Vorläufer. Die mitochondriale Innenmembran stammt von der bakteriellen Plasmamembran ab, während die mitochondriale Außenmembran der von Gram-negativen Bakterien entspricht und deshalb als einzige eukaryotische Membran  $\beta$ -Barrel-



Proteine enthält (Emelyanov, 2001). Die *Tail-anchor*-Proteine der mitochondrialen Außenmembran besitzen einen eukaryotischen Ursprung (Wattenberg und Lithgow, 2001). Die meisten Gene des Endosymbionten gingen im Laufe der Evolution entweder verloren oder wurden in das nukleäre Genom überführt, während das mitochondriale Proteom durch nukleär kodierte Proteine eukaryotischen Ursprungs komplementiert wurde (Gray *et al.*, 1999). Diese Proteine sind überwiegend am Transport von Metaboliten und Proteinen beteiligt oder übernehmen regulatorische Funktionen (Herrmann, 2003; Karlberg *et al.*, 2000). Die erhaltenen bakteriellen Proteine besitzen dagegen Haushalts-Aufgaben wie Energiemetabolismus, DNA-Replikation oder Proteinsynthese. In *S. cerevisiae* können nur noch 20-30% der mitochondrialen Proteine auf einen  $\alpha$ -proteobakteriellen Ursprung zurückgeführt werden (Karlberg *et al.*, 2000; Marcotte *et al.*, 2000). Eukaryotischen Ursprungs sind etwa 50% der Proteine, Organismen-spezifisch etwa 20%. Der Gentransfer in den Kern machte die Entwicklung einer neuen Proteinimportmaschinerie notwendig (Herrmann, 2003). Die daraus entstandenen mitochondrialen TOM- und TIM-Komplexe weisen deshalb keine Ähnlichkeiten zu bakteriellen Proteintransportsystemen auf. Mitochondrien enthalten keine homologen Proteine mehr zu bakteriellen Sec- oder Tat-Untereinheiten (Glick und von Heijne, 1996).

#### 1.4. Proteintranslokation in Bakterien

Gram-negative Bakterien enthalten eine innere und äußere Zellmembran, die das Periplasma umschließen (Beveridge, 1999). Während beide Schichten der Innenmembran größtenteils aus Phospholipiden bestehen, weist die Außenmembran eine asymmetrische Verteilung der Lipide auf. Die äußere Schicht enthält Lipopolysaccharide (LPS), die innere Schicht Phospholipide. Das Periplasma enthält das einschichtige Murein-Peptidoglycan-Gerüst, das durch Lipoproteine an der Außenmembran verankert ist. Die Zellwand Gram-positiver Bakterien wird dagegen ausschließlich aus einem großen Murein-Sacculus gebildet. Die Außenmembran Gram-negativer Bakterien wirkt als selektive Permeationsbarriere (Nikaido, 2003). Neben den Lipoproteinen, die mittels eines kovalent-gebundenen Lipids in der Außenmembran verankert sind, enthält diese ausschließlich  $\beta$ -Barrel-Membranproteine, die größtenteils entsprechende Transportfunktionen übernehmen (Schulz, 2003).

Die bakterielle Cytoplasmamembran enthält drei verschiedene Translokationssysteme. Die Sec-Maschinerie vermittelt die Sekretion über und die Insertion in die Plasmamembran (de Keyzer *et al.*, 2003). Sie ist das bakterielle Äquivalent der Sec61-Translokase des eukaryotischen Endoplasmatischen Retikulums (Dobberstein, 1994). Das Oxa1-Homolog YidC vermittelt die Insertion von Plasmamembranproteinen, während der Tat-Komplex den Export von gefalteten Proteinen in das Periplasma oder in die Plasmamembran bewirkt (Kuhn *et al.*, 2003; Palmer und Berks, 2003).

#### **1.4.1. Die Sec-Translokase**

Die meisten Vorstufenproteine werden über einen allgemeinen Sekretionsweg über die Plasmamembran transportiert, der von den Sec-Proteinen gebildet wird (de Keyzer *et al.*, 2003). Der heterotrimere Membrankomplex SecYEG bildet den proteinleitenden Kanal aus, an den die cytosolische ATPase SecA peripher assoziiert ist. Der SecDFYajC-Subkomplex reguliert die Assoziation von SecA und ist für einen effizienten Proteintransport notwendig. Neusynthetisierte Vorstufenproteine gelangen auf zwei verschiedenen Wegen zur Translokationsmaschinerie. Sekretorische Proteine werden posttranslational und SecB-abhängig, Plasmamembranproteine dagegen kotranslational und SRP-abhängig an die SecYEG-Translokase geleitet (de Keyzer *et al.*, 2003).

Sekretorische Proteine, die für das Periplasma oder Außenmembran die Außenmembran bestimmt sind, enthalten eine N-terminale Signalsequenz und werden im Cytoplasma von dem Chaperon SecB gebunden. Dadurch werden die Vorstufenproteine in einem translokationskompetenten Zustand gehalten. SecB interagiert mit an den SecYEG-Komplex gebundenem SecA und geleitet so die Vorstufenproteine an die Translokationsmaschinerie. Durch wiederholte ATP-abhängige Zyklen treibt SecA die Translokation der Vorstufenproteine über die Membran an.

Die meisten Plasmamembranproteine werden noch während der Synthese am Ribosom von dem bakteriellen Signal-Erkennungs-Partikel (SRP) gebunden. Dieses Ribonukleoprotein besteht aus einer 4.5S RNA sowie der GTPase Ffh. Im Gegensatz zum eukaryotischen SRP bewirkt dieses keinen Arrest der Translation. Der Komplex aus naszierender Polypeptidkette, Ribosom und SRP bindet GTP-abhängig an den transient

membranassoziierten SRP-Rezeptor FtsY. Nach GTP-Hydrolyse zerfällt der Komplex und die Vorstufe wird zur Insertion zur SecYEG-Translokase transferiert (de Keyzer *et al.*, 2003). Durch Assoziation mit dem SRP wird eine Exposition der hydrophoben Substrate in das wässrige Cytoplasma vermieden.

Die Topologie der inserierten Membranproteine wird durch geladene Aminosäurereste bestimmt, die den Transmembransegmenten benachbart sind. Die cytosolische Seite der Plasmamembran besitzt gegenüber der periplasmatischen Seite eine negative Überschussladung. Nach der *Positive-inside-rule* orientieren sich die Transmembrandomänen so in der Membran, dass die flankierende Region mit der größeren positiven Ladung im Cytoplasma verbleibt (von Heijne, 1989).

#### **1.4.2. Der Tat-Transporter**

Der Tat-Transporter stellt ein weiteres evolutionär konserviertes Proteinexport-System dar, das sowohl in der Plasmamembran von Bakterien als auch in der Thylakoidmembran von Chloroplasten vorkommt (Palmer und Berks, 2003). Dieser vermittelt den Export von Proteinen mit Kofaktoren oder von oligomeren Proteinkomplexen. Der Einbau der Kofaktoren und die Komplexassemblierung erfolgt bereits im Cytoplasma, so dass die Substrate im gefalteten Zustand transportiert werden müssen. Der Transport der Substrate ist von einem elektrochemischen Protonengradienten über der Membran abhängig (Alder und Theg, 2003). Der Tat-Transporter besteht aus den Membranproteinen TatA, TatB und TatC. Das so genannte *Twin-arginine*-Transportsignal wird von TatC erkannt, während TatA vermutlich den Transportkanal ausbildet. Der Tat-Transporter scheint auch an der Insertion von einigen bakteriellen Innenmembranproteinen sowie an der Biogenese der Außenmembran beteiligt zu sein (Ize *et al.*, 2003; Sargent *et al.*, 2002). TatC, jedoch nicht TatA oder TatB, wurde in mitochondrialen Genomen von Pflanzen und verschiedenen Protisten identifiziert (Bogsch *et al.*, 1998; Herrmann, 2003).

### 1.4.3. Die Alb3/Oxa1/YidC-Familie

Die hochkonservierte Alb3/Oxa1/YidC-Familie kommt sowohl in Bakterien und Archäen als auch in Mitochondrien und Chloroplasten vor (Kuhn *et al.*, 2003). Das mitochondriale Oxa1-Protein vermittelt die Insertion sowohl von mitochondrial- als auch von nukleär kodierten Proteinen aus der mitochondrialen Matrix in die Innenmembran. Möglicherweise ist Oxa1 auch an der Assemblierung der Substrate in die funktionellen Komplexe beteiligt. Die Oxa1-Substrate werden nach der *positive-inside-rule* inseriert, wodurch negative Ladungen bevorzugt in den positivgeladenen Intermembranraum exportiert werden. In Mitochondrien scheinen noch weitere Proteine, wie Cox18, Mba1, Mss2 oder Pnt1, an der Insertion von Proteinen in die Innenmembran beteiligt zu sein (Kuhn *et al.*, 2003).

Das bakterielle Oxa1-Homolog ist YidC, das in allen Eubakterien und in Archäebakterien vorkommt (Kuhn *et al.*, 2003). YidC vermittelt unabhängig oder in Kooperation mit der Sec-Translokase die Insertion und Faltung von Vorstufenproteinen in die Plasmamembran. Alb3 (Albino3) ist das Oxa1-Homolog von Chloroplasten und ist in der Thylakoidmembran lokalisiert. Es vermittelt die Insertion eines lichtsammelnden Chlorophyll-bindenden Proteins (LHCP). Alb3 ist jedoch nicht am Transport von Proteinen in das Thylakoid-Lumen beteiligt, der Sec- oder TAT/ $\Delta$ pH-abhängig ist (Kuhn *et al.*, 2003). Im Gegensatz zu Bakterien scheint jedoch keine Interaktion von Alb3 mit der Sec-Translokase zu existieren.

### 1.4.4. Biogenese von bakteriellen Außenmembranproteinen

Alle integralen Außenmembranproteine Gram-negativer Bakterien bestehen aus amphipathischen, antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern, die eine zylindrische  $\beta$ -Barrel-Struktur ausbilden (Schulz, 2003). Die Vorstufenproteine enthalten eine typische N-terminale Signalsequenz und werden SecB-abhängig durch die SecYEG-Translokase über die Plasmamembran transportiert (Danese und Silhavy, 1998). Im Periplasma wird das Signalpeptid durch die Signalpeptidase LepB prozessiert (Bernstein, 2000). Die Vorstufenproteine scheinen nach Überqueren der Plasmamembran im Periplasma ein teilweise gefaltetes, insertionskompetentes Intermediat auszubilden, welches anschließend in die Außenmembran inseriert (Kleinschmidt, 2003). Der amphipathische

Charakter der  $\beta$ -Barrel-Konformation scheint eine Insertion der Außenmembranproteine in die Innenmembran zu verhindern und die Löslichkeit im Periplasma bis zur Integration zu sichern. Wie die Vorstufenproteine in die Lipidschicht der Außenmembran integrieren und in ihre native Konformation falten, ist wenig verstanden (Danese und Silhavy, 1998). Die Insertion sowie die Ausbildung der  $\beta$ -Barrel-Struktur scheinen jedoch gleichzeitig abzulaufen (Bernstein, 2000).

Die Vorstufen werden im Periplasma vor Insertion in die Außenmembran von spezifischen Chaperonen wie Skp gebunden (Missiakas und Raina, 1997). Diese verhindern die Aggregation der Vorstufen und sind vermutlich auch an der Ausbildung der Insertionsintermediate beteiligt (Bernstein, 2000; Danese und Silhavy, 1998). Für die beiden periplasmatischen Peptidyl-prolyl-*cis/trans*-Isomerasen SurA und PpiD wurde eine Rolle bei der Biogenese von Außenmembranproteinen vorgeschlagen (Bernstein, 2000; Danese und Silhavy, 1998). Diese übernehmen eher eine generelle chaperonartige Funktion, während die Peptidyl-Isomerase-Aktivität nicht benötigt wird (Behrens, 2002). DegP/HtrA ist eine periplasmatische Protease, die bei normaler Temperatur chaperonartig ungefaltete Proteine rückfaltet, während sie bei höherer Temperatur missgefaltete Vorstufenproteine abbaut (Clausen *et al.*, 2002). Die Funktion einzelner periplasmatischer Chaperone ist nicht essenziell; sie weisen jedoch redundante Funktionen auf, da nur die Doppeldeletion zweier Chaperone zu einem synthetischen Wachstumsdefekt führt und Vorstufen von Außenmembranproteinen im Periplasma akkumulieren (Rizzitello *et al.*, 2001). Das periplasmatische DsbA/B/C-System katalysiert die Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken (Collet und Bardwell, 2002).

## 1.5. Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit war die Identifizierung von neuen Proteinen der mitochondrialen Außenmembran, die an Import und Assemblierung von mitochondrialen Vorstufenproteinen beteiligt sind. Dazu wurde ein proteomischer Ansatz gewählt, der zu dem offenen Leserahmen YNL026w aus *Saccharomyces cerevisiae* führte. Im weiteren sollte das durch YNL026w kodierte essenzielle Protein Tob55 funktionell und strukturell charakterisiert werden.

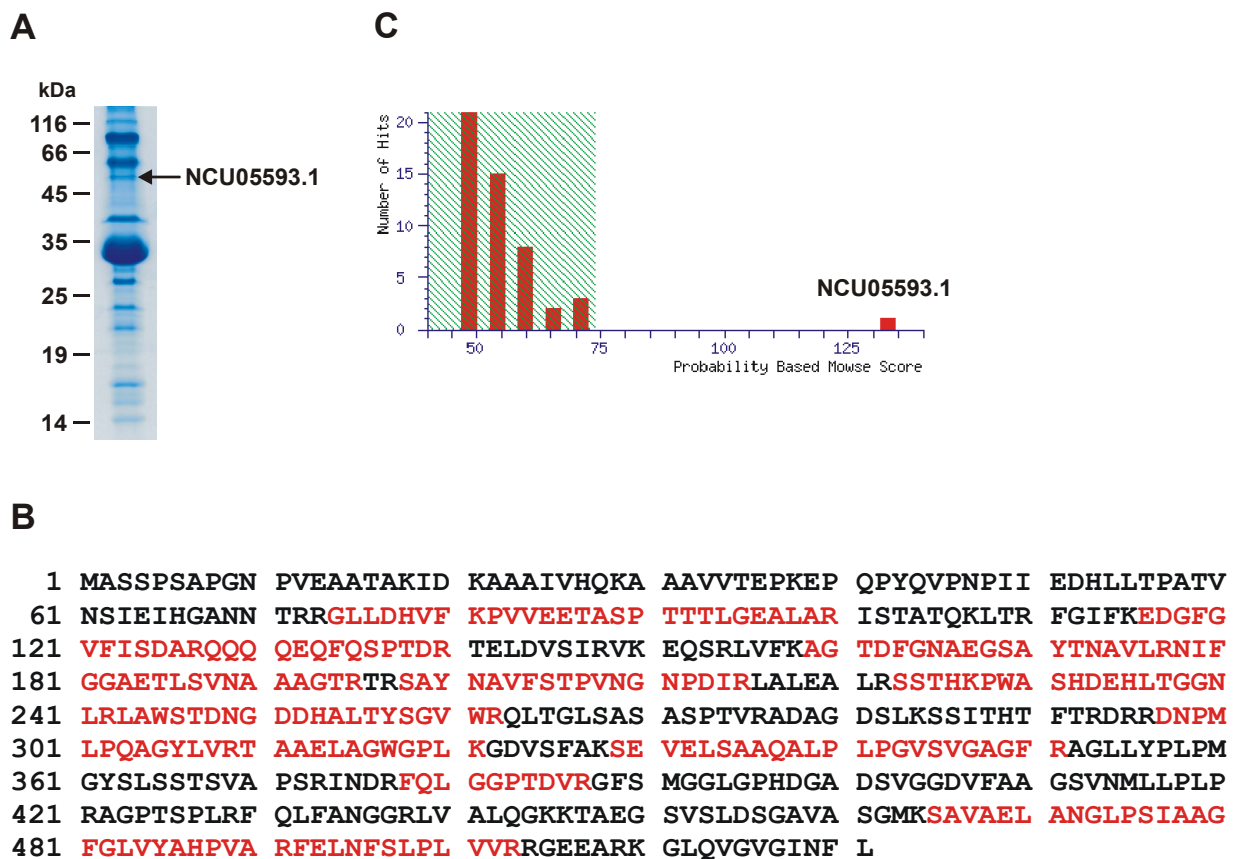
## 2. ERGEBNISSE

### 2.1. Identifizierung von neuen Außenmembranproteinen

Um neue Außenmembranproteine zu identifizieren, die an Import und Assemblierung von mitochondrialen Vorstufenproteinen beteiligt sein könnten, wurde ein proteomischer Ansatz gewählt. Dazu wurden Außenmembranvesikel, die aus isolierten *Neurospora crassa* (*N. crassa*; *N.c.*) Mitochondrien gewonnen wurden, mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. Anschließend wurden unbekannte Proteinbanden ausgeschnitten, die enthaltenen Proteine im Gel mit Trypsin verdaut und die erhaltenen Peptidfragmente mittels Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie (ESI-MS) identifiziert. Durch die Verwendung isolierter Außenmembran wurde die Innenmembran effizient abgetrennt und eine hohe Anreicherung erzielt. Die Durchführung der massenspektrometrischen Analyse erfolgte durch das Labor für Proteinanalytik des Adolf-Butenandt-Institutes, LMU München, unter der Leitung von Dr. Jörg Regula.

Der Bande 2 konnte aufgrund der erhaltenen Massen der Peptidfragmente *in silico* ein offener Leserahmen (ORF) zugeordnet werden, der ein unbekanntes hypothetisches Protein mit 521 Aminosäureresten und einer molekularen Masse von 54.7 kDa kodiert (Abb. 2A). Das zugehörige Gen, NCU05593.1 (Chromosom VI, contig 3.312), wurde durch das *N. crassa* Genomprojekt identifiziert und enthält vier Introns (*Neurospora* Genomprojekt, [www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/index.html](http://www.genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/index.html)). Die Proteinsequenz von NCU05593.1 wurde durch die massenspektrometrische Analyse der Trypsin-Fragmente zu 46% abgedeckt (Abb. 2B). Durch statistische Auswertung konnte eine zufällige Übereinstimmung der beobachteten Peptidfragmente mit der Aminosäuresequenz von NCU05593.1 ausgeschlossen werden (Probability Based Mowse Score, Abb. 2C). Die Banden 1 und 3-5 enthielten neben unbekanntem Peptiden auch bekannte Proteine wie Tom40, Tom70 und Porin. In Bande 1, deren elektrophoretische Mobilität einem apparenten Molekulargewicht von etwa 60 kDa entspricht, konnten weitere unbekannte Proteine identifiziert werden, die im Zuge dieser Arbeit nicht weiter untersucht wurden.

Aufgrund seiner relativen molekularen Masse von 54.7 und seiner im weiteren identifizierten Funktion wurde der ORF NCU05593.1 entsprechend der üblichen Nomenklatur Tob55 genannt (Pfanner *et al.*, 1996).



**Abb. 2. Identifizierung von NCU05593.1.**

**A.** Außenmembranvesikel aus isolierten *N. crassa* Mitochondrien wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine mit Coomassie Blue angefärbt. Nach Trypsin-Verdau von fünf ausgeschnittenen Banden wurden diese mittels ESI-Massenspektrometrie analysiert. Die mit Pfeil gekennzeichnete Bande enthält den ORF NCU05583.1. Der Molekulargewichtsmarker ist eingezeichnet. **B.** Aminosäuresequenz von NCU05593.1. Die massenspektrometrisch erhaltenen Peptide sind rot markiert. Die Außenmembranvesikel wurden freundlicherweise von Simone Schmidt zur Verfügung gestellt und nach Mayer *et al.* präpariert (Mayer *et al.*, 1995). **C.** Statistische Darstellung der Trefferwahrscheinlichkeit für NCU05593.1. Der Score entspricht  $-10 \cdot \log(P)$ , wobei P die Wahrscheinlichkeit ist, dass ein beobachteter Treffer ein zufälliges Ereignis ist. Scores größer als 74 sind signifikant ( $p < 0.05$ ).

## 2.2. YNL026w kodiert für das Hefe-Homolog von *N.c. Tob55*

Das Genom von *S. cerevisiae* wurde *in silico* nach einem zu *N.c. Tob55* homologen Protein durchsucht. Der offene Leserahmen YNL026w wies auf Protein-Ebene eine 23%-ige und auf DNA-Ebene 41%-ige Sequenzidentität zu NCU05593.1 auf. Dieser ORF ist auf Chromosom XIV lokalisiert und kodiert für ein Protein mit 484 Aminosäureresten und einer Masse von 54.4 kDa (Abb. 3). Da alle weiteren Experimente mit *S. cerevisiae* durchgeführt wurden, ist im Folgenden mit der Bezeichnung Tob55 immer das Protein aus *S. cerevisiae* gemeint.

```

 1  MTSSSGVDNE ISLDSPMPIF NESSTLKPIR VAGVVTTGTD HIDPSVLQAY LDDTIMKSIT
61  LGQLVKNADV LNKRLCQHHI ALNAKQSFHF QGNTYISDEK ETHDVVPLME VVSQLDILPP
121 KTFTAKTGTN FGNDNDAEAY LQFEKLIDKK YLKLPTRVNL EILRGTKIHS SFLENSYSSL
181 SPQSILNLKV FSQFYNWNTN KGLDIGORGA RLSLRYEPLF LHKLLHNPHS NESPTLFHEW
241 FLETCSRSTK ICSQTSAPY MYSGTMLSQA GDQLRTLGH TFVLDKRDHI MCPTKGSMLK
301 WSNELSPGKH LKTQLELNSV KSWMNDDFIT FSTTIKTGYL KNLSSQQSLP VHICDKFQSG
361 GPSDIRGFQT FGLGPRDLYD AVGGDAFVSY GLSVFSRLPW KKVEKSNFRL HWWFNGGKLV
421 NHDNTSLGNC IGQLSKEHST STGIGLVLRH PMARFELNFT LPITAHENDL IRKGFQFGLG
481 LAFL

```

**Abb. 3. Abgeleitete Primärsequenz von Tob55 aus *S. cerevisiae* (ORF YNL026w).**

Die *in silico* Analyse nach einem Hefe-Homologen von NCU05593.1 wurde mittels einer BLAST-Suche (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Genome/FungiBlast.html>) durchgeführt.

Eine Analyse der Primärsequenz von Tob55 auf Sekundärstrukturen ergab, dass die N-terminale Hälfte ein  $\alpha$ -helikales Segment enthält, während für die C-terminale Hälfte 17  $\beta$ -Faltblätter vorhergesagt wurden (Abb. 4). Da die putative  $\alpha$ -Helix mehrere Ladungen enthält, stellt diese wahrscheinlich keine Transmembrandomäne dar. Eine typische mitochondriale Präsequenz oder ein Stopp-Transfer-Signal, welches  $\alpha$ -helikal verankerte Außenmembranproteine enthalten, wurden nicht identifiziert (Rapaport, 2003). Dies lässt vermuten, dass Tob55 wahrscheinlich wie Porin und Tom40 mittels einer  $\beta$ -Barrel-Struktur aus 16  $\beta$ -Faltblättern in der Lipidschicht der Außenmembran integriert ist. Dabei sind jeweils zwei Faltblätter (rotes "E" in Abb. 4) durch einen  $\beta$ -Turn (blaues "t" in Abb. 4) verbunden. Dies würde auch die Lokalisierung in der mitochondrialen Außenmembran bestätigen, da  $\beta$ -Barrel-Proteine nur in dieser Organellenmembran vorkommen (Gabriel *et al.*, 2001).



```

MTSSSGVDNEISLDSMPPIFNESSTLKPPIRVAGVVTTGTDHIDPSVLQAYLDDTIMKSIT
CCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHCCCCEEEECCEEEECCCCCHHHHHHHCCCCCCCC
ttttttttt tttt tttt tttt

LGQLVKNADVLNKRLCQHIALNAKQSFHFQNTYISDEKETHDVVPLMEVVSQLDILPP
HHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCCEHEEEEEECCCCCCCCCCCCEEEEEECCCCC
tttttttttt tttt

KTFTAKTGTNFGNDNDAAEAYLQFEKLIDKKYLKLPTRVNLEILRGTKIHSSFLNFSYSSL
EEEEEECCCCCCEEEEEEHHHHHCCCHCCCCEEEEEECCCCEEEEEECECC
t ttttttttt tttt tttt tttt ttt

SPQSILNLKVFSQFYWNWTKGLDIGQRGARLSLRYEPLFLHKLHNPHSNESPTLFHEW
CCCCEEEEEECCCCCCHCCCCCCCCEEEEEECCCCCCHCCCCCCCCCCCCEHEH
ttttt tttt tttt tttt tttttttttttttttttttttt

FLETCSRSTKICISQGTSAPYMSGTMLSQAGDQLRTLGHFTVLDKRDHIMCPTKGSMLK
HHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCHHHHHCCCCEEEEEEEEEECCCCCCCCCCCCEEEE
tttttttttttttttt tttt ttttttttttt

WSNELSPGKHLKTQLELNSVKSWMNDDFITFSTTIKTGYLKNLSSQQSLPVHICDKFQSG
EECCCCCCCCEEEEEEEEEECCCCEEEEEEEEEECCCCCCCCEECCCCEECC
ttttt tttt tttttttttt tttt ttt

GPSDIRGFQTFGLGPRDLYDAVGGDAFVSYGLSVFSRPLWKKVEKSNFRLHWFVNGGKLV
CCCCEECCCCCCCCCCCCCCCCCHHHEHEEEEEECCCCCCCCEEEEEEHHHC
ttttt ttttttttttttttttt tttttttttt ttttn

NHDNTSLGNCIGQLSKEHSTSTGIGLVLRHMPARFELNFTLPITAHENDLIRKGFQFGLG
CCCCCCCCCCCCCCCCCHEEEEEEEEEECCEEEEEEEECCCCCCCCCCCCEEEEEEC
tttttttttttttttt tttt tttttttttt

LAFL
CECC

```

#### Abb. 4. Sekundärstrukturen von Tob55.

Sekundärstrukturen wurden mittels BetaTPred2 vorhergesagt (Kaur und Raghava, 2002). Die einzelne eindeutige  $\alpha$ -Helix ist unterstrichen; die  $\beta$ -Faltblätter sind rot,  $\beta$ -Turn-Aminosäurereste sind blau markiert. C, coiled-coil-Struktur; H, Helix-Struktur; E,  $\beta$ -Faltblatt.

### 2.3. Tob55 ist in allen eukaryotischen Genomen konserviert

Eine weitere Homologiesuche mit der Tob55-Proteinsequenz gegen alle zugänglichen Sequenzen ergab, dass dieses Protein in allen eukaryotischen Genomen konserviert ist. Die Homologie ist vor allem im C-terminalen Drittel auffällig, was auf eine wichtige Funktion dieses Bereiches hinweist. In Abbildung 5 ist ein Sequenzvergleich einiger eukaryotischer homologer Proteine dargestellt. Die berechnete Identität zwischen diesen Proteinen basierend auf den Aminosäuresequenzen lag bei etwa 43%. Wie auch Tob55 sind die eukaryotischen Homologen bisher nicht weiter charakterisiert worden. Auffällig sind mehrere kurze Sequenzabschnitte, die hochkonserviert in allen Organismen vorkommen. In den anderen Bereichen, auch im C-terminalen Abschnitt, ist dagegen die Übereinstimmung der Sequenzen untereinander relativ gering. Das humane Homolog von Tob55, CGI-51, wurde in einem proteomischen Ansatz zur Identifizierung des menschlichen Proteoms von Mitochondrien aus Herzmuskelzellen identifiziert (Taylor *et al.*, 2003b). Kamath *et al.* identifizierten in einer funktionellen Analyse des *Caenorhabditis elegans* Genoms mittels RNAi das zu Tob55 homologe Protein COP-3 (Kamath *et al.*, 2003). Das Homologe der Maus konnte mittels eines FLAG-Epitops in Mitochondrien lokalisiert werden, wurde aber der mitochondrialen Innenmembran zugeordnet (Da Cruz *et al.*, 2003).

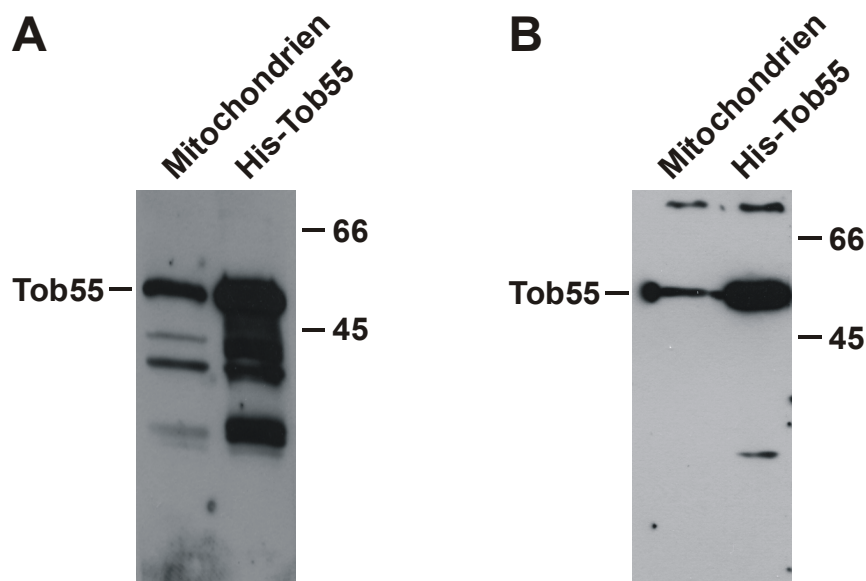
#### Abb. 5. Multipler Sequenzvergleich von Tob55-homologen Proteinen.

Partielle und vollständige Konservierung der Aminosäurereste sind durch farbige Markierungen gekennzeichnet (100% blau; >75% grün; >50% orange). Nc, *Neurospora crassa* (NCU05593.1); Sc, *Saccharomyces cerevisiae* (YNL026w); Sp, *Saccharomyces pombe* (NP\_594600); Ce, *Caenorhabditis elegans* (GOP-3); Dm, *Drosophila melanogaster* (CG7639); Hs, *Homo sapiens* (CGI-51).

Nc	MASSPSAPGNPVEAA TAKIDKAAAI VHQKAAAVVTEPK E P Q P Y Q V P N P I I E D H L L T P A T V N S I E I H G A N N	70
Sc	MTSSSGVDNE ISLDS PMPIFN E SST L K P I R V A G V V T T G T D H I D P S V L Q A Y L D D	53
Sp	MTEQFESTSFPSPDIPAVNEESKLSAEETFKSLSEILAENSTLPVGI	46
Ce	MSEKTFHKAQTIRAKAS	17
Dm	MPKSGRDGGASKDSKYDLS	19
Mm	MGTVHARSL E PLPSSGTFDFGALGEEAEFVEVEPEAKQEILE	41
Hs	MGTVHARSL E PLPSSGDFGGLGEEAEFVEVEPEAKQEILE	41
Nc	TRRGL LDH V F K P V V E E T A S P T T T L G E A L A R I S T A T Q K L T R F G I F K E D G E F G V F I S D A R Q Q Q Q E F Q S P . . T	138
Sc	TIMKS I T L G Q L V K N A D V L N K R L C Q H H I A L N A K Q S F H F Q G N T Y I S D E K E T H D V V P L M E V V S Q L D I L P P K T F	123
Sp	SSIRVTGAHHTRPSPFIRKVLKTKCLDTSKPAKSRSLLETLNAIQETTGNLMAFNVYETANIKIDRASSSVS	116
Ce	GVPSI V E A V Q F H G V R I T K N D A L V K E V S E L Y R S K N L D E L V H N S H L A A R H L Q E V G L M D N A V A L I D T S P S . . .	84
Dm	KISARVDRVNVSGLLRTHNDYVMRAADGLFKASNFQDLMLEAMSTKSYLHELGI FKDVSVHIDVSRGADA	89
Mm	NKDVVQHVFHFDGLGRTKDDIIICEIGEVFKAKNLEVMRRSHEAREKLLRLGI FROVDVLIDTCHGEDA	111
Hs	NKDVVQHVFHFDGLGRTKDDIIICEIGDVFKAKNLEVMRKSHEAREKLLRLGI FROVDVLIDTCQGDDA	111
Nc	DRT E L D V S I R V K E . Q S R I L V F K A G T D F G N A E G S A Y T N A V L R N I F G G A E T L S V N A A A G T R T R S A Y N A V E S T F	207
Sc	TAKTGTFNGDNDAEAYLQFEKLDKYLKLPTRVNLEILRGTKIHSSFLFNSYSSLS PQS I L N L K V F S Q	193
Sp	GDD D L D V T I Q V K E . K P R I Y V E T G T D V G N V E G N V H A N V L A R N V F G G A E L L S G N V S Y G T R N R S T M S V N E T F	185
Ce	SNEGYYVNHFLVREPKSFTAGVKAGVSTNGDADVSLNAGKQSVGGRGEAINTQYTYTVKGDHCFNISAIKP	154
Dm	SPQGYEVTFKGNE.MSRMMGSAGTEIGQNEGLRTELTIPIILGRGENISLOGSYSSTRANDLQKFWPK	158
Mm	LPNGLDVTFEVTE.LRRITGSYNTMVGNNEGSMVLGLKLPNLLGRAEKVTFQFSYG.TKETSYGLSFFKP	179
Hs	LPNGLDVTFEVTE.LRRITGSYNTMVGNNEGSMVLGLKLPNLLGRAEKVTFQFSYG.TKETSYGLSFFKP	179
Nc	VN G N . . . P D . I R L A L E A L R S S T H K P W A S H D E H L T C G N L R L A W S T D N . . G D D H A L T Y S G V W R Q L T G L S A S A	271
Sc	FYNWNTNKG.LDIGORGARLSLRYEPLFLHKLHNPHSNESPTLFHEWFLETWCWRS TKICSQGTSA PYMY	262
Sp	VNADPKTRLR...FNGHSNLRDNKSISSHDLTKGITLSLQHQLWS..GEHLLSQNLLWVQVTHITEYA	250
Ce	FLGWQKYSN...VSATLYRSLAHMPWNQSDVDENAAVLAYNGQLWN.QKLLHQVKLNAIWRTRAT.RDA	219
Dm	FFHTRFKENRPEMSFSIFRQTDRFDISSFQTTNIGYLVDFS AHTMVGVDLT HSLQYENAIRDVG L L N K S V	228
Mm	QPCN.FERN...FSVNLYKVTGQFPWS SLRETDRGVSAEYSFPLWK...TSHTVKWEGVWEELGCLSRTA	242
Hs	RPCN.FERN...FSVNLYKVTGQFPWS SLRETDRGMSAEYSFPIWK...TSHTVKWEGVWEELGCLSRTA	242
Nc	S P T V R A D A G D S L K S S I T H T F T R D R R D N P M L P Q A G Y L V R T A A E L A G W G P L K G D V S F A K S E V E L S A A Q A I P L	341
Sc	SGTMLSQAGDQLRTILGHTFVLDKRDHIMCPTKGSMLKWSNELSP.....GKHLKTQLELNSVKSWMN	325
Sp	SPSVRLEAGDSLKQSLSYTYTRDTRDHLMIPTKGDYVRQTLELAGFGFLPGDASFLKSEFWGQKAVALNS	320
Ce	AFSVREQAGHTLKFSLNAVAVDTRDRPILASRGILARFAQYAG...VFGDASFVKNTLDLQAAA PL PL	286
Dm	PFATR DHCGPKLASLRYSVVYDNRDGNVFPTRGIYLSKVNEYCG...LGGNVAYTSSTAHGE LNVPLFA	295
Mm	SEAVRKESCHSLKSSLSHAMVIDSRNSSILPRRGALFKVNQELAGY..TGGDVSFIKEDDFELQLNKPLAL	310
Hs	SEAVRKESCHSLKSSLSHAMVIDSRNSSILPRRGALLKVNQELAGY..TGGDVSFIKEDDFELQLNKQLIF	310
Nc	P G V S V G . A G F R A G L L Y P L P M G Y S L S T S V A P S R I N D R F Q L G G P T D V R G F S M G G L G P H D G A D S V G D V F A A	410
Sc	DDFITFSTTIKTGYLKNLSSQQ.....SLPVHICDKFQSGGFSDIRGFQTFGLGPRDLYDAGGDAFVS	389
Sp	SRSVSLSLARIGALHSLN.....KKQVSLCDRFMLGGSTSLRGFSEDRI GPKDGRD S I G T A Y M A	381
Ce	GFTLA..ASFQAKHLKGLG.....DREVHILDRCYLGGQDVRGFGLNTIGVKADNSCLGGASLA	345
Dm	GLVAQ..FCARVGVVKE TKN.....TTQLPISSLFYCGGFLTLRGFKFGGAGPVVESTPIGAQSFWC	355
Mm	DSVFS..TSLWGGMLVPIG.....DKPSSIADR FYLGGPTSVRGFSMHSTIGPQSEGYLGEAYWA	369
Hs	DSVFS..ASFWGGMLVPIG.....DKPSSIADR FYLGGPTSVIRGFSMHSTIGPQSEGYLGEAYLG	369
Nc	G S V N M L L E L E R A G P T S P L R F Q L F A N G G R L V A L Q G K K T A E G S V S L D S G A V A S G M K S A V A E L A N G L P S I A A G	480
Sc	YGLSVFSRLPWKKVEK..SNFRLHWF FNGGK.....LVNHDNTSLGNCIGQLSKEHSTSTG	443
Sp	FSMSLLFFLRKVDASKPFRQLQFANAGLSN.....LTSNP...CGTYKSI LSKPCISTG	434
Ce	GVVHLYRFLIPPN.....MLFAHAF LASGS.....VASVHS...KNLVQQLQDTQRVSA GF	393
Dm	TGAHLWALP F A G V F K N L A S H F R M H F F Y N I G . . . . . N N N S . . . . . F S T E N M R S A F C M	402
Mm	GGLHL Y T P L P F R P G Q G G F G E L F R T H F F L N A G N . . . . . L C N L N Y G E G P K A H I R K L A E C I R W S Y G A	428
Hs	RRWHL Y T P L P F R P G Q G G F G E L F R T H F F L N A G N . . . . . L C N L N Y G E G P K A H I R K L A E C I R W S Y G A	428
Nc	F G L V Y A H P V A R F E L N F S L P L V V R R C E E A R K G L Q V G V G I N F L	521
Sc	IGLVL RHPM A R F E L N F T L P I T A H E N D L I R K G F Q F G L G L A F L	484
Sp	L G L V Y A T P A A R F E L N F T L P I A T T E K D I G R K G L Q F G A G I D F M	475
Ce	G L A F V F K S I F R L E L N Y T Y P L K Y V L G D S I L G G F H I G A G V N F L	434
Dm	G L A V K L A E R A R I E L N Y C V P V R H Q D T D R I L N G F Q F G I G Y E F V	443
Mm	G V V I R L G N I A R L E L N Y C I P M G V Q G G D R I C D G V Q F G A G I R F L	469
Hs	G I V I R L G N I A R L E L N Y C V P M G V Q T G D R I C D G V Q F G A G I R F L	469

## 2.4. Antikörper gegen Tob55

Um Tob55 näher zu untersuchen, wurden verschiedene polyklonale Antikörper gegen das Protein hergestellt. Hierzu wurde Tob55 mit einem C-terminalen Hexahistidyl-Tag (His<sub>8</sub>-Tag) in *E. coli* Zellen exprimiert und gereinigt. Das rekombinante Protein wurde zur Immunisierung von Kaninchen verwendet ( $\alpha$ Tob55; Tier #332). Zusätzlich wurde als Antigen ein Peptid verwendet, das den N-terminalen 15 Aminosäurereste von Tob55 entspricht ( $\alpha$ Tob55-N). Das gewonnene Peptid-Antiserum musste mittels Antigen-Affinitätschromatographie aufgereinigt werden, da es viele Kreuzreaktionen zeigte. Hierzu wurde das N-terminale Peptid kovalent an eine Matrix gekoppelt. In Abbildung 6 ist beispielhaft die Western Blot-Analyse von Mitochondrien und rekombinantem Tob55 mittels Serum und affinitätsgereinigtem Antikörper des 160. Immunisierungstages gezeigt. Das Peptid-Antiserum erkannte in beiden Fällen eine Bande mit einer apparenten Masse von etwa 55 kDa (Abb. 6A). Die Kreuzreaktionen des Antiserums waren nach Affinitätsreinigung nicht mehr vorhanden (Abb. 6B).

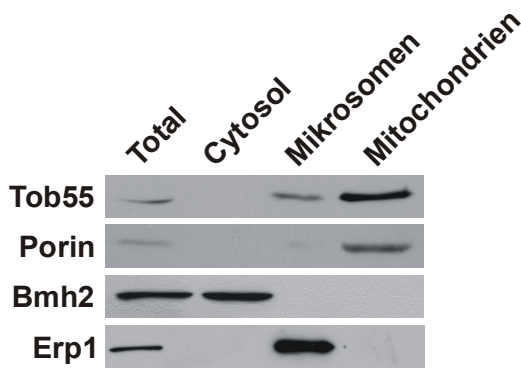


**Abb. 6. Analyse eines Antikörpers gegen den N-Terminus von Tob55.**

**A.** Test des Peptid-Antiserums. 50  $\mu$ g WT-Mitochondrien und 2  $\mu$ g rekombinantes His-Tob55-Protein (mit C-terminalen His<sub>8</sub>-Tag) wurden mittels SDS-PAGE und Immunodekoration mit einer 1:250 Verdünnung des N-terminalen Peptid-Antiserums (160. Immunisierungstag, Tier 2/1) in 5% (w/v) Milchpulver/TBS analysiert. Molekulargewichtsmarker (in kDa) sind eingezeichnet. **B.** Analyse mit gereinigtem Antikörper wie A.

## 2.5. Tob55 ist in Mitochondrien lokalisiert

Um die intrazelluläre Lokalisierung von Tob55 biochemisch zu bestimmen, wurde eine subzelluläre Fraktionierung von Hefezellen in Cytosol, Mikrosomen und Mitochondrien durchgeführt. Die Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot gegen verschiedene Markerproteine (Cytosol: Bmh2, Mikrosomen: Erp1, Mitochondrien: Porin) analysiert. Der Tob55-Antikörper erkannte in den Zellextrakten eine spezifische Bande von 55 kDa. Diese war wie Porin in der mitochondrialen Fraktion angereichert (Abb. 7).



**Abb. 7. Tob55 ist ein mitochondriales Protein.**

Subzelluläre Fraktionierung von Hefezellen (D273-10B). Jeweils 50 µg Protein der subzellulären Fraktionen sowie eines Gesamtextraktes (Total) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Western Blot analysiert. Als Marker wurden Porin (Mitochondrien), Bmh2 (Cytosol) und Erp1 (Mikrosomen) verwendet.

## 2.6. Tob55 ist ein integrales Außenmembranprotein

Da das *N.c.* Tob55-Protein durch Analyse von mitochondrialen Außenmembranvesikeln identifiziert wurde, sollte sich auch das Hefe-Homolog in der Außenmembran befinden. Um dies zu prüfen und um Informationen über die Topologie von Tob55 zu erhalten, wurden Hefemitochondrien mit hypotonem Medium inkubiert um Mitoplasten (MP) zu erzeugen. In diesen ist die Außenmembran disruptiert, während die Innenmembran intakt erhalten bleibt. Mitochondrien und Mitoplasten wurden mit den Proteasen Trypsin (T) und Proteinase K (PK) inkubiert und anschließend durch Immunoblotting analysiert (Abb. 8A). Tob55 war in intakten Mitochondrien gegen die Behandlung mit geringen Konzentrationen von Trypsin resistent, während bei höherer Konzentration mehrere Fragmente entstanden (Abb. 8A&B). Bei Verwendung von PK wurde bereits bei geringen Konzentrationen ein proteaseresistentes N-terminales Fragment von 30 kDa (f) generiert (Abb. 8A-C). Wurden dagegen Mitoplasten mit PK oder Trypsin behandelt, war kein Signal mehr mit einem Tob55-Antikörper detektierbar

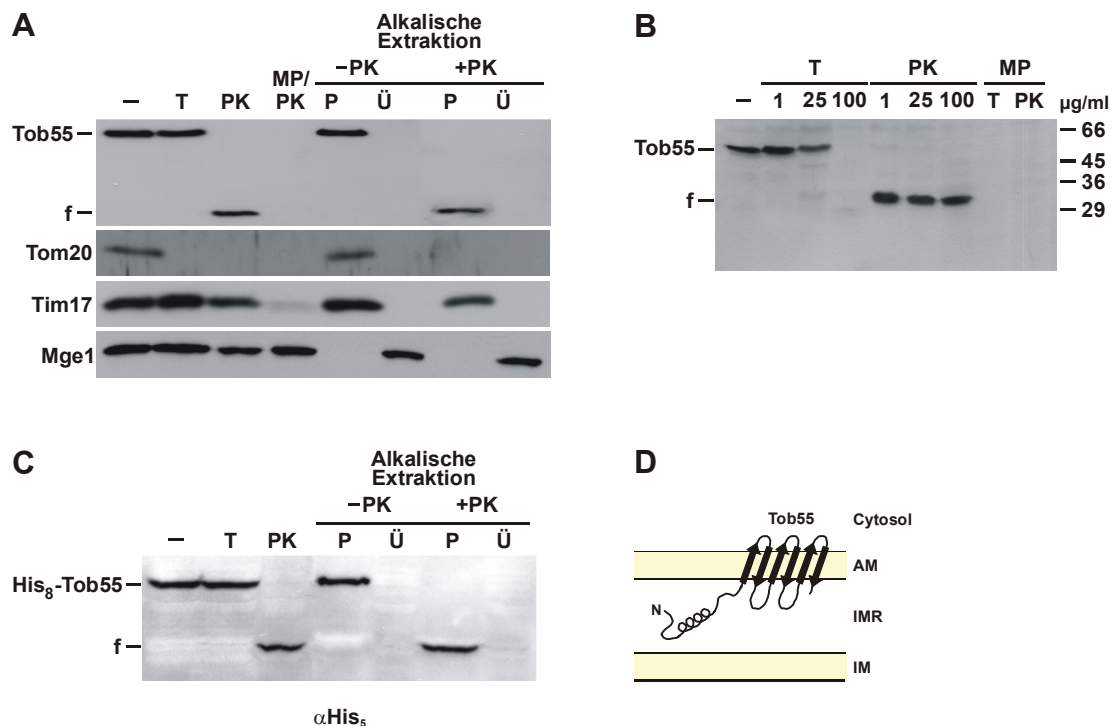
(Abb. 8A&B). Tob55 ist somit in der Außenmembran der Mitochondrien lokalisiert. Dies wurde durch die Analyse von Markerproteinen der verschiedenen mitochondrialen Kompartimente bestätigt. Das integrale Außenmembranprotein Tom20 wurde bereits bei Behandlung von intakten Mitochondrien von beiden Proteasen abverdaut (Abb. 8A). Die Außenmembran der Mitochondrien blieb bei Proteaseverdau intakt, da sowohl das Innenmembranprotein Tim17 als auch das Matrixprotein Mge1 vor Proteaseverdau geschützt waren (Abb. 8A). Bei Inkubation von Mitoplasten mit PK wurde Tim17 verdaut, während Mge1 durch die intakte Innenmembran weiterhin vor Abbau geschützt war (Abb. 8A).

Um die Membranintegration von Tob55 zu bestätigen, wurden Mitochondrien mit alkalischer Lösung behandelt (Fujiki *et al.*, 1982). Mit diesem Verfahren werden peripher assoziierte oder lösliche Proteine von Membranen abgelöst, während integrale Membranproteine trotz Denaturierung in der Membran verankert bleiben. Da die Membranfraktion durch Zentrifugation pelletiert werden kann, lassen sich Membranproteine von löslichen oder peripher assoziierten Proteinen abtrennen. Die Membranproteine Tom20 und Tim17 befanden sich erwartungsgemäß in der Pelletfraktion, während das lösliche Matrixprotein Mge1 im Überstand verblieb (Abb. 8A). Tob55 war resistent gegen alkalische Extraktion und befand sich in der Pelletfraktion (Abb. 8A), wodurch es als integrales Membranprotein ausgewiesen wurde. Interessanterweise erwies sich das N-terminale PK-Fragment von Tob55 ebenfalls als membranintegriert (Abb. 8A&C).

Zur weiteren Analyse der Topologie von Tob55 wurden Mitochondrien eines Hefestammes verwendet, der ein Tob55-Protein mit einem N-terminalen His<sub>8</sub>-Tag exprimiert (Kap. 2.8). Dieses Protein (His<sub>8</sub>-Tob55) kann spezifisch mit einem monoklonalen Antikörper gegen den His-Tag nachgewiesen werden (Abb. 8C;  $\alpha$ His5). Auch His<sub>8</sub>-Tob55 war gegen Trypsin-Verdau von Mitochondrien resistent und wurde von PK zu einem membranintegrierten 30 kDa-Fragment abgebaut (Abb. 8C). Da sowohl der authentische N-Terminus als auch der rekombinante N-terminale His<sub>8</sub>-Tag in intakten Mitochondrien nicht für Proteasen zugänglich waren, zeigt dies, dass der Aminoterminus von Tob55 im Intermembranraum lokalisiert ist.

Diese Analysen zusammen mit den Sekundärstrukturvorhersagen sind mit der in Abbildung 8D dargestellten Topologie von Tob55 konsistent. Die N-terminale Domäne, die keine vorhergesagten  $\beta$ -Faltblätter enthält, ist vermutlich in den Intermembranraum exponiert,

während der C-terminale Bereich mittels einer  $\beta$ -Barrel-Struktur in der Außenmembran inseriert ist. Die auf der Außenseite exponierten Schleifen sind offensichtlich für Trypsin in höheren Konzentrationen zugänglich, während PK nur in der C-terminalen Hälfte Zugang findet. Die Lokalisierung des C-Terminus lässt sich aus diesen Ergebnissen nicht ableiten.



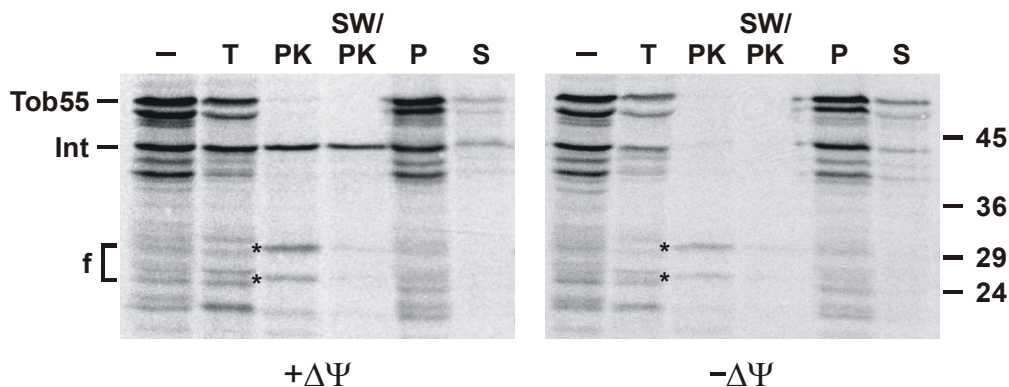
**Abb. 8. Tob55 ist ein integrales Außenmembranprotein mit dem N-Terminus im Intermembranraum.**

**A.** Submitochondriale Lokalisierung von Tob55. Je 100 µg intakte Mitochondrien und Mitoplasten (MP) wurden mit 10 µg/ml Trypsin (T) oder 50 µg/ml Proteinase K (PK) für 20 min auf Eis inkubiert. Zusätzlich wurden Mitochondrien mit 0.1 M Natriumcarbonat (pH 11.5) behandelt und durch Zentrifugation in eine Pelletfraktion (P) und eine Überstandsfraktion (Ü) aufgetrennt. Proteine aus der Überstandsfraktion wurden mit 12% Trichloressigsäure gefällt. Alle Proben wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot analysiert. Für Tob55 wurde der N-terminale Peptid-Antikörper verwendet. f, membranintegriertes 30 kDa Fragment von Tob55 nach PK-Behandlung von intakten Mitochondrien. **B.** Titration von Mitochondrien mit verschiedenen Konzentrationen von Trypsin und PK. Mitoplasten wurden mit je 10 µg/ml Trypsin und PK behandelt. **C.** Analyse von isolierten Mitochondrien aus Tob55(Gal10)-Zellen (siehe Kap. 2.8), der ein N-terminal His<sub>8</sub>-getaggetes Tob55 exprimiert, wie in A. beschrieben. Zur Detektion wurde ein Penta-His-Antikörper ( $\alpha$ His<sub>5</sub>) verwendet. **D.** Modell der Topologie von Tob55. N, N-Terminus; AM, Außenmembran; IMR, Intermembranraum; IM, Innenmembran.

## 2.7. Import von Tob55 in isolierte Mitochondrien

Tob55 wurde *in vitro* posttranslational in isolierte Hefe-Mitochondrien importiert. Hierzu wurde das Protein zellfrei in einem gekoppelten Transkriptions-/Translationssystem in Anwesenheit von [<sup>35</sup>S]Methionin synthetisiert. Das radioaktiv markierte Tob55-Protein wurde anschließend mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Nicht importiertes Protein wurde durch Behandlung mit PK und Trypsin entfernt. Ein Teil der Mitochondrien wurde hypoton geschwollen, um Mitoplasten zu erzeugen, die ebenfalls mit Protease behandelt wurden. Das radioaktiv markierte und importierte Tob55-Vorstufenprotein wies ebenso wie das endogene Tob55 eine apparente molekulare Masse von etwa 55 kDa auf (Abb. 9). Wie zu erwarten wurde Tob55 nach dem Import nicht prozessiert, da es keine spaltbare mitochondriale Präsequenz enthält. Gegen geringe Konzentration von Trypsin war das importierte Vorstufenprotein resistent, während Inkubation mit PK zur Bildung zweier membranintegrierter Fragmente (f) von etwa 30 und 25 kDa Größe führte und somit die Insertion in der Außenmembran bestätigte (Abb. 9). Das 30 kDa Fragment stellt wahrscheinlich das gleiche N-terminale Fragment dar, welches nach PK-Behandlung des endogenen Tob55-Proteins entsteht. Dies würde bestätigen, dass Inkubation mit PK zur Spaltung von Tob55 in zwei Hälften führt. Nach PK-Behandlung von Mitoplasten (SW/PK) wurde das importierte Vorstufenprotein vollständig abgebaut (Abb. 9). Wie auch das endogene Tob55-Protein, befand sich das importierte Vorstufenprotein nach alkalischer Extraktion fast vollständig in der Membranfraktion (Abb. 9). Tob55 ließ sich auch in Mitochondrien importieren, deren Membranpotential zuvor zerstört wurde, da für den Import in die mitochondriale Außenmembran kein Membranpotential benötigt wird (Abb. 9,  $-\Delta\Psi$ ). Bei *in vitro* Synthese von Proteinen werden auch interne Methioninreste als Startkodon akzeptiert, so dass N-terminal verkürzte Varianten entstehen. Im Falle von Tob55 entsteht ein N-terminal verkürztes Protein von etwa 42 kDa. Dieses Fragment wird ebenfalls in Mitochondrien importiert. Der Import war jedoch abhängig von Membranpotential und das importierte Fragment war gegen Protease-Behandlung von Mitoplasten resistent (Abb. 9,  $-\Delta\Psi$ ). Dies deutet darauf hin, dass das artifizielle Fragment über die Innenmembran in die Matrix importiert wurde. Es muß demnach ein entsprechendes Importsignal enthalten.





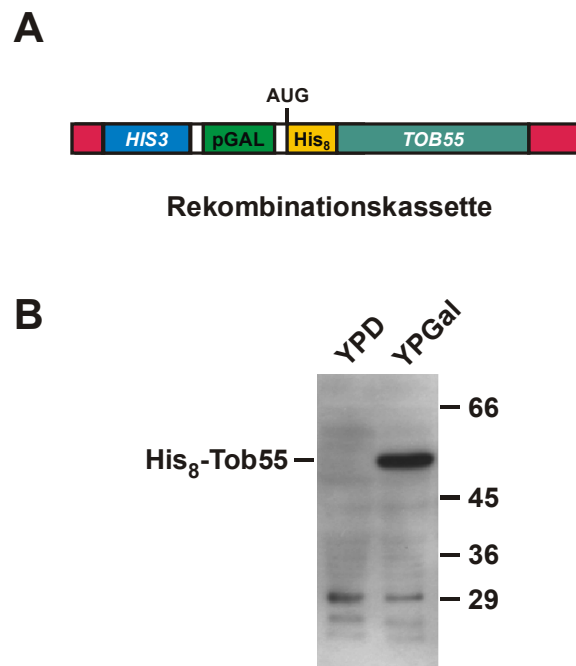
**Abb. 9. *In vitro* Import von Tob55.**

Mit [<sup>35</sup>S]Methionin markiertes Tob55 wurde für 15 min bei 25°C in isolierte Mitochondrien in Anwesenheit (+ΔΨ) oder Abwesenheit (-ΔΨ; Zugabe von 1 μM Valinomycin und 25 μM FCCP) eines Membranpotentials importiert. Danach wurden die reisolierten Mitochondrien sowie Mitoplasten (SW) mit 1 μg/ml Trypsin bzw. 50 μg/ml PK behandelt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Zusätzlich wurden Mitochondrien alkalisch behandelt. P, Pellet; Ü, Überstand; f, membranintegrierte PK-Fragmente (\*) von Tob55 in intakten Mitochondrien; Int, durch internen Startpunkt N-terminal verkürztes Tob55.

## 2.8. Tob55 ist essenziell für *S. cerevisiae*

Um einen Hinweis auf die Funktion von Tob55 zu erhalten, wurde überprüft, ob das *TOB55*-Gen für Hefezellen essenziell ist. Zur Regulierung der Tob55-Expression wurde der endogene chromosomale Promotor mittels homologer Rekombination durch den Galactose-induzierbaren GAL10-Promotor ersetzt. Dazu erfolgte eine Transformation des haploiden Hefestammes YPH499 mit einer Rekombinationskassette, die gleichzeitig einen His<sub>8</sub>-Tag an den N-Terminus von Tob55 anfügt (Abb. 10A) (Lafontaine und Tollervey, 1996; Sikorski und Hieter, 1989). Positive Klone wurden durch Selektion auf die Histidin-Prototrophie der Rekombinationskassette identifiziert. Die korrekte Integration der Rekombinationskassette wurde mittels PCR-Analyse genomischer DNA nachgewiesen (Daten nicht gezeigt). Der Stamm wurde als Tob55(Gal10) bezeichnet. Dieser wurde zunächst in Galactose-haltigem Medium angezogen und anschließend für 16 h in Glucose-haltiges Medium überführt, um die GAL10-abhängige Expression von Tob55 zu reprimieren. Die Expression von His<sub>8</sub>-Tob55

wurde mittels SDS-PAGE und Immunoblotting mit Anti-His-Antikörpern analysiert. Wie in Abbildung 10B gezeigt, konnte Tob55 unter Galactose-Kontrolle exprimiert werden. Ein Vergleich mit isolierten WT-Mitochondrien zeigte, dass Tob55 unter der Kontrolle des GAL10-Promotors etwa dreifach überexprimiert wird (Daten nicht gezeigt).

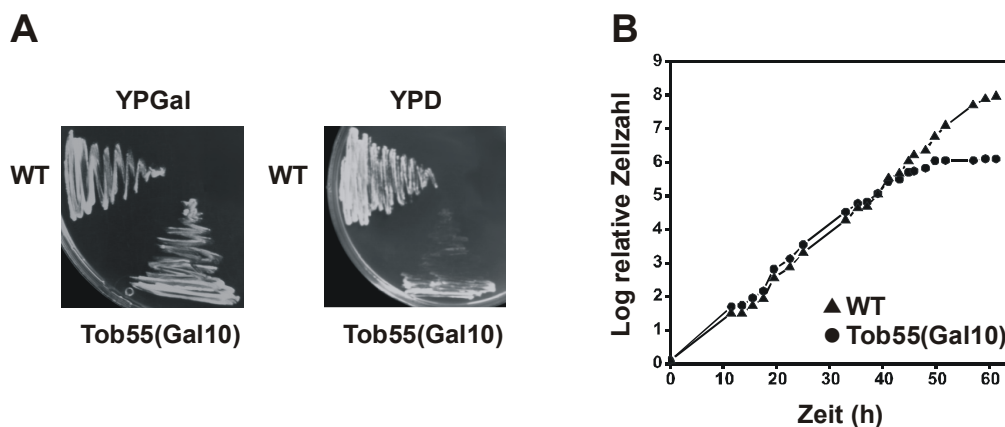


**Abb. 10. Galactose-induzierte Expression von His<sub>8</sub>-Tob55 von Tob55(Gal10).**

**A.** Schematische Darstellung der Tob55(Gal10)-Rekombinationskassette. Einzelheiten siehe Text und Kapitel 5.2.4. AUG, Startcodon; *HIS3*, Markergen für die Histidin-Biosynthese; pGAL, GAL10-Promotor; His<sub>8</sub>, oktamerer His-Tag. **B.** Nach Anzucht eines selektionierten Klons in YPGal-Medium wurde dieser für 16 h in YPD- oder YPGal-Medium kultiviert. Die Zellen wurden geerntet und mittels alkalischer Lyse ein Gesamtzellextrakt gewonnen (Kushnirov, 2000). Je 0.5 OD-Einheiten wurde mittels SDS-PAGE aufgetrennt und die Expression von His<sub>8</sub>-Tob55 über einen monoklonalen Penta-His-Antikörper aus Maus (1:1000 in 5% (w/v) BSA/TBS; Quiagen) nachgewiesen.

Um das Wachstumsverhalten von Tob55(Gal10) zu untersuchen, wurde dieser sowie der parentale YPH499-Stamm auf je einer Galactose- oder Glucose-haltigen Inkubationsplatte ausgestrichen. Beide Stämme wuchsen auf dem Galactose-haltigem Medium ohne Unterschied (Abb. 11A). Somit konnte davon ausgegangen werden, dass der N-terminale His<sub>8</sub>-Tag sowie die leichte Überexpression von Tob55 keinen negativen Einfluss auf das

Wachstum der Tob55(Gal10)-Zellen besaß. Tob55(Gal10) konnte jedoch auf Glucose-haltigem Medium nicht wachsen (Abb. 11A). Dies deutete auf eine essenzielle Funktion von Tob55 hin. Zur genaueren Charakterisierung dieses Phänotyps wurde eine Wachstumskurve erstellt. Hierzu wurden beide Stämme in Galactose-haltigem Medium angezogen und zum Zeitpunkt Null in Galactose-freies Medium überführt. Das Wachstum der Stämme wurde anschließend über die Zunahme der Zelldichte photometrisch verfolgt. Das Wachstum von Tob55(Gal10) verlangsamte sich nach 40 h und hörte nach 45 h vollständig auf (Abb. 11B). Der Wildtyp (WT) wuchs dagegen exponentiell weiter. Somit ist *TOB55* ein essenzielles Gen für das Zellwachstum von *S. cerevisiae*. Neben Tom40, das die Translokationspore des TOM-Komplexes bildet, ist Tob55 das zweite essenzielle Außenmembranprotein (Baker *et al.*, 1990).



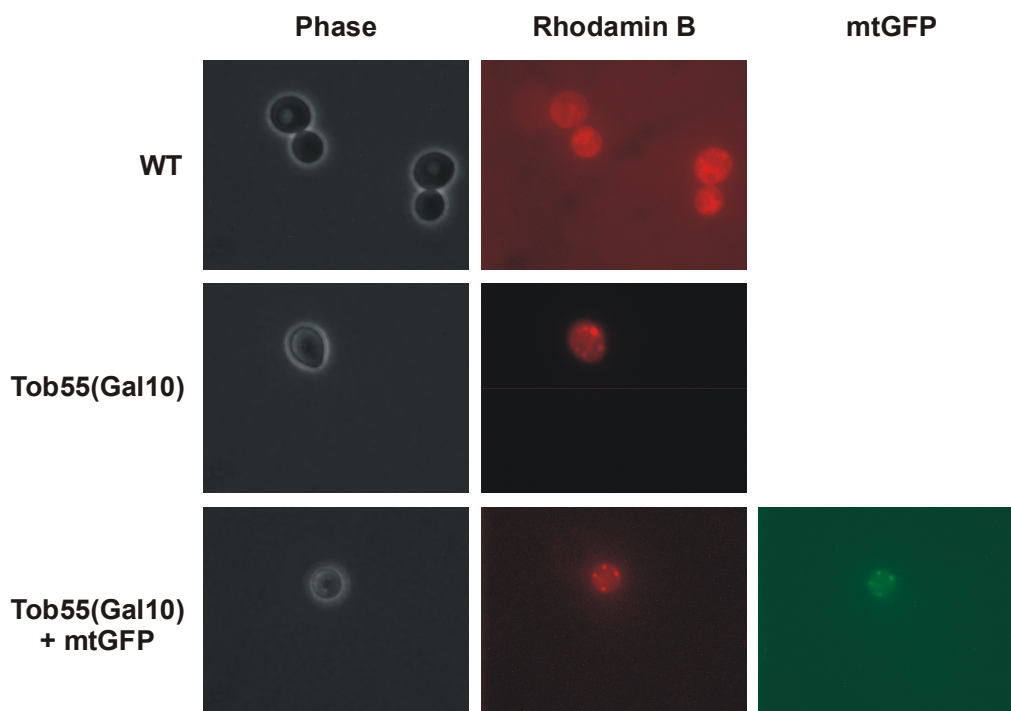
**Abb. 11. Tob55 ist essenziell für das Wachstum von *S. cerevisiae*.**

**A.** WT- und Tob55(Gal10)-Zellen wurden auf YPGal- oder YPD-Inkubationsplatten ausgestrichen und diese für 48 h inkubiert. **B.** Wachstumskurve von Tob55(Gal10). WT- und Tob55(Gal10)-Zellen wurden zum Zeitpunkt 0 von Galactose- in Glucose-haltiges Laktat-Medium überführt und die Zellzahl mittels OD Messung verfolgt. Die Zellen wurden in exponentiellem Wachstum gehalten. Zum Zeitpunkt 0 h wurde die Zellzahl gleich 1 gesetzt.

## 2.9. Depletion von Tob55 führt zu aggregierten Mitochondrien

Um die Funktion von Tob55 zu charakterisieren, wurde die Auswirkung der Depletion von Tob55 auf die mitochondriale Morphologie untersucht. Hierzu wurden die Mitochondrien mit

dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin B-hexylester angefärbt, der Membranpotential-abhängig von diesen aufgenommen wird. Um Mitochondrien unabhängig von Membranpotential nachweisen zu können, wurde zusätzlich ein mitochondriallokalisierendes grünfluoreszierendes Protein (mtGFP) in Tob55(Gal10) exprimiert (Tob55(Gal10+mtGFP)) (Westermann und Neupert, 2000). Die Zellen wurden mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Der Wildtyp wies das typische mitochondriale tubuläre Netzwerk auf (Abb. 12) (Frey und Mannella, 2000). Nach Depletion von Tob55 wurde sowohl mittels Rhodamin-Färbung als auch mittels GFP-Fluoreszenz eine Aggregation der Mitochondrien beobachtet (Abb. 12). Ob die Aggregation der Mitochondrien ein direkter Effekt des Ausfalls der Tob55-Funktion oder eine indirekte Auswirkung ist, lässt sich nicht beurteilen. Die essenzielle Funktion von Tob55 für Mitochondrien wird dadurch jedoch bestätigt.

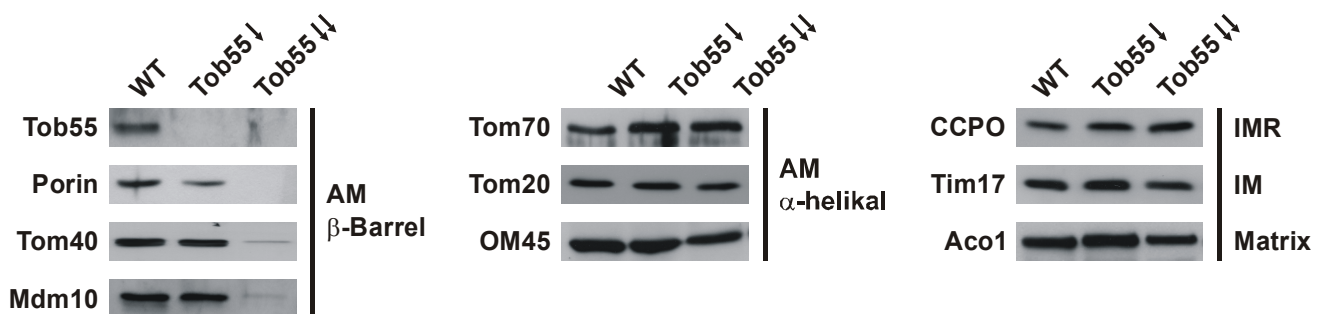


**Abb. 12. Mitochondriale Morphologie nach Tob55-Depletion.**

Tob55(Gal10), Tob55(Gal10+mtGFP) sowie der isogene YPH499-Wildtyp (WT) wurden für 24 h in YPD-Medium kultiviert, um die Expression von Tob55 zu reprimieren. Die Zellen wurden mittels Anfärbung der Mitochondrien mit Rhodamin B-hexylester und Fluoreszenzmikroskopie analysiert. Phase, Phasenkontrastaufnahme; mtGFP, mitochondriales GFP.

## 2.10. Tob55-depletierte Mitochondrien enthalten keine $\beta$ -Barrel-Proteine

Um die Ursache für die Letalität des *TOB55*-Gens zu bestimmen, wurden die Expression verschiedener mitochondrialer Proteine in Tob55-depletierten Mitochondrien mittels Immunoblot analysiert. Dazu wurden Tob55(Gal10) in Abwesenheit von Galactose kultiviert und nach 43 h (Tob55 $\downarrow$ ) und 47 h (Tob55 $\downarrow\downarrow$ ) Mitochondrien isoliert. Tob55 war zu beiden Zeitpunkten nicht mehr nachweisbar (Abb. 13). Wie im Vergleich zu WT-Mitochondrien ersichtbar ist, führte die Depletion von Tob55 zu einem selektiven Verlust der  $\beta$ -Barrel-Außenmembranproteine Porin und Tom40. Beide Proteine waren nach 43 h Tob55-Depletion reduziert und nach 47 h praktisch nicht mehr nachweisbar (Abb. 13). Nach dem gleichen Muster war auch die Expression des Außenmembranproteins Mdm10 verringert. Wie im späteren Verlauf der Arbeit gezeigt wird, handelt es sich bei Mdm10 ebenfalls um ein  $\beta$ -Barrel-Protein der Außenmembran (Kap. 2.18). Im Gegensatz dazu war die Expression von  $\alpha$ -helikal verankerten Außenmembranproteinen wie Tom70, Tom20 und OM45 in den Tob55-depletierten Mitochondrien nicht verändert (Abb. 13). Ebenso blieben Proteine des Intermembranraums (CCPO), der Innenmembran (Tim17) und der Matrix (Aconitase) unbeeinflusst (Abb. 13).



**Abb. 13. Tob55 ist für die Biogenese von  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen essenziell.**

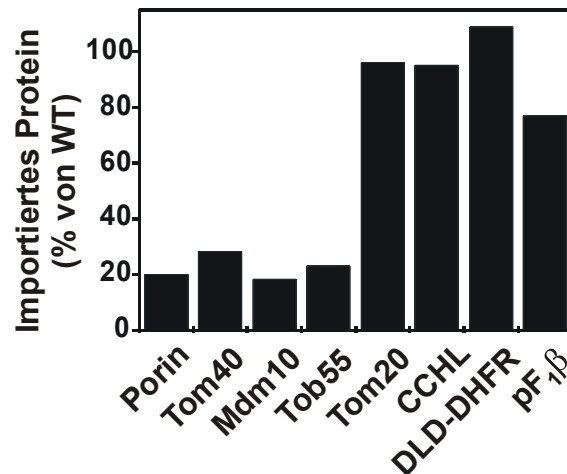
Analyse der Expression von mitochondrialen Proteinen. YPH499- und Tob55(Gal10)-Zellen wurden 43 h (WT und Tob55 $\downarrow$ ) oder 47 h (Tob55 $\downarrow\downarrow$ ) nach Überführung in Glucose-haltiges Medium geerntet und die Mitochondrien isoliert. Je 50  $\mu$ g Wildtyp-Mitochondrien (WT) und Mitochondrien aus Tob55(Gal10) (Tob55 $\downarrow$  und Tob55 $\downarrow\downarrow$ ) wurden mittels SDS-PAGE und Immunoblot gegen die jeweiligen Proteine analysiert. CCPO, Cytochrom *c* Peroxidase; Aco1, Aconitase; AM, Außenmembran; IM, Innenmembran; IMR, Intermembranraum.

Tob55 wird demnach spezifisch für die Aufrechterhaltung mitochondrialer Außenmembranproteine benötigt, die mittels einer  $\beta$ -Barrel-Struktur in der Lipidschicht verankert sind. Daraus ergeben sich mehrere Möglichkeiten für die Funktion von Tob55. Eine nahe liegende Vermutung wäre die direkte Beteiligung von Tob55 am Import dieser Proteine. Möglich wäre aber auch ein stabilisierender Effekt oder ein indirekter Einfluss auf die Expression von  $\beta$ -Barrel-Proteinen.

### **2.11. Der Import von $\beta$ -Barrel-Membranproteinen ist abhängig von Tob55**

Die meisten essenziellen mitochondrialen Proteine in *S. cerevisiae* sind an der Biogenese von mitochondrialen Proteinen beteiligt (Paschen und Neupert, 2001). Tom40 ist neben Tob55 das einzige essenzielle Außenmembranprotein und ist die zentrale Komponente des TOM-Komplexes. Um zu untersuchen, ob Tob55 eine Rolle bei der Biogenese von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen besitzt, wurde der Import von verschiedenen mitochondrialen Proteinen in isolierte Tob55-depletierte Mitochondrien untersucht.

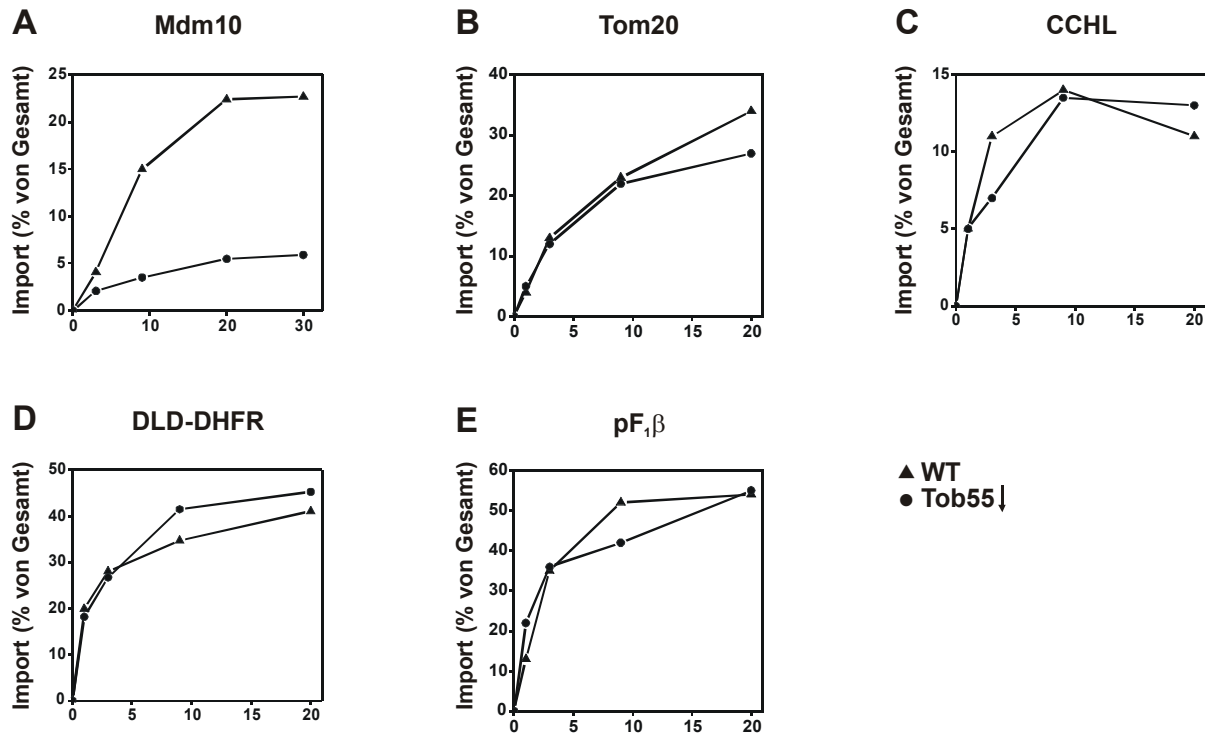
Im Vergleich zu WT-Mitochondrien war der Import der  $\beta$ -Barrel-Proteine Porin, Tom40 und Mdm10 sowie von Tob55 selbst in den Tob55-depletierten Mitochondrien um etwa 80% reduziert (Abb. 14). Ein unspezifischer Defekt der TOM-Translokase in den Tob55-depletierten Mitochondrien konnte ausgeschlossen werden, da der Import von Tom20, welches mit einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne in der Außenmembran verankert ist, nicht vermindert war (Abb. 14). Dies wurde durch weitere Kontrollproteine bestätigt. Proteine des Intermembranraums (CCHL), der Innenmembran (pDLD-DHFR) und der Matrix (pF1 $\beta$ ) wurden in die Tob55-depletierten Mitochondrien mit vergleichbarer Effizienz wie in die WT-Mitochondrien importiert (Abb. 14).



**Abb. 14. Tob55 ist für den Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen essenziell.**

Radioaktiv markierte Vorstufenproteine wurden für 9 min bei 25°C in isolierte Wildtyp- (WT) und in Tob55 $\downarrow$ -Mitochondrien in Anwesenheit eines Membranpotentials importiert. Die reisolierten Mitochondrien wurden mit 50  $\mu$ g/ml PK behandelt und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung der importierten Proteine erfolgte mittels eines Phosphoimagers, wobei die importierte Menge eines Proteins in WT-Mitochondrien gleich 100% gesetzt wurde. CCHL, Cytochrom *c* Häm-Lyase; pDLD-DHFR, chimäres Vorstufenprotein aus der N-terminalen Präsequenz der D-Laktat-Dehydrogenase (Aminosäuren 1-72) und der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus; pF<sub>1</sub>β,  $\beta$ -Untereinheit der mitochondrialen F<sub>0</sub>-ATPase. Für jedes Vorstufenprotein lagen die Ergebnisse aus mindestens drei unabhängigen Experimenten innerhalb einer Abweichung von maximal  $\pm 15\%$  von dem dargestellten Wert.

Um die Kinetik der Importreaktionen zu untersuchen, wurden die Vorstufenproteine für verschiedene Zeitpunkte mit den WT- und Tob55-depletierten Mitochondrien inkubiert. Stellvertretend sind in Abbildung 15 Beispiele für den Import von Vorstufenproteinen in die verschiedenen mitochondrialen Subkompartiments dargestellt. Die Importkinetik des  $\beta$ -Barrel-Proteins Mdm10 war in Tob55-depletierte Mitochondrien im Vergleich zu WT-Mitochondrien signifikant verlangsamt, während Kontrollproteine in beide Mitochondrien mit derselben Kinetik importiert wurden (Abb. 15).



**Abb. 15. Importkinetiken mitochondrialer Vorstufenproteine in Tob55-depletierten Mitochondrien.**

Verschiedene mitochondriale Vorstufenproteine wurden wie in Abbildung 14 beschrieben bei 25°C für die jeweiligen Zeiten in WT- und Tob55-depletierte (Tob55↓) Mitochondrien importiert. Die Quantifizierung erfolgte mittels eines Phosphoimagers. Die eingesetzte Menge eines Vorstufenproteins wurde 100% gesetzt.

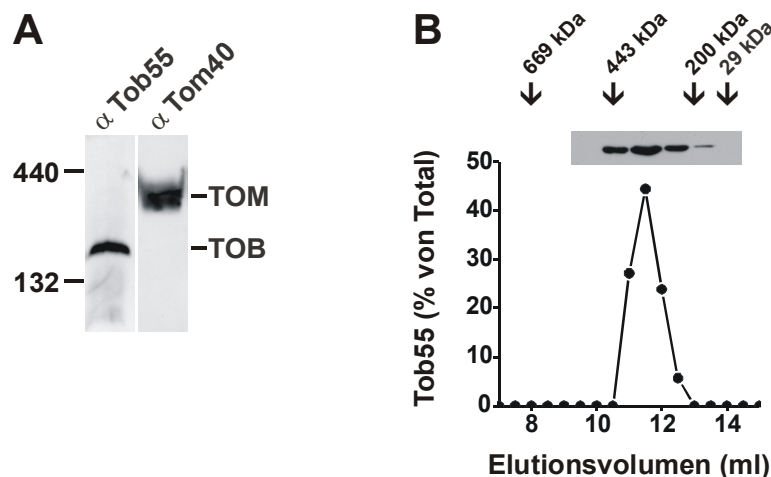
Tob55 ist demnach spezifisch am Proteinimport von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Außenmembranproteinen beteiligt. Der Import von  $\alpha$ -helikal verankerten Proteinen der Außenmembran ist durch die Depletion von Tob55 nicht beeinflusst. Auffällig ist, dass der Import von Tob55 sich selbst oder ein von Tob55-abhängiges Protein benötigt (Abb. 14).

Aufgrund der bisherigen Ergebnisse wurde dem offenen Leserahmen YNL026w aus *S. cerevisiae* der Name "Tob55" zugewiesen. Tob steht für "Topogenese von mitochondrialen Außenmembran- $\beta$ -Barrel-Proteinen" (*topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*) und 55 für die molekulare Masse in kDa des *Neurospora*-Homologen NCU05593.1, da Tob55 in diesem Organismus zuerst entdeckt wurde (Pfanner *et al.*, 1996).



## 2.12. Tob55 ist Bestandteil des oligomeren TOB-Komplexes

Die mitochondrialen Translokationskomponenten des Proteinimports sind in hochmolekularen Komplexen wie dem TOM- oder den TIM-Komplexen organisiert (Paschen und Neupert, 2001). Da Tob55 am Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen beteiligt ist, könnte Tob55 eine neue Untereinheit des TOM-Komplexes sein. Um dies zu überprüfen, wurden Mitochondrien mit Digitonin solubilisiert und Tob55 mittels Blauer Nativgelelektrophorese (BNGE) und Gelfiltration analysiert. Mit beiden Methoden wurde natives Tob55 in einer hochmolekularen Form mit apparenten Größe von 220-250 kDa nachgewiesen (Abb. 16A&B). Tob55 ist keine Komponente des TOM-Komplexes, da dieser bei BNGE eine apparente Masse von 400 kDa aufwies (Abb. 16A, rechte Spur) (Dekker *et al.*, 1998). Entsprechende Ergebnisse wurden auch bei Solubilisierung der Mitochondrien mit *n*-Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid (DDM) erhalten.

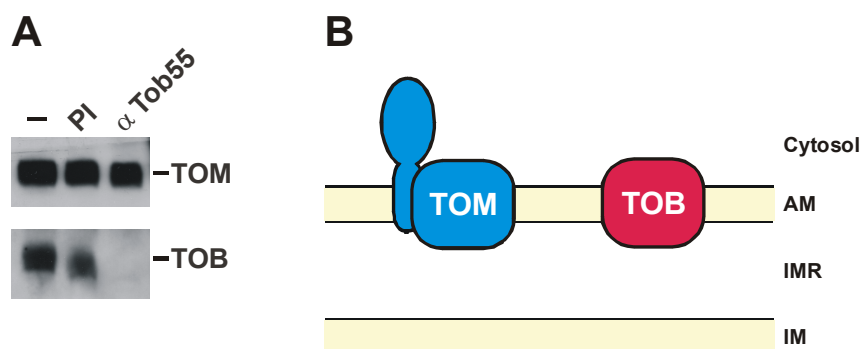


**Abb. 16. Tob55 ist Bestandteil des hochmolekularen TOB-Komplexes.**

**A.** Analyse von Mitochondrien mittels Blauer Nativgelelektrophorese. Je 150  $\mu$ g WT-Mitochondrien wurden mit 1% (w/v) Digitonin für 30 min bei 4°C lysiert und nach klärender Zentrifugation mittels BNGE und Immunoblot gegen Tob55 ( $\alpha$ Tob55) oder Tom40 ( $\alpha$ Tom40) analysiert. Verwendete Molekulargewichtsmarker sind eingezeichnet (in kDa). TOB, Topogenese von Außenmembran- $\beta$ -Barrel-Proteinen; TOM, Translokase der Außenmembran.  
**B.** Gelfiltration von solubilierten Mitochondrien. 350  $\mu$ g WT-Mitochondrien wurden wie in A. beschrieben lysiert und das Solubilisat auf eine Superose 12-Gelfiltrationssäule (Pharmacia) aufgetragen und mit 0.1% (w/v) Digitonin-haltigem Puffer eluiert. Die gesammelten Fraktionen (500  $\mu$ l) wurden mit TCA gefällt und durch SDS-PAGE und Immunoblot gegen Tob55 untersucht. Die Tob55-Signale wurden densitometrisch quantifiziert und als Prozent des Gesamtsignals gegen das Elutionsvolumen aufgetragen. Die Elutionspositionen von den Markerproteinen Thyroglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa),  $\beta$ -Amylase (200 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa) sind mit Pfeilen markiert. Zur Bestimmung des apparenten Molekulargewichts von Tob55 wurde das Elutionsvolumen gegen den Logarithmus der molekularen Masse der Markerproteine aufgetragen und eine lineare Regression durchgeführt.

Da die relative Molekularmasse des Tob55-Monomers 54.4 kDa beträgt, liegt Tob55 unter nativen Bedingungen demnach in einer hochmolekularen Form als Bestandteil eines oligomeren 220-250 kDa Komplexes vor, der aufgrund der Funktion von Tob55 entsprechend TOB-Komplex (Topogenese von mitochondrialen Außenmembran- $\beta$ -Barrel-Membranproteinen; *topogenesis of outer membrane  $\beta$ -barrel membrane proteins*) genannt wurde.

Um eine Interaktion von Tob55 mit dem TOM-Komplex auszuschließen, wurden Koimmunopräzipitationsanalysen durchgeführt. Hierzu wurden Mitochondrien mit Digitonin solubilisiert und Tob55 mit spezifischen Antikörpern, die an eine Protein A-Sepharose Matrix (PAS-Matrix) vorgebunden waren, depletiert. Der Überstand wurde durch BNGE und Immunoblot gegen Tob55 und Tom40 analysiert. Die Tob55-Antikörper präzipitierten den TOB-Komplex vollständig aus dem Proteinextrakt, der TOM-Komplex verblieb quantitativ im Überstand (Abb. 17A). Präimmunserum hatte keinen Einfluss auf beide Komplexe (Abb. 17A).



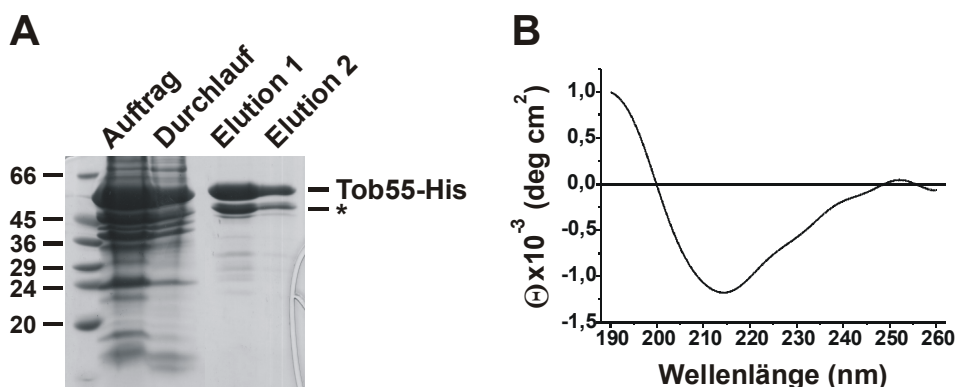
**Abb. 17. Tob55 interagiert nicht mit dem TOM-Komplex.**

**A.** Immunodepletion des TOB-Komplexes. 150  $\mu$ g Mitochondrien wurden wie in Abbildung 16 beschrieben lysiert und der Proteinextrakt mit Tob55-Antikörpern ( $\alpha$ Tob55) oder Präimmunserum (PI), die an 20  $\mu$ l einer PAS-Matrix vorgebunden waren, für 1 h bei 4°C inkubiert. Die PAS-Matrix wurde durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand mittels BNGE und Immunoblot gegen Tob55 (TOB) und Tom40 (TOM) analysiert. **B.** Proteinimportmaschinen der Außenmembran. TOB, TOB-Komplex; TOM, TOM-Komplex.

Der TOB-Komplex stellt somit einen neuen, eigenständigen Komplex in der Außenmembran von Mitochondrien dar, der für den Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen essenziell ist (Abb. 17B) (Paschen *et al.*, 2003).

### 2.13. Tob55 ist ein $\beta$ -Barrel-Protein

Vorhersagen zur Sekundärstruktur von Tob55 ergaben, dass Tob55 ähnlich wie Tom40 oder Porinen  $\beta$ -Faltblätter enthält (Ahting *et al.*, 2001; Popp *et al.*, 1996; Wimley, 2003). Um dies zu überprüfen, wurden die Sekundärstrukturanteile von Tob55 mit Hilfe von Circular-Dichroismus-Messungen (CD) experimentell bestimmt. Dazu wurde Tob55-His<sub>8</sub>, das einen C-terminalen His<sub>8</sub>-Tag enthält, rekombinant in *Escherichia coli* exprimiert. Wie zu erwarten, wurde das Membranprotein in Einschlusskörperchen abgelagert. Nach Solubilisierung der Einschlusskörperchen mittels Harnstoff und DDM wurde das Protein durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert (Abb. 18A). Die Rückfaltung des Tob55-Proteins in seine native Struktur wurde durch schrittweise Erniedrigung der Harnstoffkonzentration mittels Dialyse erreicht. Zusätzlich enthielt der Dialysepuffer DDM, um das Protein in Detergenzmizellen in Lösung zu halten. Anschließend wurde das rückgefaltete Tob55 CD-spektroskopisch untersucht. Das CD-Spektrum zeichnete sich durch einen Nulldurchgang bei 199 nm und ein einziges lokales Absorptionsminimum bei 214 nm aus und ist dem CD-Spektrum von mitochondrialen Porin vergleichbar (Abb. 18B) (Ahting *et al.*, 2001). Die quantitative Auswertung nach Raussens ergab eine Sekundärstrukturzusammensetzung von 28%  $\beta$ -Faltblatt-, 24%  $\alpha$ -Helix- und 12.5% Turn-Struktur (Raussens *et al.*, 2003). Der  $\beta$ -Faltblattanteil würde ausreichen, um die Außenmembran bis zu 20x zu durchspannen. Demnach ist Tob55 selbst ein  $\beta$ -Barrel-Protein.



**Abb. 18. Reinigung und CD-Spektrum von rekombinantem Tob55.**

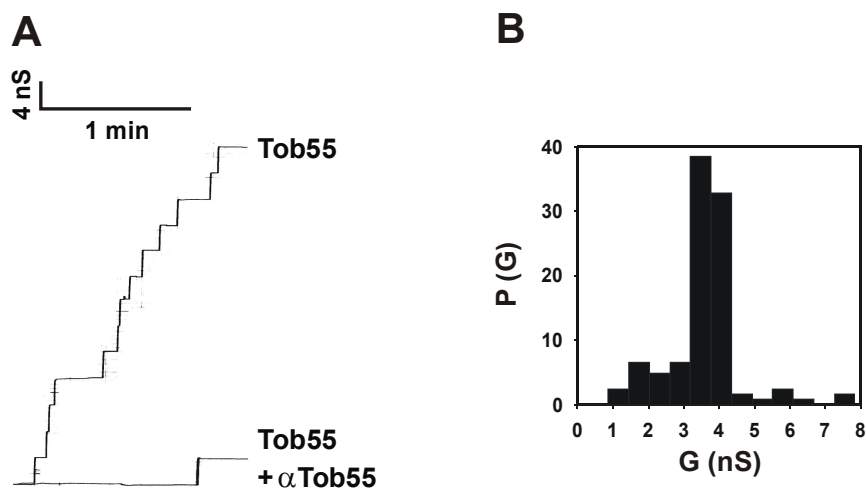
**A.** Expression und Reinigung von Tob55-His<sub>6</sub>. Das Protein wurde aus Einschlusskörperchen mittels 8 M Harnstoff und 1% (w/v) DDM solubilisiert (Auftrag) und über Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigt (Durchlauf). Die Elution erfolgte in zwei Fraktionen (Elution 1&2) mit 300 mM Imidazol. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung analysiert. \*, N-terminal verkürztes proteolytisches Fragment von Tob55-His<sub>6</sub>. **B.** CD-Spektrum von Tob55. Das mittels Dialyse rückgefaltete, rekombinante Tob55-His<sub>6</sub> war in 0.05% (w/v) DDM, 50 mM NaCl und 5 mM Natriumphosphat, pH 7.4 solubilisiert (0.1 µg/ml). Acht Einzelspektren wurden von 190-260 nm bei 4°C gegen Puffer ohne Protein gemessen und gemittelt. Die CD-Messungen wurden in der Arbeitsgruppe von Prof. Moroder, MPI für Biochemie, Martinsried, durchgeführt. Θ, Elliptizität.

Die mitochondriale Außenmembran enthält entweder  $\beta$ -Barrel-Proteine oder solche, die mit einer einzigen  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne verankert sind, jedoch keine polytopischen Proteine mit mehreren Transmembransegmenten (Gabriel *et al.*, 2001; Rapaport, 2003). Da der TOB-Komplex spezifisch nur  $\beta$ -Barrel-Proteine importiert, erklärt dies auch, warum es auch für seinen eigenen Import benötigt wird.

**2.14. Tob55 ist ein kanalbildendes Protein**

Der TOM-Komplex ist für die Translokation von mitochondrialen Vorstufenproteinen über die Außenmembran verantwortlich. Der isolierte TOM-Holokomplex weist in künstlichen Lipidmembranen spannungsabhängige Kanäle auf, die von Tom40 ausgebildet werden (Ahting *et al.*, 2001; Hill *et al.*, 1998; Kunkele *et al.*, 1998). Mittels elektrophysiologischer Mehrkanalmessungen von rekombinantem Tob55 wurde untersucht, ob dieses ebenfalls zur Ausbildung eines Kanals fähig ist. Das isolierte Tob55-His<sub>8</sub>-Protein wurde in Genapol X-080 verdünnt und zu einer künstlichen Lipidschicht aus Diphytanoyl-phosphatidylcholin (DPPC) hinzugefügt. Die Zunahme der Leitfähigkeit über die Membran in Folge möglicher Insertionsereignisse von Tob55 und Ausbildung eines ionenleitenden Kanals wurde verfolgt. Abbildung 19A zeigt einen Ausschnitt von spontanen Insertionen von Tob55, dargestellt durch die stufenweise Zunahme der Membranleitfähigkeit als Funktion der Zeit. Bei Vorinkubation von Tob55 mit Tob55-Antikörpern konnte keine Insertion beobachtet werden, während Kontrollantikörper keinen Einfluss auf die Insertion besaßen. Dies belegt die Spezifität der gemessenen Tob55-Kanäle. Aus der statistischen Auswertung von 122 Insertionsereignissen

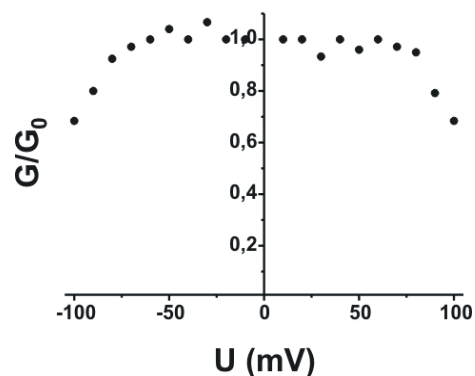
ergab sich eine mittlere Leitfähigkeit für Tob55 von 3.7 nS bei einer Elektrolytkonzentration von 1 M KCl (Abb. 19B). Dieser Wert unterscheidet sich signifikant von der Leitfähigkeit anderer Poren. So besitzt mitochondriales Porin eine Leitfähigkeit von 4.2 nS, während der TOM-Komplex 2.3 nS oder isoliertes Tom40 2.7 nS aufweisen (Ahting *et al.*, 2001; Freitag *et al.*, 1983; Ludwig *et al.*, 1988). Bakterielle Porine besitzen unter diesen Bedingungen eine maximale Leitfähigkeit von 2.3 nS, wodurch ausgeschlossen werden kann, dass eine Verunreinigung der Tob55-Präparation mit bakteriellen Porinen für die beobachtete Leitfähigkeit verantwortlich ist (Benz, 1985).



**Abb. 19. Tob55 bildet einen ionenleitenden Kanal aus.**

**A.** G/t-Diagramm der Mehrkanalmessungen von Tob55. Die künstliche Lipiddoppelschicht bestand aus DPPC. Die Messungen wurden bei einer Elektrolytkonzentration von 1 M KCl und einem Membranpotential von 20 mV durchgeführt. Isoliertes rekombinantes Tob55-His<sub>8</sub> (Kap. 2.13) wurde vor Zugabe zu beiden Kammern der Messapparatur 1:10 mit 2% Genapol X-080 verdünnt und direkt dazugeben (Tob55) oder mit Tob55-Antikörpern ( $\alpha$ Tob55) vorinkubiert. **B.** Histogramm der Häufigkeitsverteilung der einzelnen Leitfähigkeitsanstiege. Es wurden 122 Insertionsereignisse ausgewertet. G, Leitfähigkeit; P(G), relative Häufigkeit des Leitfähigkeitsanstiegs. Die elektrophysiologischen Untersuchungen wurden zusammen mit Marc Preuß durchgeführt.

Eine weitere Eigenschaft zur Charakterisierung von Kanälen stellt die Spannungsabhängigkeit der Leitfähigkeit dar (Bainbridge *et al.*, 1998). Um diese zu bestimmen, wurde Tob55 in die DPPC-Lipidmembran inseriert. Anschließend wurden Spannungen zwischen -100 bis +100 mV angelegt und der Änderung der Leitfähigkeit verfolgt. Die Leitfähigkeit der Tob55-Kanäle fiel bei angelegten Spannungen von  $\pm 70$  mV ab (Abb. 20). Bei 100 mV waren die Tob55-Kanäle zu etwa 75% geschlossen. Auch dieses Profil unterscheidet sich deutlich von der Spannungsabhängigkeit von Porinen, die bereits bei 20 mV zur Hälfte geschlossen sind (Benz, 1985; Blachly-Dyson und Forte, 2001; Court *et al.*, 1996; Popp *et al.*, 1996).



**Abb. 20. Spannungsabhängigkeit des Tob55-Kanals.**

Das Verhältnis der Leitfähigkeit  $G/G_0$  (bei 10 mV in 1 M KCl) ist als Funktion der Spannung  $U$  aufgetragen.

Neben dem rekombinanten Tob55 wurde auch der native TOB-Komplex mittels Lyse von Tob55(Gal10)-Mitochondrien mit DDM und Ni-NTA-Affinitätschromatographie isoliert und elektrophysiologisch untersucht. Nativer TOB-Komplex inserierte in Abwesenheit von Genapol X-080 nur sporadisch in die DPPC-Lipidschicht, während die geringe Zugabe von Genapol die Insertion erleichterte, wie dies auch für mitochondriales Porin beschrieben wurde (Benz *et al.*, 1989). Die gemessene Leitfähigkeit des nativen Komplexes stimmte mit der des rekombinanten Tob55-Proteins überein. Jedoch war die Effizienz der Insertion geringer. Zugabe von Ergosterol erleichtert die Insertion von mitochondrialem Porin in die künstliche Lipidschicht, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Insertion von rekombinantem oder nativem Tob55 (Popp *et al.*, 1996).

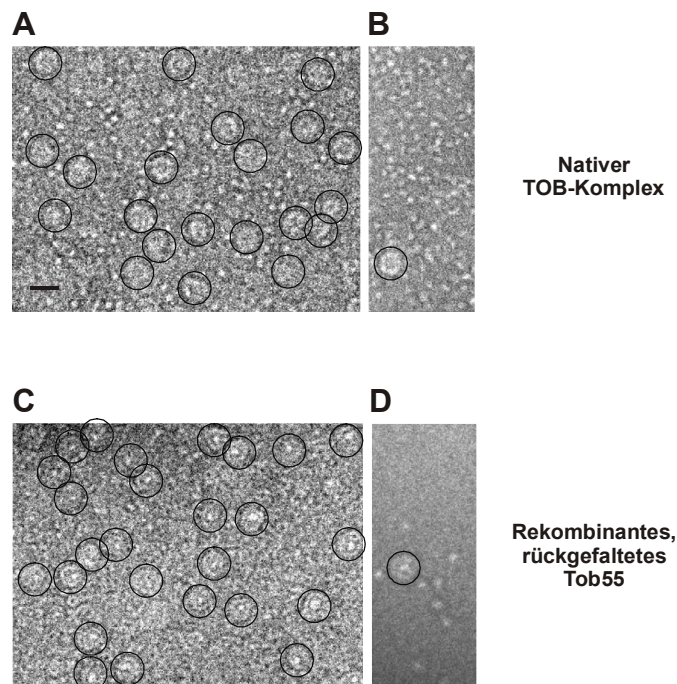
## 2.15. Elektronenmikroskopische Untersuchungen von Tob55

Da die elektrophysiologischen Ergebnisse vermuten lassen, dass Tob55 eine ionenleitende Pore ausbilden kann, wurde im Folgenden der oligomere Zustand von Tob55 mittels Elektronenmikroskopie untersucht. Hierzu wurde sowohl rekombinantes Tob55 nach Rückfaltung als auch nativer TOB-Komplex analysiert. Beide Präparationen wurden mittels einer Kombination aus Einzelpartikel-Elektronenmikroskopie und Kryo-Negativfärbung in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Cyrklaff im Labor von Prof. Wolfgang Baumeister, MPI Martinsried, untersucht (Adrian *et al.*, 1998; De Carlo *et al.*, 2002).

Biologische Proben werden üblicherweise mittels Trocknung und Negativfärbung mit Kontrastmitteln hoher Dichte (z. B. Uranylacetat) für die Elektronenmikroskopie präpariert (Brenner und Horne, 1959). Um Präparationsartefakte zu vermeiden wurde die Methode der Kryoelektronenmikroskopie etabliert (Taylor und Glaeser, 1974). Durch Einbetten der Probe in einer dünnen Schicht aus gefrorenem Lösungsmittel, genannt Vitrifizierung, wird dabei der native Zustand erhalten (van Heel *et al.*, 2000). Bei dieser Methode ist jedoch der Kontrast sehr gering, so dass ein niedriges Signal-zu-Rausch-Verhältnis entsteht, das durch Bildbearbeitung wieder ausgeglichen werden muss (Adrian *et al.*, 1998). Ein weiteres Problem sind Strahlungsschäden durch den Elektronenstrahl an der Probe, die den limitierenden Faktor der Auflösung darstellen. Normalerweise schützten die bei der Negativfärbung verwendeten Kontrastmittel die Probe vor Strahlungsschäden. Bei der Kryoelektronenmikroskopie akkumulieren die Schäden an der eingefrorenen Probe jedoch kontinuierlich bis diese zerstört ist. Um diese Probleme zu vermeiden, entwickelten Adrian *et al.* die Kryo-Negativfärbung, um die Lücke zwischen herkömmlicher Negativfärbung und Vitrifizierung zu schließen (Adrian *et al.*, 1998). Dabei wird die Probe direkt vor dem Einfrieren mit flüssigem Stickstoff mit 16% Ammoniummolybdat angefärbt, wodurch der native, hydratisierte Zustand erhalten bleibt und zudem ein hoher negativer Kontrast erreicht wird. Diese Methode wurde bisher jedoch nur selten für Einzelpartikel-Analysen eingesetzt (Adrian *et al.*, 1998).

Der isolierte native TOB-Komplex und das rückgefaltete Tob55-Protein stellten sich auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen als zylindrische Strukturen dar (Abb. 21A-D), die eine dunkel gefärbte Vertiefung aufwiesen. Diese enthielt in den meisten Fällen eine zusätzliche

Dichte, die nicht durch das Ammoniummolybdat angefärbt wurde und ungefähr in der Mitte der ringförmigen Strukturen lokalisiert war (Abb. 21A-D). Diese trat in der Präparation des rückgefalteten Tob55 deutlicher hervor (Abb. 21C&D). Vermutlich stellen diese Aufnahme eine Aufsicht des TOB-Komplexes dar; Seitenansichten waren nicht deutlich zu erkennen. Die meisten dieser Partikel waren nicht in den Puffer-gefüllten Öffnungen des Gitters lokalisiert (Abb. B&D), sondern auf der Oberfläche des amorphen Kohlefilms (Abb. 21A&C), der möglicherweise durch seine Hydrophobizität eine bessere Wechselwirkung mit dem solubilisierten TOB-Komplex vermittelt und zu einer selektiven Orientierung führt. Die Eigenschaften der unterschiedlich lokalisierten Partikel unterschieden sich jedoch nicht (Abb. 21A-D). Vor allem die native Präparation des TOB-Komplexes wies einen hohen Hintergrund von kleineren Partikeln auf, die möglicherweise monomeres Tob55-Protein darstellen (Abb. 21A&B). Dieses könnte durch Zerfall der größeren Partikel während der Fixierung entstanden sein oder die Präparation enthielt nicht assembliertes Protein.

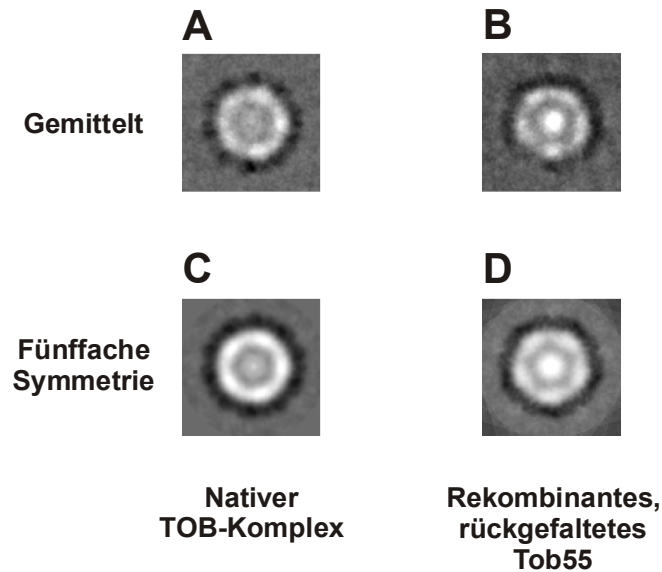




**Abb. 21. Elektronenmikroskopische Aufnahmen des TOB-Komplexes.**

**A.** Aufnahme des nativen TOB-Komplexes auf der Oberfläche des Kohlefilms des Gitters. TOB-Komplexe wurden mittels DDM und Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus Mitochondrien isoliert und auf ein mit einem amorphen Kohlefilm beschichtetes Gitter (Kupfergitter für die Elektronenmikroskopie; Quantifoil) aufgebracht, mit 16% (w/v) Ammoniummolybdat negativ angefärbt und in flüssigem Stickstoff in einer Gatan 626 Kryohalterung schockgefroren. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden bei einer 38.000-fachen Vergrößerung mit einem CM200-FEG-Transmissionselektronenmikroskop (FEI-Eindhoven) und einem digitalen Bildsystem (Tietz) gemacht. TOB-Komplex-Partikel sind zur Verdeutlichung schwarz eingekreist. Die Länge des schwarzen Balkens in A. entspricht 20 nm. **B.** Wie A, aber Aufnahme über einer Öffnung des Trägerritters. **C&D.** Wie A. und B., jedoch Aufnahmen des rekombinanten rückgefalteten Tob55-Proteins.

Um die verschiedenen Aufnahmen von Tob55 zu mitteln, wurden 347 Einzelpartikel des nativen TOB-Komplexes sowie 207 Einzelpartikel des rückgefalteten Tob55 visuell ausgewählt und als Einzelbild den mikroskopischen Aufnahmen entnommen. Zur Berechnung der zweidimensionalen gemittelten Bilder aus den Überlagerungen der Einzelbilder wurde das "EM"-Softwarepaket eingesetzt (Hegerl, 1996). Die Aufnahmen der nativen und der rekombinanten Präparation von Tob55 wiesen keinen signifikanten Unterschied in den Ausmaßen der ringförmigen Partikel auf. Die Projektionen beider Präparationen zeigten eine deutliche ringförmige Struktur mit einer großen dunkel gefärbten Kavität, die eine Pore darstellen könnte (Abb. 22A&B). Der äußere Durchmesser der Partikel beträgt 15 nm, der innere 7-8 nm. Der Radius der höchsten Massendichte beträgt 11.5 nm. Auffällig ist, dass die zentrale Dichte mit einem Durchmesser von 4-5 nm nur in der Präparation des rückgefalteten Tob55 deutlich zu erkennen ist (Abb. 22B). Durch die Mittelung scheint diese, im Gegensatz zu den Einzelbildern, direkt in Mitte der Ringstruktur lokalisiert zu sein. Die gemittelten Bilder in Abbildung 22A&B wurden ohne Berücksichtigung einer Symmetrie berechnet. Somit konnten nun verschiedene rotationale Symmetrien (2-10-fach) auf die beiden zweidimensionalen Bilder überlagert werden. Eine fünffache Symmetrie stimmte am besten mit den Datensätzen überein. Diese wurde auf die gemittelten Projektionen der in Abbildung 22A&B dargestellten TOB-Komplexe überlagert. Die fünffache Symmetrie ist in den Kavitäten der Partikel deutlich zur erkennen; auch die zentrale Dichte tritt stärker hervor (Abb. 22C&D).



**Abb. 22. Zweidimensionale Mittelung von Einzelpartikeln des TOB-Komplexes.**

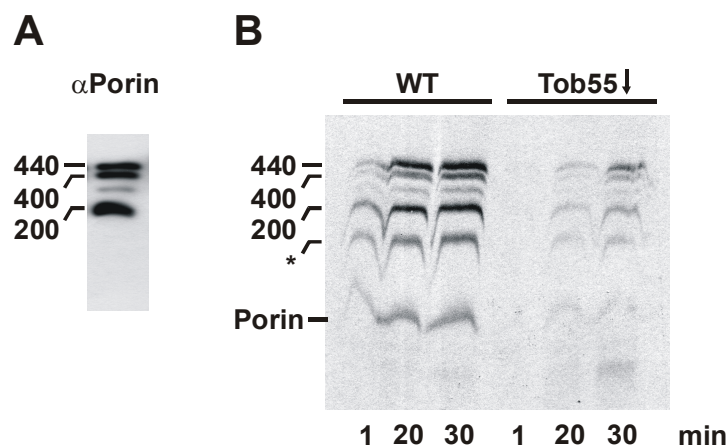
**A.** Mittelung von 347 Einzelpartikeln des nativen TOB-Komplexes. **B.** Mittelung von 207 Einzelpartikeln des rückgefalteten Tob55. **C&D.** Überlagerung einer fünfzähligen Symmetrie auf A. bzw. B.. Die Kantenlänge beträgt je 27 nm.

Die große Kavität von 7-8 nm Durchmesser könnte einen ionenleitenden Kanal des TOB-Komplexes darstellen, wie für den TOM-Komplex vorgeschlagen. Tob55 scheint auszureichen, um die beobachteten Partikel auszubilden, da kein signifikanter Unterschied zwischen dem nativen TOB-Komplex und rückgefaltetem Tob55 besteht. Ob diese beobachtete Kavität jedoch einen proteinleitenden Kanal darstellt, ist fraglich.

## 2.16. Der Import von Porin ist Tob55-abhängig

Da Tob55 für den Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen essenziell, wurde im Folgenden untersucht, an welcher Stufe des Importprozesses Tob55 beteiligt ist. Der Importprozess von mitochondrialem Porin wird durch den Rezeptor Tom20 eingeleitet, der das Vorstufenprotein an den TOM-Kanal übergibt (Krimmer *et al.*, 2001). Darauf folgt die Membraninsertion und die Assemblierung von Porin in funktionelle Komplexe. Porin enthält mehrere interne Importsignale. Die Topologie sowie der native Zustand von Porin sind nicht bekannt (Bay und Court, 2002). Bei Analyse von nativem Porin mittels BN-GE wurden drei hochmolekulare Spezies erhalten, deren Zusammensetzung jedoch nicht bekannt ist (Abb. 23A) (Krimmer *et al.*, 2001). Radioaktiv markiertes Porin-Vorstufenprotein wurde *in vitro* in WT- und in Tob55-

depletierte Mitochondrien importiert und mittels BNGE analysiert. Nach Import von Porin in den WT-Mitochondrien wurden drei hochmolekulare Spezies gefunden, die denen des endogenen Porin entsprechen (Abb. 23B). Zusätzlich traten zwei weitere Spezies auf. Die unterste Bande könnte einem Porin-Dimer entsprechen; die Bande darüber ist möglicherweise ein Assemblierungsintermediat (\*) (Abb. 23A&B). Der Import von Porin in die Tob55-depletierten Mitochondrien (Tob55↓) war stark reduziert (Abb. 23B). Da alle Porin-Spezies betroffen sind, lässt sich hieraus keine spezifische Funktion von Tob55 bei der Biogenese einzelner Porin-Spezies ableiten.



**Abb. 23. Der Import und die Assemblierung von Porin sind von Tob55 abhängig.**

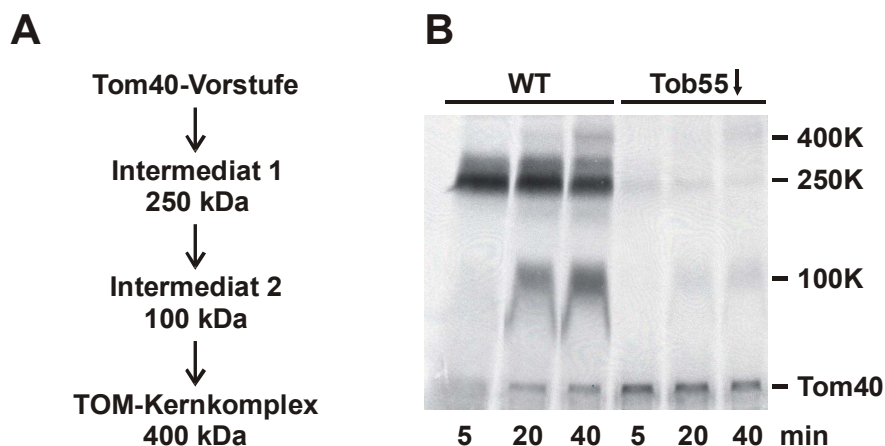
**A.** Native Porin-Komplexe. WT-Mitochondrien wurden in Digitonin solubilisiert und mittels BNGE und Immunodekoration ( $\alpha$ Porin) analysiert. Die assemblierten Porin-Komplexe sind markiert (in kDa). **B.** Import von Porin. Radioaktiv markiertes Porin-Vorstufenprotein wurde für 1, 20 und 30 min bei 25°C mit WT- und Tob55-depletierten Mitochondrien (Tob55↓) inkubiert und der Import mittels BNGE und Autoradiographie analysiert. \*, mögliches Assemblierungsintermediat.

## 2.17. Tob55 ist für die Biogenese von Tom40 essenziell

Der Importweg von Tom40 konnte in verschiedene Stufen unterteilt werden (Krimmer *et al.*, 2001; Model *et al.*, 2001; Pfanner und Wiedemann, 2002; Rapaport und Neupert, 1999). Nach Transfer des Tom40-Vorstufenproteins von den Rezeptoren in den TOM-Kanal, assembliert dieses zu einem frühen 250K Intermediat unbekannter Zusammensetzung (Abb. 24A). Dieses scheint nur peripher mit der Außenmembran assoziiert zu sein und ist zum

Intermembranraum hin exponiert (Model *et al.*, 2001). Anschließend reift der 250K-Komplex Intermediat zu einem späten Assemblierungsintermediat von 100 kDa, welches neben einem Tom40-Dimer auch Tom5 enthält und bereits in die Außenmembran integriert ist (Abb. 24A). Demnach findet die Membraninsertion von Tom40 während der Reifung des 250K zum 100K Intermediat statt. Schließlich assembliert das 100K Intermediat mit Tom6, Tom7 und Tom22 zum 400K TOM-Kernkomplex. Die Bildung der 100K und 400K Komplexe ist vergleichsweise langsam und erfordern eine höhere Temperatur als die Bildung des 250K Intermediates. Der reife TOM-Komplex scheint sich in einem Gleichgewicht mit dem 100K Intermediat zu befinden, wodurch die Aufnahme neu synthetisierter Tom-Proteine ermöglicht wird (Pfanner und Wiedemann, 2002; Rapaport, 2002).

Tom40 wurde in WT- und in Tob55-depletierte Mitochondrien importiert und mittels BNGE analysiert. Bei Import in WT-Mitochondrien traten die oben beschriebenen Intermediate auf (Abb. 24B). Im Gegensatz dazu wurde bei Inkubation von Tom40 mit den Tob55-depletierten Mitochondrien keines der beiden Intermediate gebildet, während monomeres Tom40-Vorstufenprotein akkumulierte (Abb. 24B). Tob55 wird somit bereits für die Bildung des ersten 250K Importintermediates von Tom40 benötigt.



**Abb. 24. Tob55 wird für den Import und die Assemblierung von Tom40 benötigt.**

**A.** Schematische Darstellung der TOM-Komplex-Biogenese. Details siehe Text. **B.** Radioaktiv markiertes Tom40-Vorstufenprotein wurde für 5, 20 und 40 min bei 25°C mit WT- und Tob55-depletierten Mitochondrien (Tob55↓) inkubiert und der Import mittels BNGE und Autoradiographie analysiert. Die 100K und 250K Assemblierungsintermediate sowie der vollassemblierte 400K TOM-Kernkomplex sind markiert.

## 2.18. Mdm10, ein unerkanntes $\beta$ -Barrel-Protein

Mdm10 ist ein nicht-essenzielles 56.2 kDa Protein der mitochondrialen Außenmembran und ist an der Erhaltung der mitochondrialen Morphologie sowie der Verteilung der Mitochondrien in der Zelle beteiligt, in dem es möglicherweise die Interaktion von Mitochondrien mit dem Aktin-Cytoskelett vermittelt (Boldogh *et al.*, 1998; Sogo und Yaffe, 1994). Kürzlich konnten Boldogh *et al.* mittels Koimmunoprecipitationen und Co-Lokalisation zeigen, dass Mdm10 zumindest teilweise in einem Komplex mit den Außenmembranproteinen Mdm12 und Mmm1 vorliegt und möglicherweise als Verankerungspunkt für diese beiden Proteine dient (Boldogh *et al.*, 2003). Mdm10 scheint punktuell über Mitochondrien verteilt zu sein. Mdm12 und Mmm1 werden ebenfalls für die Erhaltung der mitochondrialen Morphologie benötigt (Berger *et al.*, 1997; Burgess *et al.*, 1994).

Die Topologie von Mdm10 wurde bisher nicht näher untersucht. Für Mdm10 aus *S. cerevisiae* wurde keine, für Mdm10-Homologe aus verschiedenen Organismen bis zu vier  $\alpha$ -helikale Transmembrandomänen vorhergesagt (Koch *et al.*, 2003; Sogo und Yaffe, 1994). Mdm10 ist jedoch gegenüber alkalischer Extraktion resistent und verhält sich demnach wie ein integrales Außenmembranprotein (Bordier, 1981; Sogo und Yaffe, 1994). Da bisher nicht beobachtet wurde, dass ein mitochondriales Außenmembranprotein von *S. cerevisiae* mehr als eine hydrophobe Transmembrandomäne enthält, ist die Assoziation von Mdm10 mit der Außenmembran ungeklärt (Rapaport, 2003). Da der Import von Mdm10 von Tob55 abhängig ist, dürfte es sich bei Mdm10 ebenfalls um ein  $\beta$ -Barrel-Membranprotein handeln. Eine Sekundärstrukturvorhersage für  $\beta$ -Schleifen ergab, dass Mdm10 14  $\beta$ -Faltblätter enthält und somit eine  $\beta$ -Barrel-Struktur ausbilden könnte (Abb. 25) (Kaur und Raghava, 2002). Mdm10 ist daher wahrscheinlich ein neues Mitglied der mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteinfamilie.

```

MLPYMDQVLRAFYQSTHWSTQNSYEDITATSRTLLDFRIPSAIHLQISNKSTPNTFNSLD
CCCHHHHHHHHHHHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHCCECCCCCEEEEECCCCCCCCCCCCC
          tttttttttt          ttttt          tttttttttttt

FSTRSRINGSLSYLYSDAQOLEKFMRNSTDIPLQDATETYRQLQPNLNFVSSANTLSSD
ECECECECCCHHHHECCHHHHHHHHHCHCCCCCHHHHHHHHHCCCCCCCCCCCCCCCCC
          tttt          tttt          tttttttttttttttt

NTTVDNDKLLHDSKFVKKSLYYGRMYYPSSDLEAMI IKRLSPQTQFMLKGVSSFKESLN
CCCCCCCCCHHCCCCCHHHCCCCECCCHHHHHHHHHHHCHHHHEEEEEEEEECCCCCCC
          tttttttt          tttt          tttttt

VLTICYFQRDSHRNLQEWIFSTSDLLCGYRVLHNFLTTPSKFNTSLYNNSSLGLAEFWLG
EEEEEEEECCCCCCCCEEEECCCCEECEEEHCCCCCHHCCCCCCCCCEEEHHHEHHH
          tttttttt          ttttt          tttttttttttttttt

LVSLSPGCSTTLRYYTHSTNTGRPLTLTLSWQPLFGHISSTYSAKTGTNSTFCAKYDFNL
HHCCCCCHHCHHHCCCCCCCCCCCCCEEEEEECCHCCCECCCECCCCCCCCCEEEEECCCE
          tttt          tttttttt          tttttttt          ttttt

YSIESNLSFGCEFWQKHHLLETNKNNDKLEPI SDELVDINPNSRATKLLHENVPDLNS
EEHHCHHHHHHHHHCHCCCHHHCCCCCCCCCCCCCCCCCHEEEEECCCCHHHHHHHCCCCCHH
          tttttttttttt          tttt

AVNDIPSTLDIPVHKQKLLNDLTYAFSSSLRKIDEERSTIEKFDNKINSSIFTSVWKLST
HHHCCCCCCCCCHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHHCHCCHHHHHHHEHCH
          tttttttt

SLRDKTLKLLWEGKWRGFLISAGTELVFTRGFQESLSDDEKNDNAISISATDTENGNI PV
HHCHHHEEHEECCCCCEEECCCCCEEECCCHHHCCCCCCCCCEEEEECCCCCCCCCECE
          tttt          ttttt          tttt          ttttttt          ttttttttt

FPAKFGIQFYST
EEHHCEEEECEC
          tttt

```

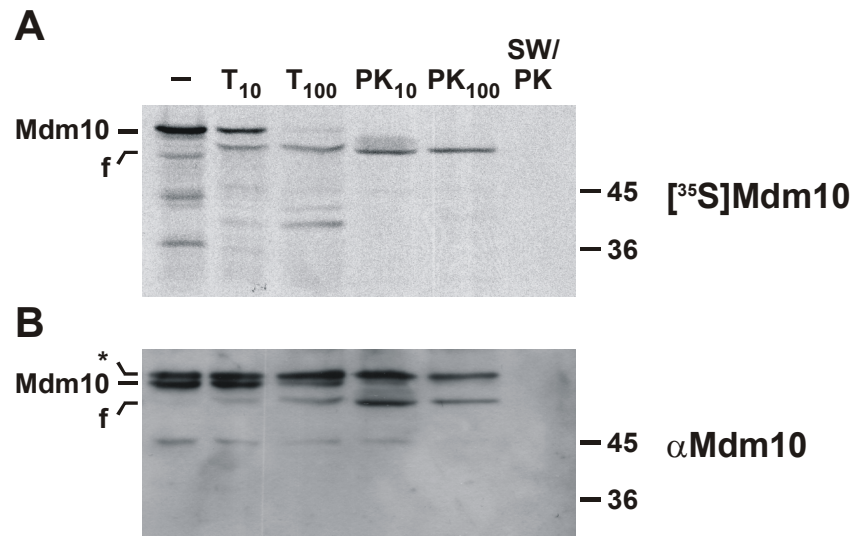
**Abb. 25. Sekundärstrukturen von Mdm10.**

Sekundärstrukturen wurden mittels BetaTPred2 vorhergesagt (Kaur und Raghava, 2002).  $\beta$ -Faltblätter sind rot,  $\beta$ -Turn-Aminosäuren sind blau markiert. C, coiled-coil-Struktur; H, Helix-Struktur; E,  $\beta$ -Faltblatt.

## 2.19. Import und Topologie von Mdm10

Um den Import und die Topologie von Mdm10 zu charakterisieren, wurde radioaktiv markiertes Mdm10-Vorstufenprotein mit isolierten Mitochondrien inkubiert. Diese wurden anschließend mit Proteasen behandelt und analysiert. Die Proteasesensitivität des importierten Mdm10 war identisch mit der des endogenen Proteins, welches mittels Western Blot-Analyse nachgewiesen wurde (Abb. 26A&B). Bei Behandlung der Mitochondrien mit Trypsin oder PK wurde Mdm10 verdaut und wurde in ein proteaseresistentes Fragment von

etwa 50 kDa überführt. Nach hypotonem Schwellen der Mitochondrien und Inkubation mit PK wurde Mdm10 vollständig abgebaut (Abb. 26A&B). Der Mdm10-Antikörper wies eine Kreuzreaktion direkt über dem Mdm10-Signal auf (Abb. 26B; \*) (Sogo und Yaffe, 1994). Demnach scheint Mdm10 wie Porin oder Tom40 tief in der Lipidschicht der Außenmembran verankert zu sein.

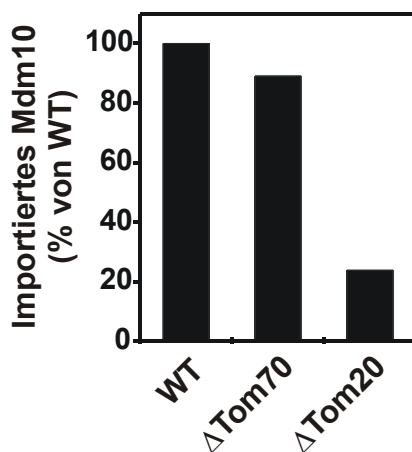


**Abb. 26. Import und Topologie von Mdm10.**

**A.** Import von Mdm10. Radioaktiv markiertes Mdm10-Vorstufenprotein (<sup>35</sup>S]Mdm10) wurde für 30 min bei 25°C in WT-Mitochondrien importiert. Die reisolierten Mitochondrien wurden mit den angegebenen Konzentration Trypsin oder PK (in µg/ml) behandelt, Mitoplasten nur mit PK (SW/PK). Der Import wurde mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. f, proteolytisches Fragment von Mdm10. **B.** Immunodekoration gegen endogenes Mdm10 (αMdm10). \*, Kreuzreaktion des polyklonalen Mdm10-Antikörpers (Sogo und Yaffe, 1994). Molekulargewichtsmarker sind eingezeichnet (in kDa).

Sowohl Porin als auch Tom40 benötigen für einen effektiven Import den Rezeptor Tom20 (Krimmer *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999). Auch Tob55 wird rezeptorabhängig importiert (Daten nicht gezeigt). Obwohl die beiden Rezeptoren Tom20 und Tom70 eine überlappende Funktion besitzen, haben sie verschiedene Präferenzen für Vorstufenproteine. Tom20 erkennt vornehmlich N-terminale Signalsequenzen, während Tom70 Proteine mit internen Importsignalen, wie die mitochondrialen Carrier-Proteine erkennt (Endo und Kohda,

2002). Um zu überprüfen, ob Tom20 generell den Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen vermittelt, wurde Mdm10 in Mitochondrien importiert, die aus Deletionsmutanten von Tom20 oder Tom70 isoliert wurden (Brachmann *et al.*, 1998). Die Deletion von Tom70 hatte im Vergleich mit WT-Mitochondrien kaum einen Einfluss auf den Import von Mdm10 (Abb. 27). Bei Deletion von Tom20 war die Importeffizienz von Mdm10 stark reduziert und die Mdm10-Vorstufe akkumulierte an der Oberfläche der Mitochondrien (Abb. 27 und nicht gezeigt). Somit scheint die Erkennung von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen spezifisch von Tom20 vermittelt zu werden.



**Abb. 27. Mdm10 benötigt den Rezeptor Tom20.**

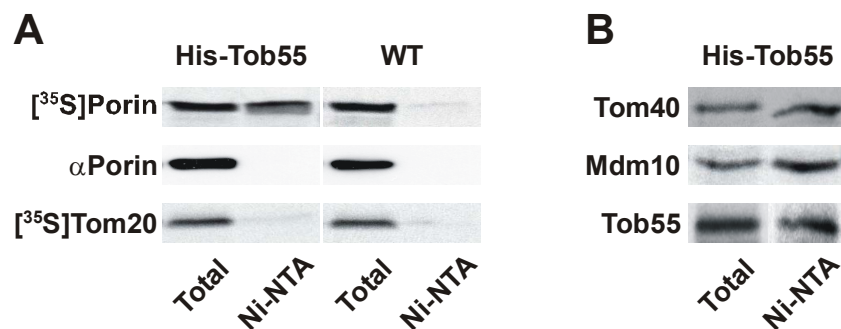
Radioaktiv markiertes Mdm10-Vorstufenprotein wurde für 15 min bei 25°C in WT, Tom20- oder Tom70-deletierte Mitochondrien ( $\Delta$ Tom20 bzw.  $\Delta$ Tom70) importiert. Die reisolierten Mitochondrien wurden mit 50  $\mu$ g/ml PK behandelt und der Import mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert. Die Quantifizierung des inserierten Mdm10-Proteins erfolgte mittels eines Phosphoimagers, wobei die importierte Menge von Mdm10 in WT-Mitochondrien gleich 100% gesetzt wurde.

## 2.20. Tob55 interagiert mit Vorstufen von $\beta$ -Barrel-Proteinen

Der TOB-Komplex wird für den Import der  $\beta$ -Barrel-Proteine Porin, Tom40, Mdm10 und Tob55 benötigt, interagiert jedoch nicht mit den endogenen assemblierten Proteinen (mit Ausnahme von Tob55 als Untereinheit dieses Komplexes). Deshalb wurde im Folgenden untersucht, ob Tob55 als essenzielle Komponente des TOB-Komplexes, mit  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen während ihres Importweges in die Außenmembran interagiert. Dazu wurden Mitochondrien von Tob55(Gal10) verwendet, die Tob55 mit einem N-terminalen His<sub>8</sub>-Tag (His-Tob55) enthielten. Die radioaktiv markierten Vorstufenproteinen der  $\beta$ -Barrel-Proteine Porin, Tom40, Mdm10 und Tob55, sowie Tom20 als Kontrolle, wurden mit den isolierten Mitochondrien inkubiert. Um Translokationsintermediate zu akkumulieren, erfolgte die Inkubation nur für kurze Zeit und bei niedriger Temperatur (Krimmer *et al.*, 2001; Model *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999). Die Vorstufen aller importierten Proteine assoziierten



erwartungsgemäß mit den Mitochondrien (Abb. 28, Total). Nach Solubilisierung der Mitochondrien mit Digitonin wurde His-Tob55 mittels Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Radioaktive Vorstufen, die mit Tob55-assoziiert waren, wurden mittels SDS-PAGE und Autoradiographie nachgewiesen. Die radioaktiv markierte Porin-Vorstufe ( $[^{35}\text{S}]\text{Porin}$ ) konnte spezifisch mit His-Tob55 präzipitiert werden, während endogenes Porin ( $\alpha\text{Porin}$ ) und importiertes Tom20 ( $[^{35}\text{S}]\text{Tom20}$ ) nicht mit Tob55 interagierten (Abb. 28A). Auch die Vorstufen der  $\beta$ -Barrel-Proteine Tom40, Mdm10 und Tob55 assoziierten während des Importes mit His-Tob55 (Abb. 28B, Ni-NTA-Spuren). Dies bestätigt die Annahme, dass Tob55 nur mit Vorstufenproteinen in Transit interagiert und somit eine direkte Funktion beim Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen in die Außenmembran übernimmt. Eine unspezifische Interaktion der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen mit Ni-NTA-Agarose konnte ausgeschlossen werden, da diese nach Import in WT-Mitochondrien nicht präzipitiert wurden (Abb. 28A).

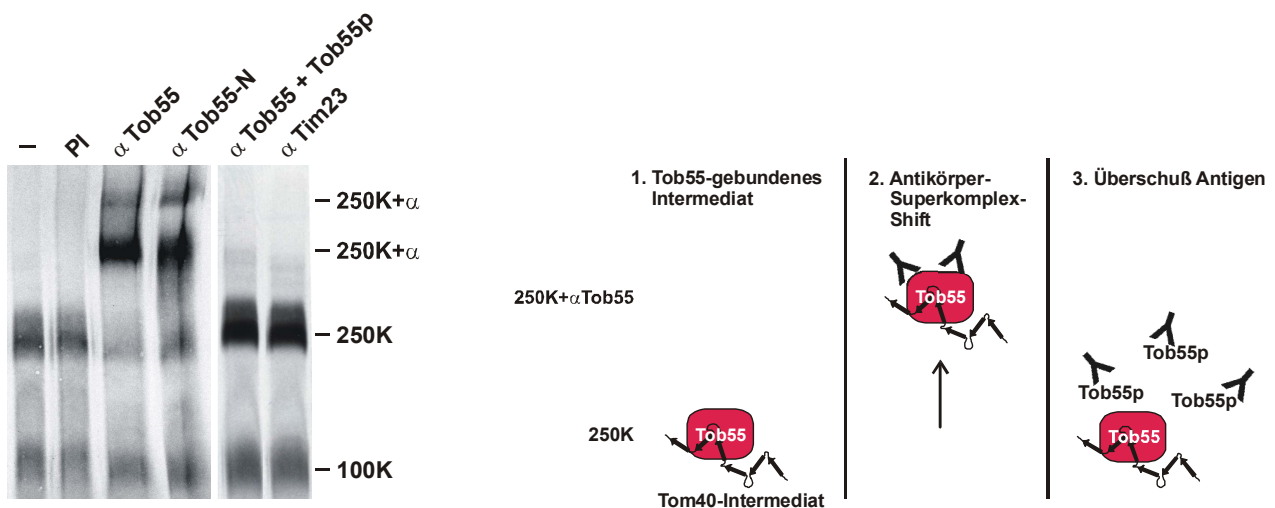


**Abb. 28. Tob55 interagiert spezifisch mit Vorstufenproteinen von  $\beta$ -Barrel-Proteinen.**

Radioaktiv markierte Vorstufenproteine wurden für 5 min auf Eis in je 150  $\mu\text{g}$  Mitochondrien, die entweder natives Tob55 (WT) oder Tob55 mit N-terminalem His<sub>8</sub>-Tag (His-Tob55) enthielten, importiert. Die Mitochondrien wurden mit 1% Digitonin für 30 min bei 4°C solubilisiert und je 15% des Lysates als "Total" abgenommen und die Proteine mit TCA gefällt. Der Rest wurde mit 40  $\mu\text{l}$  Ni-NTA-Agarose für 1 h bei 4°C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die präzipitierten Proteine mittels 500 mM Imidazol in Laemmli-Puffer eluiert und mittels SDS-PAGE, Western Blotting und Autoradiographie analysiert (Ni-NTA).  $\alpha\text{Porin}$ , Immunodekoration mit Porin-Antikörpern;  $[^{35}\text{S}]$ , radioaktiv markiertes Vorstufenprotein.

## 2.21. Tob55 ist Bestandteil von $\beta$ -Barrel-Importintermediaten

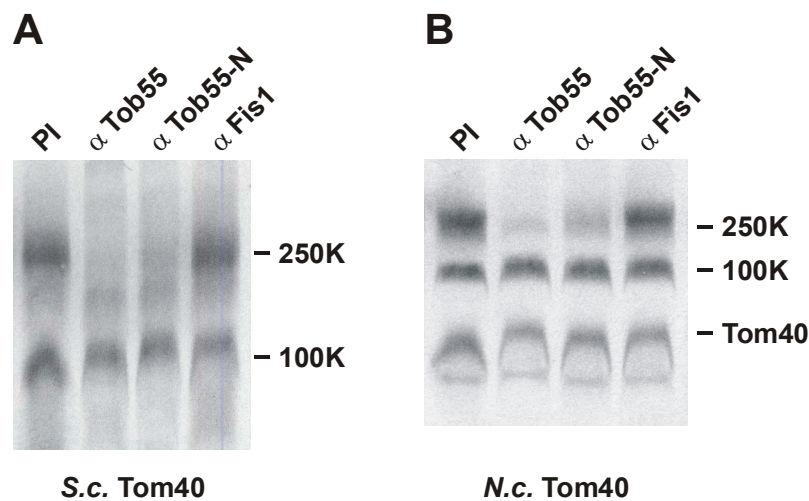
Wie oben gezeigt, wird Tob55 bereits für die Bildung des 250K Intermediates von Tom40 benötigt. Um zu klären, ob Tob55 ein Bestandteil dieses Intermediates ist, wurde Tom40 in Mitochondrien importiert. Dies geschah auf Eis, um das 250K Intermediat zu akkumulieren und um die weitere Reifung in das 100K Intermediat zu verzögern (Pfanner und Wiedemann, 2002; Rapaport und Neupert, 1999). Anschließend wurden die Mitochondrien mit Digitonin lysiert, mit Antikörpern gegen Tob55 inkubiert und mittels BNGE und Autoradiographie analysiert. Die Inkubation mit Antikörpern gegen Tob55 führte zur Bildung von höhermolekularen Superkomplexen, die sowohl die radioaktiv markierte Tom40-Vorstufe als auch den Tob55-Antikörper enthielten (Abb. 29; 250K+ $\alpha$ ). Vorinkubation der Tob55-Antikörper mit einem Überschuss an rekombinantem Tob55-Antigen verhinderte die Bildung des Superkomplexes, wodurch die Spezifität der Interaktion bestätigt wurde (Abb. 29). Inkubation mit Präimmunsereum (PI) oder Antikörpern gegen das Innenmembranprotein Tim23 bewirkte keine Ausbildung des Superkomplexes (Abb. 29). Dies zeigt, dass das akkumulierte 250K Transit-Intermediat von Tom40 mit dem TOB-Komplex assoziiert ist.



**Abb. 29. Das 250K Assemblierungsintermediat von Tom40 ist mit dem TOB-Komplex assoziiert.**

Tom40 wurde für 20 min auf Eis in WT-Mitochondrien importiert und diese anschließend mit Digitonin solubilisiert. Das Lysat wurde mit Präimmunsereum (PI), Antikörpern gegen Tob55 ( $\alpha$ Tob55), einem N-terminalen Tob55-Peptidantikörper ( $\alpha$ Tob55-N), mit 3  $\mu$ g rekombinanten Antigen-gesättigten Tob55-Antikörpern ( $\alpha$ Tob55+Tob55p), oder Antikörpern gegen Tim23 ( $\alpha$ Tim23) für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend mittels BNGE und Autoradiographie analysiert. 250K+ $\alpha$ , Superkomplex aus dem 250K Intermediat von Tom40, Tob55 und Tob55-Antikörpern.

Zur weiteren Charakterisierung wurde Tom40 wie oben beschrieben importiert. Nach Lyse der Mitochondrien wurden Tob55-enhaltende Komplexe durch Immunopräzipitation depletiert. Wie erwartet, wurde das 250K Translokationsintermediat vollständig aus dem Solubilisat präzipitiert (Abb. 30A). Im Gegensatz dazu wurde das 100K Tom40-Intermediat nicht gefällt (Abb. 30A). Dies zeigt, dass dieses Intermediat kein Tob55 enthält. Inkubation mit Präimmenserum oder Antikörpern gegen das Außenmembranprotein Fis1 hatten keinen Einfluss auf das 250K Intermediat (Abb. 30A). Die gleichen Ergebnisse wurden auch mit dem Tom40-Vorstufenprotein aus *N. crassa* erhalten, welches vergleichbare Importintermediate ausbildet (Abb. 30B) (Taylor *et al.*, 2003a).

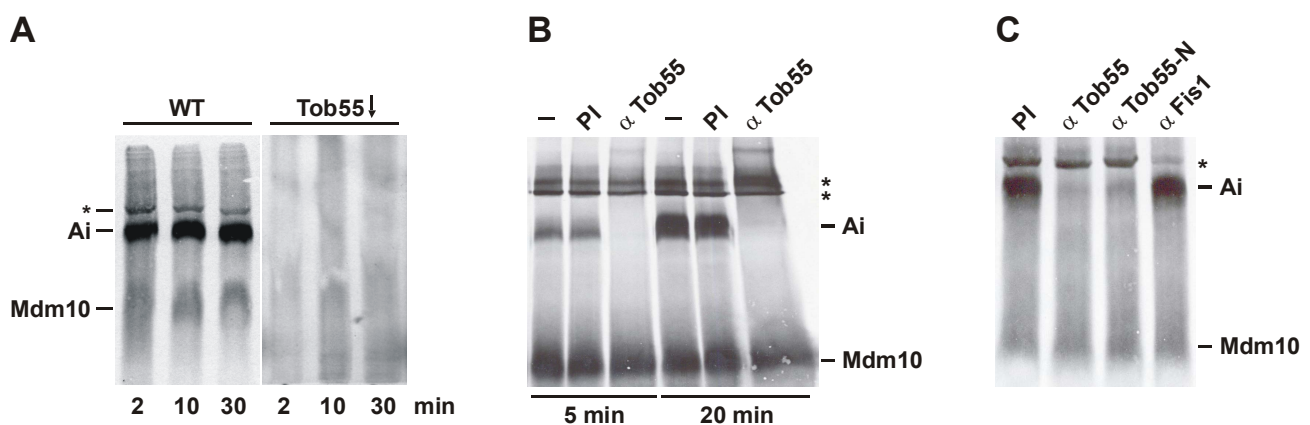


**Abb. 30. Das 250K Assemblierungsintermediat von Tom40 enthält Tob55.**

**A&B.** Immunodepletion des 250K Importintermediates von Tom40. Tom40 aus *S.c.* und *N.c.* wurde für 20 min auf Eis in WT-Mitochondrien importiert, diese mit Digitonin solubilisiert und das Lysat mit Präimmenserum (PI), Antikörpern gegen Tob55 ( $\alpha$ Tob55), einem N-terminalen Tob55-Antikörper ( $\alpha$ Tob55-N) oder Antikörpern gegen Fis1 ( $\alpha$ Fis1), die an 30  $\mu$ l einer Protein A-Matrix vorgebunden waren, für 1 h bei 4°C inkubiert. Die Protein A-Matrix wurde durch Zentrifugation sedimentiert und der Überstand mittels BNGE und Autoradiographie analysiert. Die Importintermediate sind markiert.

Um festzustellen, ob Tob55 auch Bestandteil eines Assemblierungsintermediates von Mdm10 ist, wurden zunächst der Import und die Assemblierung von importiertem Mdm10 mittels BNGE analysiert. In WT-Mitochondrien bildete sich ein hochmolekularer Komplex, der wahrscheinlich ein Assemblierungsintermediat (Ai) von Mdm10 darstellt (Abb. 31A). Der zur

Verfügung stehenden Antikörper erkennt Mdm10 nach SDS-PAGE und Western Blotting, jedoch nicht nach BNGE. Das native Molekulargewicht von assembliertem Mdm10 ist somit unbekannt. Dieser Komplex enthält jedoch im Gegensatz zum Assemblierungsintermediat Ai kein Tob55, wie durch Immunopräzipitation und SDS-PAGE nachgewiesen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Mdm10 wurde in Mitochondrien importiert und anschließend wie oben beschrieben das Digitonin-Lysat der Mitochondrien mit einem Antikörper gegen Tob55 inkubiert. Wie auch bei Tom40 führt die Inkubation mit Tob55-Antikörpern zur Ausbildung eines Superkomplexes, der radioaktiv markiertes Mdm10 und Tob55-Antikörper enthielt (Abb. 31B). Dieses Assemblierungsintermediat ließ sich mit Tob55-Antikörpern depletieren (Abb. 31C). Diese Ergebnisse zeigen, dass Tob55 ein direkter Bestandteil von Importintermediaten der  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine ist.



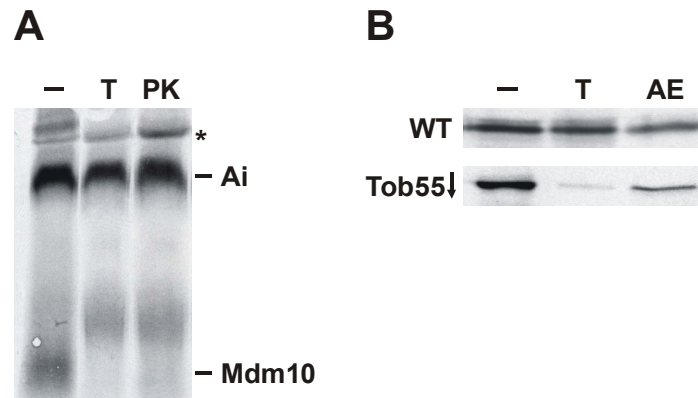
**Abb. 31. Tob55 ist für die Assemblierung von Mdm10 essenziell.**

**A.** Radioaktiv markiertes Mdm10-Vorstufenprotein wurde für 2, 10 und 30 min bei 25°C mit WT- und Tob55-depletierten Mitochondrien (Tob55↓) inkubiert und der Import mittels BNGE und Autoradiographie analysiert. Ai, Assemblierungsintermediat von Mdm10; \*, assembliertes Mdm10 oder unspezifische Bande. **B.** Antikörper-Shift des Mdm10-Assemblierungsintermediats. Details siehe Abbildung 30. **C.** Immunodepletion des Assemblierungsintermediats. Details siehe Abbildung 30.

## 2.22. Der TOB-Komplex übernimmt $\beta$ -Barrel-Vorstufen vom TOM-Komplex

Das mit Tob55-assoziierte 250K Intermediat von Tom40 ist in intakten Mitochondrien resistent gegen Abbau durch Proteasen und ist zum Intermembranraum hin exponiert (Model *et al.*, 2001). Das Mdm10-Assemblierungsintermediat ist ebenfalls gegen Behandlung mit Trypsin

oder PK geschützt (Abb. 32A). In Tob55-depletierten Mitochondrien wird Mdm10 dagegen selbst von geringen Konzentrationen an Trypsin fast vollständig abgebaut (Abb. 32B). Die Tob55-assoziierten Vorstufenproteine haben somit die Außenmembran bereits größtenteils oder vollständig überquert. In Abwesenheit von Tob55 bleiben die Vorstufen mit dem TOM-Komplex assoziiert (Abb. 32B).

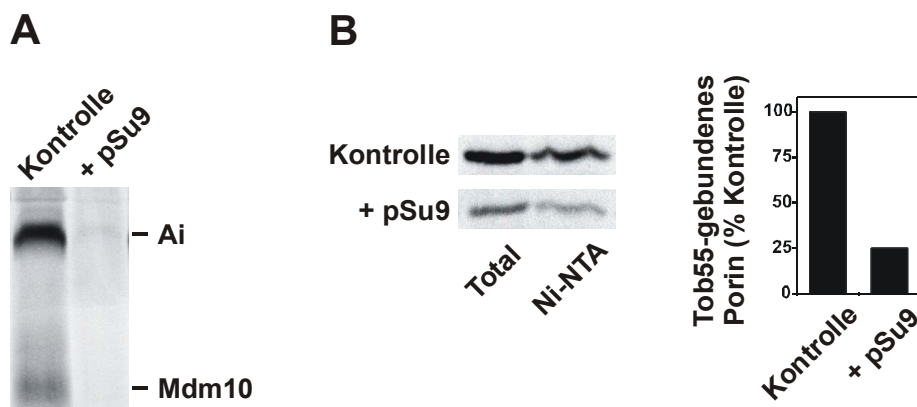


**Abb. 32. Lokalisation des Tob55-assoziierten Assemblierungsintermediats von Mdm10.**

**A.** Behandlung des Assemblierungsintermediates von Mdm10 mit Proteasen. Radioaktiv markiertes Mdm10-Vorstufenprotein wurde für 20 min bei 25°C in WT-Mitochondrien importiert und anschließend mit je 50 µg/ml Trypsin (T) oder PK behandelt. Analyse erfolgte mittels BNGE und Autoradiographie. Ai, Assemblierungsintermediat von Mdm10; \*, assembliertes Mdm10 oder unspezifische Bande. **B.** Mdm10-Intermediat ist in Tob55-depletierten Mitochondrien für Protease zugänglich. Mdm10 wurde in WT- und Tob55-depletierte (Tob55↓) Mitochondrien importiert und diese anschließend mit 10 µg/ml Trypsin behandelt sowie einer alkalischen Extraktion unterzogen. AE, Membranpellet der alkalischen Extraktion.

Da bisher nicht komplett ausgeschlossen werden kann, dass die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen direkt vom Cytosol mit der Hilfe des TOB-Komplexes und dem Tom20-Rezeptor in die Außenmembran integriert werden, wurde untersucht, ob die Translokation der Assemblierungsintermediate in eine proteaseresistente Lokalisation vom TOM-Komplex vermittelt wird. Dazu wurden die Importstellen der TOM-Komplexe mit einem Überschuss des rekombinanten Präproteins pSu(1-69)-DHFR abgesättigt und der Einfluss auf die Bildung der Tob55-assoziierten Assemblierungsintermediate analysiert. pSu(1-69)-DHFR besteht aus der Matrix-Signalsequenz der Untereinheit 9 der  $F_0$ -ATPase aus *N. crassa* (pSu9(1-69)) und der Dihydrofolat-Reduktase (DHFR) der Maus. In Abwesenheit eines Membranpotentials akkumuliert dieses an der *trans*-Bindungsstelle des TOM-Komplexes und blockiert so den

Translokationskanal (Krimmer *et al.*, 2001). Nach Import von Mdm10 war die Bildung des Assemblierungsintermediates stark reduziert, wenn die Mitochondrien zuvor mit pSu(1-69)-DHFR inkubiert wurden (Abb. 33A). Ebenso war die Bildung des Tob55-assoziierten Intermediates von Porin durch Vorinkubation mit pSu(1-69)-DHFR blockiert (Abb. 33B). Wurde pSu(1-69)-DHFR erst nach Import von Porin dazugegeben, war die Assoziation von diesem mit Tob55 nicht beeinträchtigt (Abb. B, Kontrolle). Dies bestätigt frühere Beobachtungen, dass Porin sowie Tom40 für ihren Import den TOM-Kanal benötigen (Krimmer *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999).  $\beta$ -Barrel-Vorstufen werden demnach mittels des TOM-Komplexes über die Außenmembran transloziert, bevor sie mit Tob55 interagieren. In Tob55-depletierten Mitochondrien wurde das 250K Intermediat von Tom40 sowie das Assemblierungsintermediat von Mdm10 nicht gebildet und die Vorstufen erreichten keine proteasegeschützte Lokalisation (Abb. 32A&B). Der TOB-Komplex scheint daher für die vollständige Translokation über den TOM-Komplex notwendig zu sein, so dass kein lösliches Translokationsintermediat im Intermembranraum akkumuliert.



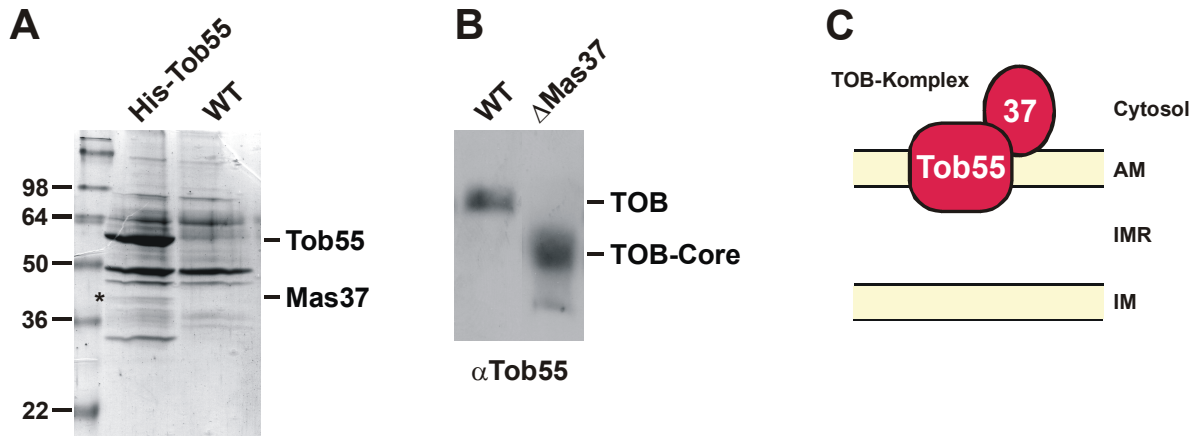
**Abb. 33. Translokation über die Außenmembran erfolgt vor Interaktion mit dem TOB-Komplex.**

**A.** Blockierung des TOM-Komplexes. WT-Mitochondrien wurden vor Import von Mdm10 mit in der Abwesenheit eines Membranpotentials mit 12.5  $\mu$ g pSu9(1-69)-DHFR (pSu9) vorinkubiert. Die Analyse erfolgte mittels BNGE und Autoradiographie. Rekombinantes pSu9(1-69)-DHFR wurde nach Krimmer *et al.* gewonnen (Krimmer *et al.*, 2001). Ai, Assemblierungsintermediat von Mdm10. **B.** Porin wurde wie in Abbildung 28 beschrieben in His-Tob55-enthaltende Mitochondrien importiert, die zuvor wie in A. mit pSu9 vorinkubiert wurden (+ pSu9). Die Mitochondrien wurden mit 1% Digitonin für 30 min bei 4°C solubilisiert und 15% des Lysates als "Total" abgenommen und die Proteine mit TCA gefällt. Der Rest wurde mit 40  $\mu$ l Ni-NTA-Agarose für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend gewaschen. Die präzipitierten Proteine wurden mittels 500 mM Imidazol in Laemmli-Puffer eluiert und mittels SDS-PAGE und Autoradiographie analysiert (Ni-NTA). Zur Kontrolle wurde pSu9 erst nach dem Import von Porin hinzugegeben. Die Quantifizierung der Tob55-gebundenen Intermediate erfolgte mittels eines Phosphoimagers. Die Kontrolle wurde gleich 100% gesetzt.

### 2.23. Mas37 ist Bestandteil des TOB-Komplexes

Obwohl die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von nativem TOB-Komplex und rekombinantem rückgefaltetem Tob55 keine signifikanten Unterschiede aufwiesen, bestand die Möglichkeit, dass der TOB-Komplex noch weitere Untereinheiten enthält. Um diese potentiellen Proteine zu identifizieren, wurden His-Tob55-Mitochondrien und WT-Mitochondrien als Kontrolle mit Digitonin solubilisiert und His-Tob55 mittels Ni-NTA-Agarose präzipitiert. Proteine, die spezifisch mit His-Tob55 assoziiert waren, wurden mittels ESI-Massenspektrometrie identifiziert. Bei einem der assoziierten Proteine handelte es sich um Mas37/Tom37, das von dem ORF YMR060C kodiert wird (Abb. 34A). Mas37 ist ein 37.5 kDa Protein ohne offensichtliche Transmembrandomäne, das vermutlich peripher mit der Außenmembran assoziiert ist. Mas37 ist nicht essenziell. Es scheint spezifisch für *S. cerevisiae* zu sein, da bisher keine homologen Proteine in anderen Organismen identifiziert wurden (Gratzer *et al.*, 1995; Hoogenraad *et al.*, 2002).

Um zu überprüfen ob Mas37 eine Untereinheit des TOB-Komplexes ist, wurden Mitochondrien aus einem WT- und einem Mas37-Deletionsstamm mittels BNGE analysiert. In den Mitochondrien ohne Mas37 ( $\Delta$ Mas37) wies der TOB-Komplex eine um ca. 40 kDa geringere apparente Masse auf (Abb. 34B). Dieser Massenunterschied könnte einer Kopie von Mas37 entsprechen. In Abwesenheit von Mas37 liegt der TOB-Komplex demnach als TOB-Kernkomplex (TOB-Core) vor (Abb. 34B). Dieser TOB-Kernkomplex ist funktionell, da Assemblierungsintermediate von  $\beta$ -Barrel-Vorstufen an diesen binden (Paschen *et al.*, 2003). Mas37 ist somit eine weitere Untereinheit des TOB-Komplexes, besitzt aber keine essenzielle Funktion für diesen (Abb. 34C).



**Abb. 34. Mas37 ist eine Untereinheit des TOB-Komplexes.**

**A.** Identifizierung von Mas37. Je 1.8 mg His-Tob55- und WT-Mitochondrien wurden in 900  $\mu$ l Digitonin-Puffer (1% (w/v) Digitonin, 50 mM NaPi, 100 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% Glycerol, 0.5 mM PMSF, pH 8.0) für 30 min solubilisiert und nach klärender Zentrifugation unter Bewegung mit je 40  $\mu$ l Ni-NTA-Beads inkubiert. Nach 1 h bei 4°C wurden diese dreimal mit Digitonin-Puffer gewaschen und die gebundenen Proteine mit 2x Laemmli-Puffer und 500 mM Imidazol sowie Inkubation für 5 min bei 95°C eluiert. Die Analyse erfolgte mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung. Die Molekulargewichtsmarker sind eingezeichnet (kDa). \*, Mas37-Bande. **B.** Abwesenheit von Mas37 führt zu einem TOB-Kernkomplex (TOB-Core) von reduzierter Größe. Mitochondrien isoliert aus WT- oder aus einem Mas37-Deletionsstamm ( $\Delta$ Mas37) wurden mittels BN-PAGE und Immunodekoration mit Antikörpern gegen Tob55 analysiert. **C.** Modell des TOB-Komplexes mit der membranintegrierten Untereinheit Tob55 und dem peripher assoziierten Mas37 (37).

## 2.24. Tob55 besitzt prokaryotische Homologe

Die mitochondriale Außenmembran enthält als einzige Membran von *S. cerevisiae*  $\beta$ -Barrel-Proteine (Gabriel *et al.*, 2001). Dies weist auf ihre evolutionäre Abstammung von  $\alpha$ -Proteobakterien hin (Emelyanov, 2001). Deshalb wurde durch vergleichende Sequenzanalyse auch nach Homologen der mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteine in prokaryotischen Genomen gesucht. Für Tom40 und Mdm10 konnten keine verwandten Proteine identifiziert werden. Selbst für beide mitochondrialen Porine (Por1 und Por2) konnten keine eindeutigen Homologe gefunden werden. Tob55 ist, wie gezeigt, für den Import und die Assemblierung der mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine essenziell und ist selbst ein  $\beta$ -Barrel-Protein. Überraschenderweise wurden in Genomen von Bakterien eindeutige Homologe zu Tob55 gefunden. Tob55-Homologe scheinen in vielen oder allen Gram-negativen Bakterien vorhanden zu sein. So wurden eindeutige Homologe in allen Gruppen der Proteobakterien identifiziert, aber auch in Spirochaeten (*Borrelia burgdorferi* und *Treponema pallidum*) sowie



in extremophilen Eubakterien (*Aquifex aeolicus*, *Deinococcus radiodurans*, *Thermatoga maritima*). In Gram-positiven Bakterien sowie Archäebakterien konnte kein Tob55-Homolog identifiziert werden, da diese über keine typische Außenmembran verfügen.

Eine besonders hohe Homologie besteht unter anderem zu den Omp1 Proteinen aus *Rickettsia prowazekii* (NP\_220550) und *Rickettsia sibirica* (ZP\_00142324), die beide zu der Gruppe der  $\alpha$ -Proteobakterien gehören und als Vorläufer von Mitochondrien gelten (Emelyanov, 2001). In Abbildung 35 ist ein Sequenzvergleich zwischen Tob55 aus *N. crassa* und den prokaryotischen Homologen aus *Rickettsia prowazekii* und *Neisseria meningitidis* dargestellt. Die bakteriellen Tob55-Homologe sind mit 750-850 Aminosäuren fast doppelt so groß wie die eukaryotischen Proteine. Die Sequenzähnlichkeit ist vor allem in der C-terminalen Hälfte signifikant, welche die  $\beta$ -Faltblätter enthält, während die N-terminalen Domänen selbst unter den bakteriellen Proteinen nicht besonders konserviert sind (Abb. 35). Die N-terminale Domäne der eukaryotischen Tob55-Homologen ist im Vergleich zu Bakterien verkürzt, während die C-terminale Domäne ungefähr die gleiche Anzahl von  $\beta$ -Faltblättern enthält. Die Tatsache, dass Tob55 evolutionär konserviert ist, unterstreicht die essenzielle Bedeutung von Tob55 für die Biogenese von  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen und lässt auf einen konservierten Biogeneseweg schließen.

**Abb. 35. Multipler Sequenzvergleich von Tob55 mit prokaryotische Homologen.**

Nc, Tob55 aus *Neurospora crassa* (NCU05593.1); Rp, Omp1 aus *Rickettsia prowazekii* (NP\_220550.1); Nm, Omp85 aus *Neisseria meningitidis* (gi\_7225401). Die Proteinsequenzen wurden mit dem T-Coffee-Programm verglichen (Notredame *et al.*, 2000). Die verschiedenen Farben entsprechen unterschiedlichem Ausmaß an Sequenzähnlichkeit (siehe Farblegende am Anfang). AVG, Durchschnitt; Co, Consensus Sequenz.

BAD AVG GOOD

Nc -----MASSPSA-----PGNPVEAATAKIDKAAA  
 Rp MKIISISKLTILLTIFYYHISFADYVIRKITIEGNHRVERSTIESYLKLNVGETYN  
 Nm ---MKLKQIASALMMLGISPLALADFTIQDIRVEGLQRTEPSTVFNYPVKVGDYTN

Co : : : . . : : : :

Nc IVHQKA---AAVVTEPKPQPYQ-VPNPIIEDHLLTPATVNSIEIHGANNTRRGLLD  
 Rp NSKEDEAIKRRLYATSLFRNINMYITNDGNLIVNVTETPFISSVVFSGNSKIKTNILA  
 Nm DTHGSAIIKSLYATGFFDDVRVE-TADGQLLLTVIERPTIGSLNITGAKMLQNDIAK

Co : . . \* : : : . : \* : : \* . : . :

Nc HVFKP--VVEETASPTTTLGEALARIST-----  
 Rp KEIYTMS---GESLSQAKIELDVKKILEIYKRSGRFSTKVTPKIKSLENNRVKVFID  
 Nm KNLESFGLAQSQYFNQATLNQAVAGLKEEYLGRGKLNIIQITPKVTKLARNRVDIDIT

Co : : . : : : : : : : : : : : : : : :

Nc -----ATQKLTRFGIFKEDGFGVFISDARQQQQEQF-----  
 Rp IAEGPKTVIKSIYFSGNEHYSDSELKSIVLTKESRWFRFLESNDTYDPDRVEYDKEL  
 Nm IDEGKSAKITDIEFEGNQVYSRDKLMRQMSLTEGGIWTWLTFRSNQFNEQKFAQDMEK

Co : : \* . \* . : : : : : .

Nc -----QSPTDRTELDVSI RVKEQSRL-----  
 Rp LREFYQSVGFADFRVISASVALNDTKEYFTITYSIEEGEKYRFGNVTIDNKLNTNINI  
 Nm VTDFYQNNGYFDFRILDTDIQTNEKDTKQTIKITVHEGGRFRWGKVSIEGDTNEVPK

Co : : . : \* : : : : : : : : : : : : : : :

Nc -----  
 Rp KQLNKIVNIKQGKIFNMKTVDDIAEKIGEYFTANGYP--AVNVYPDIKKNDNHTADI  
 Nm AELEKLLTMKPGKWYERQQMTAVLGEIQNRMGSAGYAYSEISVQP-LPNAETKTVDI

Co :

Nc -----  
 Rp KFIIEKADRVYINKINIINNPKTEDHVIRRAFKIEEGDVMNRSYIEKGERNLRNLDY  
 Nm VLHIEPGRKIYVNEIHITGNNKTRDEVVRRELQRMESAPYDTSKLQRSKERVLLGY

Co :

Nc -----VFKAGTDFG-NAEGSAYT--NAVLRNIFG  
 Rp FEKVSI-SLAQTKAKDKYDVNVEVDEKSTSSIGFDLGYNTAGGLFGRFSFLERNLVG  
 Nm FDNVQFD AVPLAGTPDKVDLNMSLTERSSTGSLDLSAGWVQDTGLVMSAGVVSQDNLFG

Co [Color bar]

Nc GAETLSVNAAGTRTRSAYNAV-FSTPVNGNPDIRLALEALRSSTHKPWA-----  
 Rp TGKLLNAGVQVSKNSTSYGCI--TDPHFLLDRDLSLSVNAFRNYTGRGASVLNTTDQ  
 Nm TGK--SAALRASRSKTTLNGSLSF TDPYFTADGVSLGYDVYGK--AFDPRKASTSIK

Co [Color bar]

Nc SHDEHLTGGNLRRLAWSTDNGDDHALTYSGVWRQLTG--LSASASPTVRADAGDSLKS  
 Rp SYKLHSIGVKISLGYDMKEDLSHEIDYLIKRDILSA--PSPSNSIFLNEQMGKLITS  
 Nm QYKTTTAGAGIRMSVPVTEYDRVNFGLVAEHLTVNTYNKAPKHYADFIKKYGKTDGT

Co [Color bar]

Nc SITH-----TF--TRDRRDNPLPQAGYLVRTAAELAGWGPKGDVVSFAKSEVEL  
 Rp AIGH-----TI--TYDQTDNKIVPKNGYLVSQTQEFAGVG---GDNKYIKHEIEC  
 Nm DGSFKGWLYKGTIVGWRNKITDSALWPTRGYLTGVNAEIALPG---SKLQYYSATHNQ

Co [Color bar]

Nc SAAQALPLPGVSVGAGFRAGLLYPLPMGYSLSSSTS VAPSRINDRFQLGGPTDVRGFS  
 Rp KFYKSF INNKVTLKLSAAGGDMAGL--GG-----KMVRISDRFNLGDY-SLRGFA  
 Nm TWFFP--LSKFTFLMLGGEVGIAGGY--GR-----TKEIPFFENFYGGGLGSVRYE

Co [Color bar]

Nc MGGLGPH---DGA--DSVGGDVFAAGSVNMLLPLRAGPTSPLRFQLFANGGRLVAL  
 Rp SGGVGR---EKNTNEGLGGERYYTFSTELNFPTPVPEEFNFTG-AVFIDLGSV--W  
 Nm SGTLGRKVYDEYGEKISYGGNKKANVSAELLFPMPGAKDARTVRLSLFADAGSV--W

Co [Color bar]

Nc QGKKTAEGSVSLDSGAVAS--GMKSAVAELANGLPSIAAGFGLVYAHVVARFELNFS  
 Rp -GVGLNKKQYKTPNGFYND-----QSLRASVGFIFIWVTRFAPIRMWDWG  
 Nm DGKTYDDNSSSATGGRVQNIY GAGNTHKSTFTNELRYSAGGAVTWLSPLGPMKFSYA

Co [Color bar]

Nc LPLVVRRGEEARKGLQVGVGINFL  
 Rp FPIKKKQYDDTQN-FHLRFSTHL-  
 Nm YPLKKKPEDEIQR-FQFQLGTTF-

Co [Color bar]

### 3. DISKUSSION

In der vorliegenden Arbeit wurde ein neuer, evolutionär konservierter Biogeneseapparat, der TOB-Komplex, identifiziert und funktionell charakterisiert. Dieser ist für den Import und die Insertion von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen in die Außenmembran essenziell. Tob55, die essenzielle Untereinheit des TOB-Komplexes, ist ebenfalls ein  $\beta$ -Barrel-Protein. Dieses ist nicht nur in allen eukaryotischen Genomen konserviert, sondern weist auch prokaryotische Orthologe in allen Gram-negativen Bakterien auf.

#### 3.1. Identifizierung von Tob55

Massenspektrometrische Analyse von mitochondrialen Außenmembranvesikeln aus *N. crassa* führte zur Identifizierung eines Proteins mit unbekannter Funktion. Entsprechend der üblichen Nomenklatur wurde dieses Protein Tob55 genannt (Pfanner *et al.*, 1996). Vergleichende Sequenzanalysen ergaben, dass Tob55 in allen eukaryotischen Genomen vorhanden ist, jedoch auch über Homologe in Gram-negativen Bakterien verfügt. Das Homolog von Tob55 in *S. cerevisiae* wird durch den ORF YNL026w kodiert. Tob55 wurde kürzlich auch in verschiedenen Studien des mitochondrialen Proteoms in eukaryotischen Organismen als mitochondriales Protein identifiziert, ohne jedoch dessen Funktion zu analysieren (Hazbun *et al.*, 2003; Kamath *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2002; Marcotte *et al.*, 2000; Sickmann *et al.*, 2003; Taylor *et al.*, 2003b).

Subzelluläre und submitochondriale Lokalisierung demonstrierten, dass Tob55 nur in Mitochondrien vorkommt. Proteasezugänglichkeit und Resistenz gegenüber Membranextraktion wiesen Tob55 als ein integrales Außenmembranprotein aus. Dies steht im Gegensatz zu einem früheren Befund, in welchem Tob55 der Maus als Innenmembranprotein beschrieben wurde (Da Cruz *et al.*, 2003). Allerdings wurden für die Identifizierung Innenmembranvesikel verwendet, die mit Außenmembranproteinen wie Porin verunreinigt waren. Die N-terminale Domäne von Tob55 ist im Intermembranraum lokalisiert, während der C-terminale Bereich in der Außenmembran verankert ist. Tob55 enthält keine hydrophoben  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomänen. Sekundärstrukturvorhersagen lassen vermuten, dass der C-terminale Bereich eine  $\beta$ -Barrel-Struktur mit vermutlich 16  $\beta$ -Faltblättern ausgebildet. Ein hoher Anteil an  $\beta$ -Faltblatt-Struktur wurde experimentell durch CD-

Spektroskopie von rekombinantem rückgefaltetem Tob55 bestätigt. Der gemessene  $\beta$ -Faltblattanteil von 28% ist mit dem von Tom40 (31%) vergleichbar (Ahting *et al.*, 2001). Mitochondriales Porin enthält einen höheren Anteil, der je nach Bedingungen der Analyse zwischen 30% und 70% variiert (Bay und Court, 2002). Tob55 ist demnach neben Porin und Tom40 ein weiteres mitochondriales  $\beta$ -Barrel-Protein. Im Rahmen dieser Arbeit konnten neben Tob55 auch Mdm10 und Mdm34/Mmm2 als  $\beta$ -Barrel-Proteine identifiziert werden. Beide Proteine werden für die Erhaltung der mitochondrialen Morphologie benötigt (Dimmer *et al.*, 2002; Sogo und Yaffe, 1994; Youngman *et al.*, 2004). Es ist wahrscheinlich, dass die mitochondriale Außenmembran noch weitere  $\beta$ -Barrel-Proteine enthält (Wimley, 2003).

Alle identifizierten eukaryotischen Tob55-Homologe scheinen dieselbe Topologie zu besitzen. Die  $\beta$ -Barrel-Region ist wesentlich besser konserviert, als die lösliche N-terminale Domäne. Auffällig ist ein konserviertes Motiv, GFQF<sub>x</sub>HyGH<sub>y</sub>x<sub>2</sub>FHy (Hy, hydrophober Rest), am C-terminalen Ende. Dieses Motiv kommt in nahezu allen bakteriellen  $\beta$ -Barrel-Außenmembranproteinen vor (Struyve *et al.*, 1991). Im Gegensatz zu den prokaryotischen  $\beta$ -Barrel-Proteinen, die mit einem konservierten Phenylalanin-Rest enden, enthalten die eukaryotischen Tob55-Sequenzen zusätzlich einen hydrophoben Rest als C-terminale Aminosäure. Dem Phenylalanin-Rest wurde eine wichtige Funktion bei der Insertion und Assemblierung von bakteriellen Außenmembranproteinen zugeschrieben (de Cock *et al.*, 1997). In Eukaryoten ist dieses Motiv nur noch in Tob55 konserviert.

### 3.2. Prokaryotische Homologe von Tob55

Die mitochondriale Außenmembran entspricht phylogenetisch der Außenmembran von Gram-negativen Bakterien (Gray *et al.*, 1999). Tob55 besitzt als einziges mitochondriales  $\beta$ -Barrel-Protein eindeutige prokaryotische Homologe. Tob55-Proteine weisen die höchste Homologie zu Proteinen der  $\alpha$ -Proteobakterien auf, die den Mitochondrien evolutionär am nächsten stehen (Emelyanov, 2001). Wie der phylogenetische Stammbaum zeigt, kommen Tob55-Homologe jedoch in vielen oder allen Gram-negativen Bakterien vor (Abb. 36). Im Gegensatz dazu enthalten Gram-positive Bakterien und Archäebakterien, die keine Außenmembran besitzen, keine Tob55-Homologe. Die phylogenetische Analyse unterscheidet wie erwartet klar die eukaryotischen Homologe von den prokaryotischen Proteinen (Abb. 36).

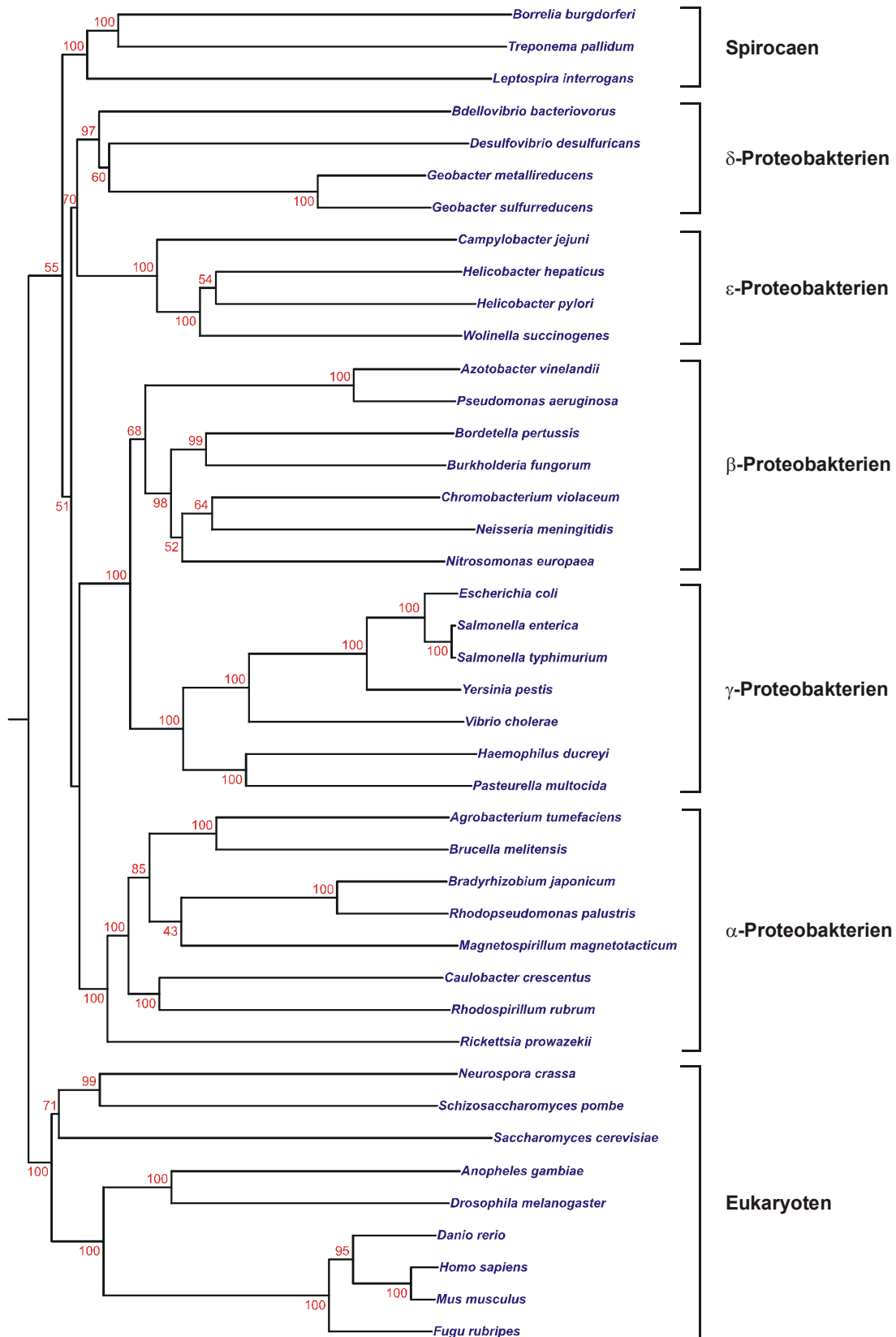


Abb. 36. Stammbaum der Tob55-Familie.

*Neighbor joining*-Analyse der Tob55-Familie. Die *Bootstrap*-Werte sind eingezeichnet. Der Stammbaum wurde mit Hilfe des DNAMAN-Programms erstellt (Lynnon Biosoft).

Tob55 ist evolutionär entfernt verwandt mit den Toc75-Außenmembranproteinen von Chloroplasten und Cyanobakterien (nicht gezeigt). Toc75 ist ebenfalls ein  $\beta$ -Barrel-Protein und bildet den Translokationskanal der Translokase der äußeren Chloroplastenmembran aus (Soll und Schleiff, 2004). Die Tob55-Familie wurde kürzlich auch als Omp85-Familie bezeichnet und ein ähnlicher Stammbaum beschrieben (Gentle *et al.*, 2004).

Ein auffälliger Unterschied zwischen den eukaryotischen und prokaryotischen Tob55-Homologen ist die Größe des Polypeptids. Die eukaryotischen Tob55-Proteine bestehen aus 450-500 Aminosäureresten, während die bakteriellen Proteine mit 750-850 Aminosäureresten nahezu doppelt so groß sind. Der Unterschied beruht auf der variablen Größe der N-terminalen Domäne, während die C-terminale Domäne, die die  $\beta$ -Barrel-Struktur ausbildet, eine relativ konstante Größe aufweist. Für alle Mitglieder der Tob55-Familie wurden 12-16  $\beta$ -Faltblätter vorhergesagt (Genevrois *et al.*, 2003; Gentle *et al.*, 2004; Paschen *et al.*, 2003; Voulhoux *et al.*, 2003).

Es ist wahrscheinlich, dass alle Mitglieder der Tob55-Familie funktionell an der Insertion von  $\beta$ -Barrel-Proteinen beteiligt sind. Unabhängig von ihrer Funktion wurden jedoch bereits früher Mitglieder der Tob55-Familie als immunogene Oberflächenantigene identifiziert. Antikörper gegen das D-15-Antigen aus *Haemophilus influenzae* schützen gegen eine Infektion mit diesem Erreger (Thomas *et al.*, 1990). Weitere Beispiele hierfür sind das D15-Protein aus *Haemophilus ducreyi*, dem Erreger des Ulcus molle (Thomas *et al.*, 2001), Oma90 aus *Shigella exneri* (Robb *et al.*, 2001), YaeT aus *Chlamydia trachomatis* (Cameron *et al.*, 2000), das Oma87-Protein aus *Pasteurella multocida* (Ruffolo und Adler, 1996) sowie das Tp92-Protein aus *Treponema pallidum*, dem Erreger der Syphilis (Cameron *et al.*, 2000). Ebenso zählen auch die Omp85-Proteine aus *Neisseria gonorrhoeae* und *Neisseria meningitidis* zu dieser Familie (Manning *et al.*, 1998).

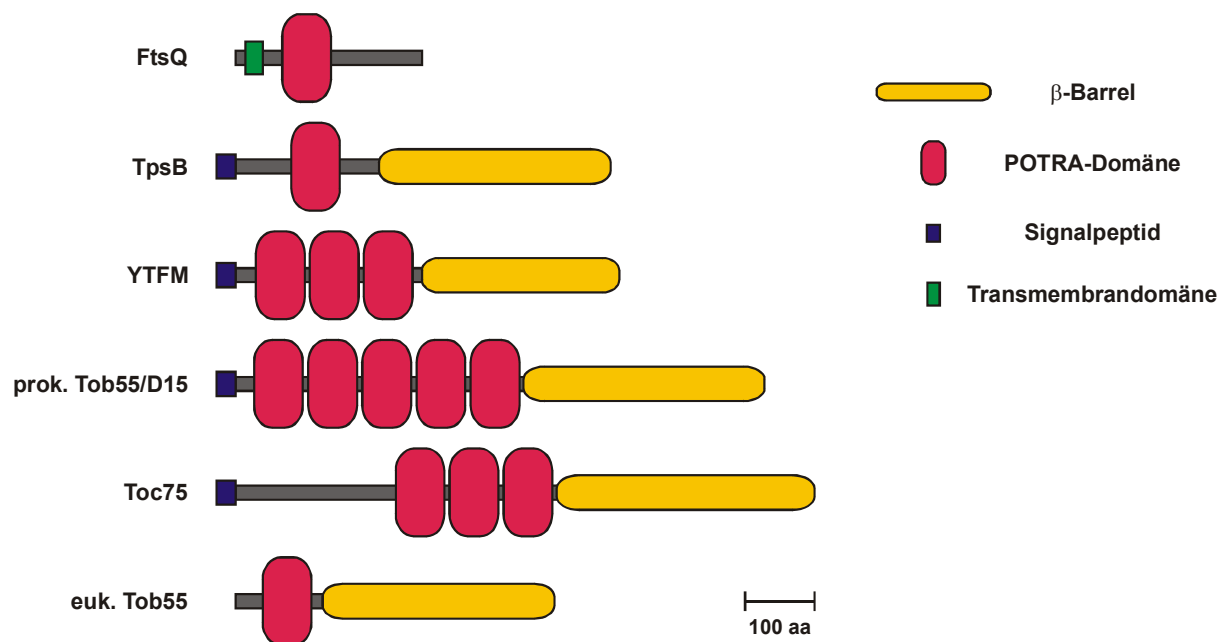
Mitglieder der Tob55-Familie wurden auch dem Zwei-Partner-Sekretionssystem (TPS-System) zugeordnet (Yen *et al.*, 2002). Diese Zuordnung basierte auf limitierter Sequenzähnlichkeit der  $\beta$ -Barrel-Domäne und kann aufgrund der unterschiedlichen funktionellen Eigenschaften von Tob55 und TPS-Mitgliedern nicht aufrechterhalten werden. Im Gegensatz zu Tob55 ist das TPS-System ein spezialisiertes Transportsystem von Gram-negativen Bakterien, das spezifische Virulenzfaktoren wie Hämolsine sekretiert (Jacob-

Dubuisson *et al.*, 2001). Es besteht jeweils nur aus zwei Proteinen, einem spezifischen Kanal und seinem Substrat. Das kanalbildende  $\beta$ -Barrel-Protein (TpsB-Familie) hat eine Größe von etwa 60 kDa und liegt vermutlich als Oligomer in der Außenmembran vor. Dieses erkennt und exportiert ausschließlich ein einziges Exoprotein (TpsA-Familie) in das extrazelluläre Medium. Das TpsA-Protein kann eine Größe von 100-500 kDa besitzen und enthält spezifische Sekretionssignale in einer konservierten N-proximalen Region, der Sekretionsdomäne. Das Exoprotein wird Sec-abhängig über die Cytoplasmamembran transportiert und durchquert das Periplasma in einem ungefalteten Zustand. Erst nach Sekretion faltet sich das Exoprotein an der Zelloberfläche in seine native Konformation und wird anschließend in das extrazelluläre Milieu entlassen. Möglicherweise ist der Translokationsprozess über beide Membranen gekoppelt. Da insbesondere pathogene Bakterien verschiedene Virulenzfaktoren sekretieren, verfügen sie über mehrere  $\beta$ -Barrel-Exportproteine vom TpsB-Typ. Sie scheinen aber, ebenso wie Eukaryoten, nur ein einziges Ortholog von Tob55 zu besitzen. Tob55- und TspB-Proteine können aufgrund ihrer Größe leicht unterschieden werden. TpsB-Proteine weisen eine durchschnittliche Größe von 600 Aminosäureresten auf, während bakterielle Tob55-Homologe 800 Aminosäurereste besitzen (Yen *et al.*, 2002).

Sánchez-Pulido *et al.* identifizierten ein konserviertes Motiv in der N-terminalen Domäne von prokaryotischen Omp85-Proteinen (D15-Proteine) (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). Dieses Motiv kommt auch in eukaryotischen Tob55-Proteinen, der Toc75-Gruppe, in TpsB-Proteinen, der YTFM-Familie sowie in der FtsQ/DivIB-Familie vor. Aufgrund der bekannten Funktion von Toc75 und der TpsB-Proteine wurde diese als POTRA-Domäne (polypeptide-transport-associated domain) bezeichnet. Die Funktion der YTFM-Familie ist nicht bekannt. Die FtsQ/DivIB-Familie ist essenziell für die Zellteilung von Gram-negativen (FtsQ) und Gram-positiven (DivIB) Bakterien (Errington *et al.*, 2003). FtsQ ist eine Ausnahme, da es keine  $\beta$ -Barrel-Struktur enthält, sondern mit einer  $\alpha$ -helikalen Transmembrandomäne in der Cytoplasmamembran verankert ist.

Die POTRA-Domäne besteht aus 60-70 Aminosäureresten und kommt je nach Familie in 1-5 repetitiven Kopien vor (Abb. 37). Sie ist im Periplasma von Bakterien bzw. im Intermembranraum von Mitochondrien oder Chloroplasten lokalisiert. Die Funktion ist bisher nicht bekannt. Sie könnte für die Substraterkennung verantwortlich sein oder auch eine chaperonartige Funktion übernehmen (Stebbins und Galan, 2001).





**Abb. 37. Schematische Darstellung der POTRA-Domänen-Verteilung.**

Für Details zu den verschiedenen Familien siehe Text. Nach Sanchez-Pulido *et al.* (2003). aa, Aminosäuren; prok, prokaryotisch; euk, eukaryotisch.

### 3.3. Funktionelle Charakterisierung des TOB-Komplexes

Tob55 ist ein essenzielles Protein für *S. cerevisiae* und somit neben Tom40 das zweite essenzielle Protein der mitochondrialen Außenmembran (Baker *et al.*, 1990). Für das Überleben der Zelle scheinen jedoch relativ wenige Kopien von Tob55 auszureichen, da nach Sporulation eines diploiden heterozygoten *tob55*-Deletionsstamms die Sporen mehrere hundert Mikrokolonien unterschiedlicher Größe ausbildeten (Brachat *et al.*, 2000). Dies würde erklären, warum trotz Reprimierung der Expression von Tob55 Hefezellen für nahezu zwei Tage weiter wachsen konnten. Die Depletion von Tob55 *in vivo* führte zu aggregierten Mitochondrien und zum spezifischen Verlust der mitochondrialen β-Barrel-Membranproteine Porin, Tom40 und Mdm10. α-Helikale verankerte Außenmembranproteine sowie Proteine der übrigen mitochondrialen Kompartimente waren nicht betroffen. Dies zeigt eindeutig die spezifische Beteiligung von Tob55 an der Biogenese von mitochondrialen β-Barrel-Proteinen. Der *in vitro* Import von verschiedenen mitochondrialen Vorstufenproteinen in Tob55-depletierte Mitochondrien zeigte, dass Tob55 für den Import und die Membraninsertion der β-

Barrel-Vorstufenproteine von Porin, Tom40 und Mdm10 benötigt wird. Tob55 selbst ist auch ein  $\beta$ -Barrel-Protein; der Import der Tob55-Vorstufe wird daher ebenfalls von Tob55 vermittelt. Da Tom40 ein essenzielles Protein ist, könnte dies die Letalität der Tob55-Depletion erklären. Tob55 ist demnach eine neue essenzielle Importkomponente, die selektiv den Import und die Insertion von  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen vermittelt. Die frühere Annahme, dass der TOM-Komplex auch die Insertion der  $\beta$ -Barrel-Proteine in die Außenmembran vermittelt, lässt sich somit nicht mehr aufrecht erhalten (Gabriel *et al.*, 2001; Rapaport, 2003).

Tob55 liegt in Mitochondrien in hochmolekularer Form als essenzielle Untereinheit des TOB-Komplexes vor. Der Name leitet sich von "*topogenesis of outer membrane  $\beta$ -barrel membrane proteins*" ab. Der TOB-Komplex weist eine Masse 220-250 kDa auf und ist nach Solubilisierung der Außenmembran mit milden Detergenzien nicht mit dem TOM-Komplex assoziiert. Er enthält neben Tob55 das nicht-essenzielle Protein Mas37. Dieses ist auf der Außenseite peripher mit der Außenmembran assoziiert. Die Funktion von Mas37 ist unklar (Kap. 3.6).

Tob55 interagiert spezifisch mit Importintermediaten von  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen, jedoch nicht mit den vollständig assemblierten  $\beta$ -Barrel-Proteinen. Eine Interaktion mit  $\alpha$ -helikal verankerten Außenmembranproteinen konnte nicht nachgewiesen werden. Vorstufen von Tom40 bilden auf dem Weg in die Außenmembran distinkte Importintermediate aus, die sich mittels BNGE unterscheiden lassen (Model *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999; Taylor *et al.*, 2003a). Tob55 wurde bereits für die Ausbildung des frühen 250K Intermediates von Tom40 benötigt. Entsprechend war die Effizienz der Reifung zum 100K Intermediat sowie zum 400K TOM-Kernkomplex reduziert. Tob55 ist Bestandteil des 250K Intermediates, nicht jedoch des 100K Intermediates oder des reifen TOM-Komplexes. Somit handelt es sich bei dem 250K Intermediat um ein TOB-Komplex-assoziiertes Tom40-Vorstufenprotein. Dieses ist noch nicht in die Lipidphase der Außenmembran integriert, ist jedoch gegen Extraktion mit hohen Salzkonzentrationen resistent. Diese Beobachtung stimmt mit früheren Analysen der Tom40-Biogenese überein (Model *et al.*, 2001; Taylor *et al.*, 2003a). Offensichtlich spielen ionische Interaktionen zwischen Tob55 und der  $\beta$ -Barrel-Vorstufe keine wesentliche Rolle. Das Tob55-assoziierte Tom40-Vorstufenprotein war in intakten Mitochondrien vor Proteaseverdau geschützt, wurde aber in Mitoplasten bereits durch geringe Mengen an Protease abgebaut. Dies weist auf eine periphere Lokalisation der Tob55-assoziierten  $\beta$ -

Barrel-Vorstufen hin, die in den Intermembranraum exponiert sind. Ob die Vorstufen mit der N-terminalen Domäne von Tob55 assoziiert sind oder sich innerhalb der Kavität des TOB-Komplexes befinden, bleibt zu klären. Tob55-assoziiertes Tom40 scheint jedoch auch in intakten Mitochondrien für Tom40-Antikörper zugänglich zu sein (Wiedemann *et al.*, 2004). Falls diese Beobachtung kein Artefakt darstellt, könnte das 250K Intermediat von Tom40 an Tob55 gebunden sein und gleichzeitig noch nicht-vollständig importierte Segmente durch den TOM-Komplex in das Cytosol exponieren. Eine andere Möglichkeit wäre, dass das Tom40-Vorstufenprotein durch den putativen TOB-Kanal Segmente auf der Außenseite der Mitochondrien exponiert oder bereits partiell in die Membran integriert ist. Dagegen ist das 100K Intermediat von Tom40 vollständig in die Membran inseriert und ist mit Tom5 assoziiert (Model *et al.*, 2001; Pfanner und Wiedemann, 2002). Die Insertion in die Lipidphase der Außenmembran findet demnach beim Übergang vom 250K zum 100K Intermediat statt. Import von Tom40 bei 4°C führte zur Akkumulation des Tob55-assoziierten Intermediats (Model *et al.*, 2001; Paschen *et al.*, 2003). Entsprechend ist die Kinetik der Ausbildung des 100K Intermediates bei dieser Temperatur limitierend für die Importrate (Model *et al.*, 2001). Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass für die Insertion der  $\beta$ -Barrel-Vorstufe in die Lipidphase diese eine gewisse Fluidität aufweisen muss. Welche Funktion Tob55 bei dem eigentlichen Insertionsschritt übernimmt, ist bisher nicht bekannt.

Auch Porin scheint ein membranassoziiertes Importintermediat auszubilden (Krimmer *et al.*, 2001; Pfaller *et al.*, 1990). Die einzelnen Intermediate und Assemblierungsstufen sind jedoch nicht detailliert charakterisiert. Tob55 wird für die Bildung aller Importstufen von Porin benötigt. Import von Mdm10 sowie Analyse der Topologie des Proteins ergaben, dass dieses größtenteils integral in der Lipidschicht der Außenmembran verankert ist. Der Import ist wie der von Porin und Tom40 von dem Rezeptor Tom20 abhängig, der demnach von allen  $\beta$ -Barrel-Vorstufen benutzt wird (Krimmer *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999). Auch Mdm10 bildet ein Tob55-assoziiertes Importintermediat aus, während das assemblierte Protein nicht mit Tob55 interagiert.

Der TOB-Komplex assoziiert mit den  $\beta$ -Barrel-Vorstufen zu einem frühen Zeitpunkt ihres Importweges und ist für die anschließende Insertion in die Membran verantwortlich. Theoretisch bestünde die Möglichkeit, dass die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen von dem Tom20-Rezeptor des TOM-Komplexes erkannt werden und direkt an den TOB-Komplex für die Insertion

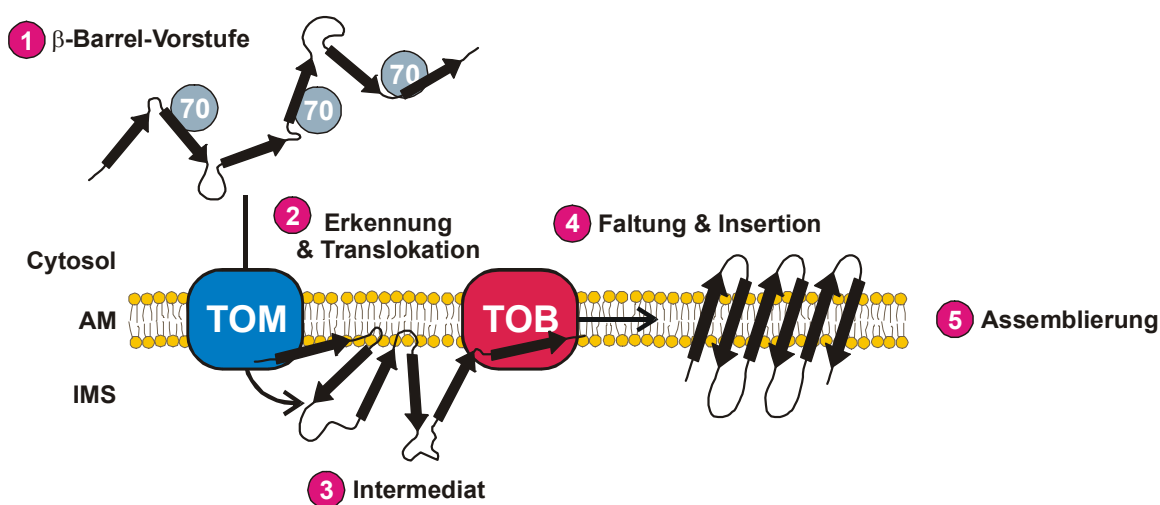
übergeben werden, wie es für Porin *in vitro* in künstlichen Lipidvesikeln gezeigt wurde (Schleiff *et al.*, 1999). Dagegen spricht jedoch die Exposition der Tob55-assoziierten Vorstufen in den Intermembranraum. Frühere Ergebnisse legten außerdem den Schluss nahe, dass für den Import von Porin und Tom40 der TOM-Kanal benötigt wird (Krimmer *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999). Bisher wurde jedoch angenommen, dass diese den TOM-Komplex nicht vollständig durchqueren, sondern lateral in die Membran inserieren. Absättigung der TOM-Importstellen durch einen Überschuss eines mitochondrialen Präproteins führte zur Blockierung der Bildung der Tob55-assoziierten Translokationsintermediate von Tom40 und Mdm10. Dieser Effekt beruht nicht nur auf Absättigung der TOM-Rezeptoren, da nach proteolytischer Entfernung der Rezeptoren  $\beta$ -Barrel-Vorstufen trotzdem noch importiert wurden und mit Tob55 assoziierten. Dieser sogenannte Bypass-Import beruht auf der Erkennung der Vorstufenproteine durch Tom40 und wurde bereits für Porin beschrieben (Endo und Kohda, 2002; Pfaller *et al.*, 1989; Takahashi *et al.*, 1993). Auch dieser lässt sich durch einen Überschuss an Präprotein blockieren. Somit müssen die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen zuerst die Außenmembran über den TOM-Komplex überqueren, bevor sie zur Insertion mit Tob55 interagieren. Die Importsignale der mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteine sind nicht charakterisiert (Rapaport, 2003).

Der Transfer von  $\beta$ -Barrel-Vorstufen vom TOM-Komplex zum TOB-Komplex ist ein gekoppelter Prozess. Nach Depletion von Tob55 bleiben die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen mit dem TOM-Komplex assoziiert und akkumulieren nicht als lösliche Translokationsintermediate im Intermembranraum. Dies zeigt, dass die Vorstufenproteine direkt vom TOM-Komplex an den TOB-Komplex übergeben werden, der für die vollständige Translokation der Vorstufen benötigt wird. In analoger Weise interagiert der TOM-Komplex beim Import von Matrix- oder Innenmembranproteinen mit den Translokasen der Innenmembran (Endo *et al.*, 2003). Auch hier werden Translokationskontaktstellen ausgebildet, wodurch die Akkumulation von löslichen Intermediaten im Intermembranraum vermieden wird. Durch die direkte Weitergabe der Vorstufen vom TOM-Komplex zu nachfolgenden Translokasen wird offensichtlich Missfaltung und Aggregation von hydrophoben Vorstufenproteine im Intermembranraum verhindert und die Effizienz der Importprozesse erhöht (Bauer *et al.*, 2000; Donzeau *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 1999b). Wie die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen vom TOM- zum TOB-Komplex gelangen, ist bisher nicht bekannt. Bisher konnte keine Interaktion zwischen diesen beiden Komplexen nachgewiesen werden. Zudem ist es unklar, ob der TOB-Komplex unabhängig

vom TOM-Komplex agieren kann, da  $\beta$ -Barrel-Vorstufen *in vitro* nicht in Mitoplasten importiert und Tob55-assoziierte Intermediate nicht ausgebildet wurden (Krimmer *et al.*, 2001; Rapaport und Neupert, 1999; Smith *et al.*, 1994). Obwohl der TOB-Komplex in Mitoplasten direkt von der Innenseite der Außenmembran zugänglich wäre, wurden die löslichen  $\beta$ -Barrel-Vorstufen nicht von diesem erkannt. Möglicherweise ist die Interaktion der Vorstufen mit dem TOM-Komplex für die Erkennung durch den TOB-Komplex notwendig.

### 3.4. Modell der Funktion von Tob55

Aus den erhaltenen Ergebnissen lässt sich für die Funktion von Tob55 ein Modell für die Topogenese der mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteine ableiten (Abb. 38). Tob55 ist die essenzielle Untereinheit des TOB-Komplexes (*topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*). Nach Synthese im Cytosol (1) werden die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen von den Rezeptoren des TOM-Komplexes erkannt und diese anschließend durch den TOM-Kanal über die Außenmembran transloziert (2). Die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen bleiben mit dem TOM-Komplex assoziiert bis sie in einem gekoppelten Prozess von einem TOB-Komplex übernommen werden (3). Dieser vermittelt die Faltung und Insertion der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen in die Lipidphase der Außenmembran (4). Ein lösliches Intermediat im Intermembranraum existiert nicht. Zuletzt erfolgt die Assemblierung der inserierten Monomere in die funktionelle Einheiten (5).



**Abb. 38. Modell der Funktion von Tob55.**

Beschreibung siehe Text. 70, cytosolisches Hsp70; AM, Außenmembran; IMS, Intermembranraum.

### 3.5. Die Rolle der 70 kDa TIM-Komplexe

Der mitochondriale Intermembranraum enthält zwei lösliche 70 kDa TIM-Komplexe, den TIM8/13- sowie den TIM9/10-Komplex (Bauer *et al.*, 2000; Paschen und Neupert, 2001). Diese transferieren Vorstufenproteine vom TOM- zum TIM22-Komplex und schützen diese vor Missfaltung und Aggregation. Der TIM9/10-Komplex wird von Mitgliedern der mitochondrialen Carrier-Familie benutzt, während der TIM8/13-Komplex vermutlich nur am Transport von Tim23 beteiligt ist (Paschen *et al.*, 2000).

Kürzlich wurden Hinweise dafür gefunden, dass die 70 kDa TIM-Komplexe auch am Import von  $\beta$ -Barrel-Proteinen beteiligt sind. In Abwesenheit dieser Komplexe war der Import von Porin und Tom40 in isolierte Mitochondrien vermindert (Hoppins und Nargang, 2004; Wiedemann *et al.*, 2004). Diese Komplexe interagieren offensichtlich zu einem frühen Zeitpunkt des Importweges mit  $\beta$ -Barrel-Vorstufen. In Abwesenheit der 70 kDa Komplexe ist die Weitergabe der Vorstufen vom TOM-Komplex an den TOB-Komplex verzögert. Es wurde daher vorgeschlagen, dass diese mit den  $\beta$ -Barrel-Vorstufen interagieren sobald diese den TOM-Kanal verlassen. In isolierte Außenmembranvesikel, die keine 70 kDa TIM-Komplexe enthielten, wurde Porin jedoch mit nahezu der selben Effizienz wie in Mitochondrien importiert, während Carrier-Vorstufen mit der Außenseite der Vesikel assoziiert blieben (Gasser und Schatz, 1983; Mayer *et al.*, 1993). Die 70 kDa TIM-Komplexe sind somit für den Transfer der Vorstufenproteine vom TOM- zum TOB-Komplex nicht essenziell, scheinen jedoch diesen zu unterstützen, in dem sie möglicherweise Segmente der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen vor Missfaltung und Aggregation bewahren, bis diese vom TOB-Komplex inseriert werden. Mutationen in dem humanen Tim8-Homolog DDP1 führen zum Mohr-Tranebjaerg-Syndrom, dessen Ursache bisher nicht bekannt ist (Bauer und Neupert, 2001). Ob eine reduzierter Import von Außenmembranproteinen möglicherweise die molekulare Ursache darstellt, ist eine interessante aber bisher spekulative Annahme (Hoppins und Nargang, 2004).

### 3.6. Mas37 als Untereinheit des TOB-Komplexes

Neben Tob55 enthält der TOB-Komplex aus *S. cerevisiae* eine weitere Komponente, Mas37/Tom37 (Gratzer *et al.*, 1995). Es ist ein nicht-essenzielles Protein, dessen Topologie nicht eindeutig geklärt ist (Gratzer *et al.*, 1995; Ryan *et al.*, 1999). Mas37 enthält keine

hydrophobe Transmembrandomäne und ist wahrscheinlich peripher mit der Außenseite der Außenmembran assoziiert. Die Rolle von Mas37 ist nicht bekannt; es ist jedoch für die Funktion des TOB-Komplexes entbehrlich. Der TOB-Komplex enthält wahrscheinlich eine Kopie von Mas37. Mitochondrien ohne Mas37 bilden einen funktionellen TOB-Kernkomplex aus, der eine um etwa 40 kDa reduzierte Masse aufweist. Mas37 könnte aufgrund der peripheren Lokalisierung eine Art Rezeptorfunktion ausüben, da die Doppeldeletionen mit den Rezeptoren Tom20 oder Tom70 zu einem letalen Phänotyp führen (Gratzer *et al.*, 1995).

Mas37 wurde kürzlich als Untereinheit des so genannten SAM-Komplexes (*sorting and assembly complex*) beschrieben (Wiedemann *et al.*, 2003). Dieser ist, wie später gezeigt wurde, mit dem TOB-Komplex identisch (Kozjak *et al.*, 2003). Mas37 interagiert mit Tob55, welches auch als Sam50 oder Omp85 bezeichnet wurde (Gentle *et al.*, 2004; Kozjak *et al.*, 2003). Deletion von Mas37 verminderte die Effizienz des Imports von  $\beta$ -Barrel-Proteinen *in vitro*. Diese akkumulierten in Assoziation mit dem TOB-Kernkomplex. Mas37 scheint daher keinen Einfluss auf die Translokation der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen über den TOM-Komplex und die Weitergabe an den TOB-Komplex zu besitzen. Ob Mas37 direkt mit  $\beta$ -Barrel-Vorstufen interagiert, ist bisher nicht geklärt.

Mas37 ist ein für *S. cerevisiae* spezifisches Protein, da keine Homologe in anderen Organismen identifiziert werden konnten (Abdul *et al.*, 2000; Gratzer *et al.*, 1995; Hoogenraad *et al.*, 2002; Wiedemann *et al.*, 2003). Dies ist nicht überraschend; *S. cerevisiae* enthält weitere am Import beteiligte Proteine, die keine Homologe in anderen Organismen aufweisen. Dazu gehören Tom71, Tim12, Tim18 und Tim54 (Kerscher *et al.*, 1997; Kerscher *et al.*, 2000; Koehler *et al.*, 2000; Schlossmann *et al.*, 1996; Sirrenberg *et al.*, 1998). Ob jedoch Orthologe zu diesen Proteinen existieren, ist bisher nicht bekannt (Hoogenraad *et al.*, 2002). Der Vollständigkeit halber sollte erwähnt werden, dass das humane Außenmembranprotein Metaxin aufgrund einer limitierten Sequenzähnlichkeit als Homolog von Mas37 diskutiert wurde (Armstrong *et al.*, 1997). Dies ist jedoch höchst unwahrscheinlich, da sich die Topologie der beiden Proteine wesentlich unterscheidet und Metaxin die Funktion von Mas37 nicht komplementieren kann (Armstrong *et al.*, 1997; Hoogenraad *et al.*, 2002). In humanen Mitochondrien liegt Metaxin zudem als Monomer und nicht in einem Komplex vor (Abdul *et al.*, 2000).

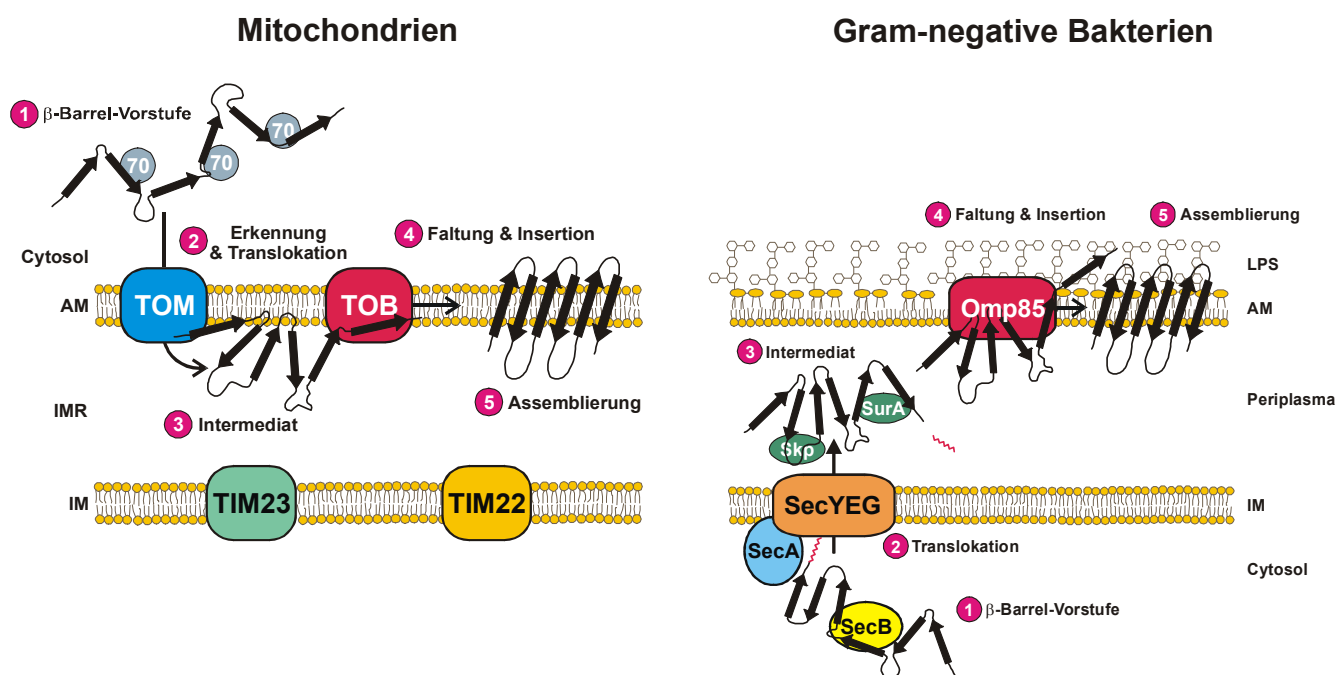
### 3.7. Ein evolutionär konservierter Biogeneseweg

Das mit Tob55-verwandte  $\beta$ -Barrel-Protein Omp85 des Gram-negativen Bakteriums *Neisseria meningitidis* ist ebenfalls essenziell für die Biogenese von  $\beta$ -Barrel-Außenmembranproteinen (Voulhoux *et al.*, 2003). Omp85 ist wie Tob55 ein essenzielles Protein und bildet einen oligomeren Komplex aus der eine vergleichbare Größe wie der TOB-Komplex aufweist (Manning *et al.*, 1998). Omp85 interagiert *in vitro* spezifisch mit denaturiertem PorinA (Voulhoux *et al.*, 2003). In der Abwesenheit von Omp85 akkumulierten verschiedene  $\beta$ -Barrel-Proteine als Translokationsintermediate im Periplasma. Offensichtlich ist in Bakterien die Translokation über die Innenmembran unabhängig von der Insertion in die Außenmembran. Im Unterschied dazu akkumulieren in Tob55-depletierten Mitochondrien keine  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine im Intermembranraum. Dies ist möglicherweise auf das Fehlen von spezifischen Chaperonen wie Skp im Intermembranraum von Mitochondrien zurückzuführen.

Aufgrund der Sequenzverwandschaft von Tob55 mit Omp85 und der konservierten Funktion der beiden Proteine ist Omp85 ein prokaryotisches Ortholog zu Tob55. Der Vergleich der  $\beta$ -Barrel-Membranprotein-Biogenese zwischen Mitochondrien und Gram-negativen Bakterien zeigt, dass es sich dabei um einen evolutionär konservierten Biogeneseweg handelt (Abb. 39). In Gram-negativen Bakterien enthält die  $\beta$ -Barrel-Vorstufe eine N-terminale Signalsequenz, die die Sec-abhängige Translokation über die Cytoplasmamembran vermittelt (1&2). Diese wird im Periplasma prozessiert. Periplasmatische Chaperone wie Skp oder SurA binden an die  $\beta$ -Barrel-Vorstufe und verhindern dadurch Missfaltung und Aggregation (3). Vermutlich unterstützen diese auch die Faltung der  $\beta$ -Barrel-Vorstufe in eine insertionskompetente Konformation. Die Ausbildung der  $\beta$ -Barrel-Struktur erfolgt während der Omp85-vermittelten Insertion in die Lipidschicht (4). Anschließend findet die Assemblierung zu funktionellen Komplexen statt (5). Die mitochondriale Außenmembran stammt von der prokaryotischen Außenmembran ab. Tob55 besitzt deshalb dieselbe Topologie wie Omp85 (Abb. 39). In Eukaryoten erfolgt die Synthese der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen an cytoplasmatischen Ribosomen (1). Diese überqueren zuerst mittels des TOM-Komplexes die Außenmembran (2) und werden dann auf der Innenseite von Tob55 erkannt. Anschließend folgt die  $\beta$ -Barrel-Vorstufe dem konservierten Biogeneseweg und wird von dem TOB-Komplex in die Lipidschicht inseriert (4). Zuletzt erfolgt die Komplex-Assemblierung (5). Im Gegensatz zu Gram-negativen Bakterien wurde in Mitochondrien kein freies Intermediat im



Intermembranraum gefunden (3). Die vollständige Translokation über die Außenmembran ist hier an die Interaktion mit dem TOB-Komplex gekoppelt. Dies könnte auf das Fehlen von effektiven Chaperonen im Intermembranraum zurückzuführen zu sein, die die Vorstufen in einer insertionskompetenten Konformation erhalten.



**Abb. 39. Evolutionär konservierter Biogeneseweg für  $\beta$ -Barrel-Membranproteine.**

Details siehe Text. 70, cytosolische Hsp70; AM, Außenmembran; IMR, Intermembranraum; IM, Innenmembran; LPS, Lipopolysaccharid.

Ist auch in Chloroplasten und Hydrogenosomen die Topogenese von  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen konserviert? Obwohl Chloroplasten und Hydrogenosomen evolutionär weit von Mitochondrien entfernt sind, werden nicht-mitochondriale  $\beta$ -Barrel-Vorstufen aus diesen Organellen von den mitochondrialen TOM- und TOB-Komplexen erkannt und korrekt in die Außenmembran inseriert. Beispiele dafür sind das Chloroplasten-Porin Oep24 (Rohl *et al.*, 1999), das Hmp35-Protein aus Hydrogenosomen des Protisten *Trichomonas vaginalis* (Dyall *et al.*, 2003) sowie PorB aus *Neisseria gonorrhoeae* (Muller *et al.*, 2002). Ein Ortholog zu Tob55 in Chloroplasten oder Hydrogenosomen wurde bisher nicht identifiziert (Embley *et*

*al.*, 2003; Soll und Schleiff, 2004). Es wurde jedoch gezeigt, dass auch in Chloroplasten die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen zuerst die äußere Membran überqueren (Tranel und Keegstra, 1996).

Auch die strukturellen und funktionellen Gemeinsamkeiten zwischen den verschiedenen bakteriellen  $\beta$ -Barrel-Proteintransportern und der Tob55-Familie lassen vermuten, dass der Mechanismus und die Regulation des Proteintransports evolutionär früh entstanden sind (Yen *et al.*, 2002). Ob die konservierte  $\beta$ -Barrel-Struktur von Tob55 eine physiologische Bedeutung hat, lässt sich trotz der auffälligen Ähnlichkeiten bisher nicht beurteilen, da Tob55 und Omp85 die Insertion von Proteinen vermitteln, während die anderen prokaryotischen und eukaryotischen Translokationssysteme für die Sekretion von Proteinen über eine Membran verantwortlich sind.

### 3.8. Elektrophysiologische Charakterisierung von Tob55

Bei Insertion von rekombinantem Tob55 in eine künstliche Lipidschicht, bildet dieses Kanäle mit einer Leitfähigkeit von 3.7 nS (bei 1 M KCl) aus. Eine Verunreinigung der Präparation von rekombinantem Tob55 mit bakteriellen Porinen kann ausgeschlossen werden, da sich der Einbau der Kanäle durch Tob55-Antikörper spezifisch hemmen ließ. Auch weisen typische bakterielle Porine eine maximale Leitfähigkeit von 2.3 nS auf (Benz, 1985). Mitochondriales Porin besitzt dagegen eine höhere Leitfähigkeit von 4.2 nS (Freitag *et al.*, 1983; Ludwig *et al.*, 1988). Tob55 zeigte auch eine zu Porinen unterschiedliche Spannungsabhängigkeit (Court *et al.*, 1996). Die Leitfähigkeit von Tob55 ist höher als die von Tom40- (2.8 nS) oder Toc75-Kanälen (1.4 nS) oder den Kanälen der bakteriellen Transporter BrkA (3 nS) oder TolC (0.08 nS) (Ahting *et al.*, 2001; Andersen *et al.*, 2002; Hill *et al.*, 1998; Schleiff *et al.*, 2003; Shannon und Fernandez, 1999). Zudem bilden andere bakterielle Transporter keine messbaren Poren aus (Shannon und Fernandez, 1999). All diese  $\beta$ -Barrel-Translokasen transportieren Substratproteine in einer ungefalteten Konformation. Es lässt sich daher kein Zusammenhang zwischen Porengröße (Leitfähigkeit) der Translokase und Zustand des zu transportierenden Substrates ableiten. Somit bleibt die physiologische Relevanz der gemessenen Leitfähigkeit des Tob55-Kanals offen.

### 3.9. Elektronenmikroskopische Analyse des TOB-Komplexes

Die elektronenmikroskopische Analyse von nativem TOB-Komplex sowie rekombinantom rückgefaltetem Tob55 wies einheitliche zylindrische Partikel auf, die vermutlich eine Aufsicht des Komplexes darstellen. Dieser schien zusätzlich von einer Lipid- oder Detergenzschicht umgeben zu sein. Der äußere Durchmesser der Partikel betrug 15 nm. Die zylindrischen Partikel enthielten eine ringförmige Kavität mit einem Durchmesser von 7-8 nm, in der zusätzlich eine zentrale Dichte mit einem Durchmesser von 4-5 nm enthalten war. Diese trat im Falle des rekombinanten Tob55 deutlicher hervor. Die weitere Analyse ergab, dass der TOB-Komplex möglicherweise über eine fünffache Symmetrie verfügt. Die Auflösung der Aufnahmen ist jedoch zu gering, um daraus eine Zusammensetzung oder eine Anordnung der Untereinheiten abzuleiten. Die Partikel des nativen TOB-Komplexes sowie des rekombinanten Tob55 wiesen gleiche Ausmaße und Symmetrie auf. Dies zeigt, dass rekombinantes Tob55 in seine native Struktur zurückfalten und zu einem TOB-Komplex assemblieren kann. Tob55-Oligomere stellen somit die strukturelle Basis des TOB-Komplexes dar. Die meisten bekannten Strukturen bakterieller  $\beta$ -Barrel-Proteine wurden durch Rückfaltung rekombinanter Proteine erhalten, was vermutlich durch die spezifischen Eigenschaften der  $\beta$ -Barrel-Struktur ermöglicht wird (Buchanan, 1999). Der fehlende Unterschied zwischen nativen und rekombinanten Partikeln lässt auch vermuten, dass Mas37 für die Assemblierung des TOB-Komplexes nicht benötigt wird und keinen signifikanten Einfluss auf die Struktur besitzt. Mangels eines Antikörpers gegen Mas37 ließ sich jedoch nicht bestimmen, ob die Präparation des nativen TOB-Komplexes noch Mas37 enthielt. Der oligomere Zustand des TOB-Komplexes bleibt somit weiterhin unklar.

Die äußeren Dimensionen des TOB- und des TOM-Komplexes sind ungefähr vergleichbar. Der TOM-Komplex besitzt einschließlich der Lipid-/Detergenzschicht einen Durchmesser von 12.5 nm (*S. cerevisiae*) bzw. 13.8 nm (*N. crassa*) (Kunkele *et al.*, 1998; Model *et al.*, 2002). Der Toc-Kernkomplex aus Chloroplasten besitzt mit 13 nm Durchmesser ebenfalls eine ähnliche Größe (Schleiff *et al.*, 2003). In allen diesen Komplexen bildet ein  $\beta$ -Barrel-Protein den proteinleitenden Kanal aus. Die Kavität des TOB-Komplexes verfügt im Gegensatz zu anderen Translokasen über einen verhältnismäßig großen Durchmesser (7-8 nm). Der TOM-Komplex besitzt zwei Poren mit einem Durchmesser von etwa 2.5 nm, während der Toc-Komplex über vier Poren mit einem Durchmesser von je 2-4 nm oder nur über eine einzige

große Pore verfügt, die wie der TOB-Komplex eine interne Struktur enthält (Ahting *et al.*, 1999; Kunkele *et al.*, 1998; Schleiff *et al.*, 2003). Nicht ganz auszuschließen ist auch die Möglichkeit, dass die zentrale Kavität des TOB-Komplexes mit Lipiden gefüllt ist und keine Funktion bei der Insertion von  $\beta$ -Barrel-Vorstufen besitzt.

### 3.10. Ist der TOB-Komplex eine unspezifische Pore?

Aufgrund der Größe der Kavität des TOB-Komplexes und dessen Ionenleitfähigkeit stellt sich die Frage, ob diese eine offene Pore in der mitochondrialen Außenmembran darstellt. Porin (Por1) ist für den Metabolitentransport über die Außenmembran verantwortlich, während Porin2 keine Transportaktivität besitzt (Blachly-Dyson *et al.*, 1997). Deletion von Porin ist jedoch nicht letal, da der TOM-Komplex anscheinend einige Transportprozesse übernehmen kann. Wird zusätzlich der TOM-Kanal blockiert, findet kein signifikanter Metabolitentransport über die Außenmembran mehr statt (Antos *et al.*, 2001a; Antos *et al.*, 2001b; Benz *et al.*, 1989; Kmita und Budzinska, 2000). Demnach ist es unwahrscheinlich, dass der TOB-Komplex eine geöffnete durchgehende Pore in der Außenmembran ausbildet. Es wäre jedoch möglich, dass die Menge an TOB-Komplexen nicht ausreicht, um einen messbaren Substrataustausch zu erhalten. Ein bakterielles Tob55-Ortholog, Omp85 aus *T. pallidum*, wies jedoch nach Rekonstitution in Lipidvesikel keinerlei Porin-ähnliche Transportaktivität auf (Cameron *et al.*, 2000).

### 3.11. Wie inserieren $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteine in die Außenmembran?

Vor Insertion in die Außenmembran scheinen bakterielle  $\beta$ -Barrel-Vorstufen im Periplasma mit Hilfe von spezifischen Chaperonen eine insertionskompetente Konformation anzunehmen, bevor sie Omp85-abhängig inseriert werden (Eppens *et al.*, 1997; Kleinschmidt, 2003; Voulhoux *et al.*, 2003). Die Ausbildung der  $\beta$ -Barrel-Struktur und die damit verbundene Insertion in die hydrophobe Umgebung der Lipidschicht ist eine exergone Reaktion. Dies könnte die Triebkraft für *in vitro* beobachtete spontane Insertionen von bakteriellen Porinen in Lipidvesikel darstellen (Tamm *et al.*, 2001).

Auch mitochondriales Porin kann nach Isolierung mit Detergenzien spontan in künstliche Lipidmembranen inserieren (Pfaller *et al.*, 1985; Xu und Colombini, 1996; Zizi *et al.*, 1995).

Diese spontanen Insertionsprozesse verlaufen *in vitro* jedoch anders ab als *in vivo* und stellen einen physiologisch nicht relevanten Prozess dar (Kleinschmidt, 2003; Schleiff *et al.*, 1999; Xu und Colombini, 1996; Zizi *et al.*, 1995). *In vivo* wurden spontane, unspezifische Insertionen von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteinen bisher nicht beobachtet. Interessanterweise katalysieren jedoch bereits inserierte Porin-Moleküle *in vitro* die anschließende Insertion weiterer Moleküle in derselben Orientierung, in dem sie als eine Art Matrize dienen (*auto-directed insertion*). Analog zu diesem Prozess könnte Tob55 eine generelle Matrize darstellen, die in Mitochondrien in effizienter Weise die gerichtete Insertion von allen  $\beta$ -Barrel-Vorstufen katalysiert. Die N-terminale Domäne von Tob55 könnte in die Lipidphase der Außenmembran eindringen, um die geordnete Struktur dieser aufzuheben und somit die Insertion der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen zu ermöglichen. Dabei könnte diese gleichzeitig auch als Rezeptordomäne fungieren, in dem sie die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen vom TOM-Komplex oder den 70 kDa TIM-Komplexen übernimmt. Der in der N-terminalen Domäne enthaltene POTRA-Domäne, die in allen Tob55-Homologen vorkommt, wurde auch eine chaperonartige Funktion zugesprochen (Sanchez-Pulido *et al.*, 2003). Die N-terminale Domäne von Tob55 könnte sich jedoch auch als eine Art "Stöpsel" in die Kavität zurückfallen und diese verschließen wie es bereits für bakterielle Sekretine oder TPS-Systeme diskutiert wurde (Brok *et al.*, 1999; Buchanan *et al.*, 1999; Guedin *et al.*, 2000; Nouwen *et al.*, 2000). Für Gram-negative Bakterien ist die Regulierung oder der Verschluss eines großen Kanals essenziell, um die Barrierefunktion der bakteriellen Außenmembran aufrechtzuerhalten (Nikaido, 2003). Dies besitzt für Mitochondrien wahrscheinlich keine Bedeutung. Für Tob55 konnten jedoch bisher keine Hinweise erhalten werden, ob die zentrale Masse in der TOB-Kavität der N-terminalen Domäne entspricht.

### 3.12. Bakterielle Proteintoxine

Während die Insertion von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Vorstufen nur von der Innenseite der Außenmembran erfolgen kann und von Tob55 katalysiert wird, inserieren einige bakterielle Proteintoxine ( $\beta$ -PFT) ohne jegliche Hilfe von anderen Proteinen in Zellmembranen und bilden dort  $\beta$ -Barrel-Poren aus (Heuck *et al.*, 2001; Johnson und Jensen, 2004). Die meisten dieser bakteriellen Toxine benötigen jedoch einen spezifischen Rezeptor auf der Oberfläche der Zellen. Im Unterschied zu den meisten bakteriellen oder eukaryotischen  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen deren  $\beta$ -Barrel-Struktur durch eine einzige Polypeptidkette gebildet wird,

trägt jedes einzelne Toxin-Monomer meistens nur zwei  $\beta$ -Faltblätter zur Pore bei. Die Ausbildung der Poren erfolgt in konzertierten Schritten. Zuerst assoziieren wasserlösliche Monomere eines porenbildenden Toxins, die eine gemischte  $\alpha/\beta$ -Struktur besitzen, auf der Membranoberfläche zu einem oligomeren Intermediat. Anschließend erfolgt durch allosterische Interaktionen zwischen den Untereinheiten die Konvertierung in eine membraninsetierte Konformation mit gleichzeitiger Ausbildung der  $\beta$ -Barrel-Pore. Die Insertion in die Lipidphase ist exergon, da durch die Ausbildung des Wasserstoffbrücken-Netzwerks der  $\beta$ -Barrel-Struktur diese praktisch irreversibel ist (Wimley, 2003). Im Gegensatz zu mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Vorstufenproteinen besitzen die Toxin-Monomere in Lösung eine gefaltete, stabile Konformation (Heuck *et al.*, 2001).

### 3.13. Besitzt der TOB-Komplex eine Anfinsen-Käfig-ähnliche Funktion?

Die Kavität des TOB-Komplexes könnte bei der Faltung und Insertion von  $\beta$ -Barrel-Vorstufen die Funktion eines Anfinsen-Käfig ausüben, wie dies für Chaperonine beschrieben wurde (Ellis, 1996). Diese verhindern unproduktive inter- und intramolekulare Interaktionen eines ungefalteten Proteins durch Einschluss in einen von der Umgebung abgeschlossen passiven Hohlraum und ermöglichen so die schnelle und effiziente Faltung (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Die Kavität des TOB-Komplexes ist mit einem Durchmesser von 7-8 nm theoretisch groß genug, um eine Polypeptidkette mit 16-18  $\beta$ -Faltblättern aufzunehmen. Ein  $\beta$ -Barrel-Vorstufenprotein könnte sich dann abgeschlossen von störenden Einflüssen in der Kavität in seine insertionskompetente oder native Konformation falten, um anschließend in die Lipidphase der Außenmembran zu inserieren. Im Falle von Chaperoninen ist die Faltung und Freisetzung von Substraten durch ATP-Hydrolyse reguliert (Hartl und Hayer-Hartl, 2002). Die Freisetzung der gefalteten Substrate aus den Chaperoninen erfolgt zurück über die Kavität. Im Gegensatz dazu, ist die Funktion von Tob55 nicht von ATP-abhängig. Für die Insertion in die Membran könnten die partiell oder vollständig gefalteten Vorstufenproteine die Kavität des TOB-Komplexes wie bei Chaperoninen wieder verlassen. Die N-terminale Domäne könnte anschließend als Rezeptor für die gefalteten Vorstufen dienen und deren Insertion in die Membran vermitteln wie oben diskutiert wurde. Die laterale Freisetzung der gefalteten Vorstufenproteine aus der Kavität in die Lipidschicht ist eher unwahrscheinlich, da strukturerhaltende Wasserstoffbrücken der  $\beta$ -Barrel-Struktur von Tob55 gelöst werden

müssten (Schulz, 2003). Bisher existieren keine Hinweise darauf, daß die Kavität des TOB-Komplexes für dessen Funktion benötigt wird.

### **3.14. TOB-Komplex und Apoptose**

In Säugern besitzen Mitochondrien auch eine essenzielle Funktion bei der Regulierung von apoptotischen Prozessen (Kuwana und Newmeyer, 2003). Die durch proapoptische Bcl2-Proteine induzierte Freisetzung von Faktoren wie Cytochrom *c*, AIF und Smac/DIABLO aus dem Intermembranraum in das Cytoplasma führt zur Aktivierung von Caspasen. Wie diese kleinen Proteine die Außenmembran überqueren, ist umstritten. Es wurden dafür verschiedene Mechanismen wie die unspezifische Ruptur der Außenmembran oder der Ausbildung von Poren durch Bcl2-Proteine (z. B. Bax) und/oder mitochondriales Porin/VDAC postuliert (Kuwana und Newmeyer, 2003). Bisher wurde jedoch keines dieser Modelle eindeutig bewiesen. Auf der Basis von elektrophysiologischen Messungen wurde in menschlichen sowie in Hefe-Mitochondrien die Existenz einer großen Pore mit etwa 4 nm Durchmesser postuliert, die durch Bcl2-Proteine reguliert wird (Pavlov *et al.*, 2001). Das porenbildende Protein wurde jedoch nicht identifiziert. Aufgrund der großen Kavität des TOB-Komplexes besteht die Möglichkeit, dass der TOB-Kanal für die Freisetzung von Cytochrom *c* verantwortlich ist.

## 4. ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit konnte in *Saccharomyces cerevisiae* ein neuer Translokationsapparat der mitochondrialen Außenmembran identifiziert werden, der TOB-Komplex (*topogenesis of mitochondrial outer membrane  $\beta$ -barrel proteins*). Dieser wird für den Import und die Insertion von mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Proteinen, wie Porin und Tom40, benötigt. In Eukaryoten kommen  $\beta$ -Barrel-Membranproteine nur in der Außenmembran von Mitochondrien und Chloroplasten vor; in Prokaryoten nur in der Außenmembran von Gram-negativen Bakterien. Die essenzielle Untereinheit des TOB-Komplexes ist Tob55, das in allen eukaryotischen Genomen präsent ist, aber auch in allen Gram-negativen Bakterien Homologe aufweist. Der TOB-Komplex weist eine molekulare Masse von 220-250 kDa auf und enthält neben Tob55 das nicht-essenzielle Protein Mas37. Dieses ist als peripheres Membranprotein auf der Außenseite der Außenmembran lokalisiert. Die Funktion von Mas37 ist unklar, eine stabilisierende Wirkung auf den TOB-Komplex erscheint möglich. Der TOB-Komplex enthält einen ionenleitenden Kanal. Elektronenmikroskopische Aufnahmen weisen zylindrische Partikel mit einem Durchmesser von 15 nm auf, die eine Kavität von 7-8 nm Durchmesser enthalten. Zusätzlich scheint diese eine zentrale Masse zu enthalten, die möglicherweise von der löslichen N-terminalen Domäne von Tob55 gebildet wird. Diese könnte eine Funktion bei der Regulation des Kanalzugangs ausüben.

Tob55 wird von dem offenen Leserahmen YNL026w kodiert und ist ein integrales  $\beta$ -Barrel-Außenmembranprotein. Die N-terminale Domäne ist im Intermembranraum lokalisiert, während der C-terminale Bereich die membranintegrierte  $\beta$ -Barrel-Struktur ausbildet. Tob55 ist ein essenzielles Protein für *S. cerevisiae* und ist somit neben Tom40 das zweite essenzielle Außenmembranprotein. Depletion von Tob55 *in vivo* führt zum spezifischen Verlust der mitochondrialen  $\beta$ -Barrel-Membranproteine Porin, Tom40 und Mdm10. Mdm10 konnte als neues mitochondriales  $\beta$ -Barrel-Protein identifiziert werden. Außenmembranproteine die durch  $\alpha$ -Helices verankert sind, waren bei der Depletion von Tob55 nicht beeinträchtigt. Tob55 ist für den Import der  $\beta$ -Barrel-Membranproteine essenziell. Es interagiert mit frühen Importintermediaten der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen, nicht jedoch mit assemblierten  $\beta$ -Barrel-Proteinen. Vor Interaktion mit Tob55 müssen die  $\beta$ -Barrel-Vorstufen zuvor mittels des TOM-Komplexes die Außenmembran überqueren. Interaktion der TOM-



assoziierten  $\beta$ -Barrel-Vorstufen mit Tob55 ist für die vollständige Translokation über den TOM-Komplex notwendig. Ein lösliches Intermediat im Intermembranraum scheint nicht vorzukommen. Anschließend erfolgt die Tob55-vermittelte Insertion von der Innenseite der Außenmembran in die Lipidschicht. Ob der TOB-Komplex aktiv an der Faltung der  $\beta$ -Barrel-Vorstufen in eine insertionskompetente Konformation beteiligt ist oder die Ausbildung der  $\beta$ -Barrel-Struktur innerhalb der TOB-Kavität stattfindet, ist bisher nicht bekannt. Da Mitochondrien von einem endosymbiotischen bakteriellen Vorläufer abstammen, haben sich offenbar essenzielle Elemente des Biogeneseapparates von  $\beta$ -Barrel-Membranproteinen während der Evolution erhalten.

## 5. MATERIAL UND METHODEN

### 5.1. Molekularbiologische Methoden

Molekularbiologische Standardmethoden wurden weitgehend nach Sambrook *et al.* durchgeführt (Sambrook und Russel, 2001).

#### 5.1.1. Isolierung von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mittels alkalischer Lyse (Birnboim und Doly, 1979). Für die Isolierung kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden die Bakterien in 1,5 ml LB<sub>Amp</sub>-Medium (Luria Bertani-Medium; 10 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefeextrakt, 10 g/l NaCl, pH 7.4; supplementiert mit 100 µg/ml Ampicillin) über Nacht bei 37°C geschüttelt (160 rpm). Die Bakterienzellen wurden für für 30 s bei Raumtemperatur (RT) in einer Tischzentrifuge sedimentiert und das Zellpellet in 250 µl Lösung 1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM Ethylendiamin-tetraacetat (EDTA), pH 8.0) resuspendiert. Durch Zugabe von 250 µl Lösung 2 (200 mM NaOH, 1% (w/v) Natrium-dodecylsulfat (SDS)) wurden die Zellen lysiert. Nach Inkubation für 5 min bei RT wurde das Zelllysate mit 350 µl Lösung 3 (3 M Kaliumacetat, pH 5.5) neutralisiert. Nach 5 min Zentrifugation bei RT (13.000 rpm, Tischzentrifuge) wurde die DNA aus dem Überstand durch Ethanol-Fällung gereinigt und aufkonzentriert. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 1/10-Volumen einer 3 M Natriumacetat-Lösung pH 6.0 und dem 2.5-fachen Volumen Ethanol versetzt und anschließend durch Zentrifugation (20 min, 15.000xg, 4 °C) sedimentiert. Das DNA-Pellet wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und in 50 µl Wasser resuspendiert.

Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurde der "Jetstar-Kit" der Firma Genomed verwendet. Eine Anionentauscher-Säule wurde mit 10 ml Lösung E4 (0.6 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, 0.15% (v/v) Triton X-100, pH 5.0) voräquiliert. Bakterien einer 50 ml über Nacht-Kultur in LB<sub>amp</sub>-Medium wurden durch Zentrifugation (5 min, 4400xg, RT) sedimentiert. Die Zellen wurden in 4 ml Lösung E1 (50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert und anschließend durch Zugabe von 4 ml Lösung E2 (200 mM NaOH, 1% (v/v) SDS) durch Inkubation für 5 min bei RT lysiert. Das Zelllysate wurde

durch Zugabe von 4 ml Lösung E3 (3.2 M Kaliumacetat, pH 5.5) neutralisiert. Nach Zentrifugation (10 min, 15.000xg, RT) wurde der Überstand auf die äquilibrierte Säule gegeben. Diese wurde zweimal mit 10 ml Lösung E5 (0.8 M NaCl, 100 mM Natriumacetat, pH 5.0) gewaschen. Die Plasmid-DNA wurde anschließend mit 5 ml Lösung E6 (1.25 M NaCl, 100 mM Tris/HCl, pH 8.5) eluiert, durch Zugabe von 0.7 Volumen Isopropanol gefällt und durch Zentrifugation (30 min, 15.000xg, 4°C) sedimentiert. Die DNA wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, bei 37°C für 10 min getrocknet und in 200 µl Wasser resuspendiert. Zur Konzentrationsbestimmung wurden 1 µl der gewonnenen DNA mit 500 µl Wasser verdünnt und die Absorption bei 260 nm bestimmt. Eine Extinktion von eins entsprach 50 µg/ml doppelsträngiger DNA.

### **5.1.2. Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels PCR**

DNA-Fragmente wurden exponentiell mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) in einem Thermocycler (Primus 25/96, MWG-Biotech) amplifiziert. Es wurde der *GLtaq*-Kit der Firma GL BioTech verwendet. Reaktionsansatz (100 µl) enthielt 2.5 U *GLtaq*-DNA-Polymerase, je 200 µM der Desoxynukleosid-5'-triphosphate, 1.5 mM MgSO<sub>4</sub> sowie 100 pmol des Primerpaares in dem vom Hersteller gelieferten Reaktionspuffer. Als Matrize diente 10 ng Plasmid-DNA oder 100 ng genomische DNA aus *S. cerevisiae*. Zum Denaturieren der Matrize wurde diese für 5 min auf 95°C erwärmt. Anschließend wurde ein Zyklus 25x durchlaufen, der aus Denaturieren der DNA (30 s bei 94°C), Anlagern der Primer (30 s bei T<sub>m</sub>) sowie Synthese der DNA (1-4 min bei 72°C) bestand. Während einer 10 min Nachinkubation bei 72°C wurde die DNA-Synthese vervollständigt. Die Annealingtemperatur T<sub>m</sub> wurde nach der Regel (G/Cx4 + A/Tx2) für jeden Primer bestimmt. Das amplifizierte Fragment wurde durch präparative Gelelektrophorese (Kap. 5.1.3) isoliert.

### **5.1.3. Gelelektrophorese von DNA**

DNA-Fragmente wurden in horizontalen Agarosegelen elektrophoretisch nach ihrer Größe aufgetrennt. Die DNA wurde mit 5x Auftragspuffer (30% (v/v) Glycerol, 0.25% (w/v) Bromphenolblau, 0.25% (w/v) Xylencyanol) geladen. Die Konzentration der Agarose

richtete sich nach der Größe der aufzutrennenden Fragmente (0.8-2% (w/v)). Die Elektrophorese erfolgte in TAE-Puffer (40 mM Tris/Acetat, 20 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA, pH 7.5) bei einer Spannung von bis zu 13 V/cm. Zur Detektion der DNA mittels UV-Licht wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid (0.5 µg/ml) zugesetzt.

Zur präparativen Isolierung von DNA-Fragmenten aus einem Agarosegel wurden diese unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten. Die Reinigung der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des "QIAquick Gel Extraction Kit" (Quiagen). Das Gelstück wurde gewogen, mit dem dreifachen Volumen des Puffers QG versetzt und für 10 min bei 50°C inkubiert, bis die Agarose geschmolzen war. Die Lösung wurde auf die mitgelieferten Silicagel-Säulen gegeben und zentrifugiert (1 min, 13.000 rpm, RT, Tischzentrifuge). Das Eluat wurde verworfen und die gebundene Plasmid-DNA mit 750 µl Puffer PE gewaschen. Anschließend wurde die DNA mit 30 µl H<sub>2</sub>O eluiert.

#### **5.1.4. Restriktionsverdau von DNA**

Die spezifische Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen erfolgte in den von den Herstellern mitgelieferten Puffern. Es wurde 2 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Der Restriktionsansatz wurde für 2-4 h bei der für das entsprechende Enzym angegebenen Temperatur inkubiert. Zur Beendigung des Restriktionsverdaus wurde der Reaktionsansatz für 10 min je nach Enzym bei 65° oder 72°C inkubiert. Die DNA wurde anschließend über ein präparatives Agarosegel (Kap. 5.1.3) gereinigt.

#### **5.1.5. Ligation von DNA-Fragmenten**

Zur Ligation wurde linearisierte Vektor-DNA (500 ng) in einem Gesamtvolumen von 10 µl mit einem dreifachen Überschuss an zu inserierendem DNA-Fragment im dem vom Hersteller (GIBCO-BRL) mitgelieferten 5x Ligationspuffer (250 mM Tris/HCl, 5 mM ATP, 5 mM Dithio-threitol (DTT), 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 25% (w/v) PEG-8000, pH 7.6) gemischt. Der Ansatz wurde mit 0.5 U T4-Ligase über Nacht bei 16°C inkubiert. 1 µl des Ligationsansatzes wurde zur Transformation von Bakterien verwendet (Kap. 5.1.6).

### 5.1.6. Transformation von *E. coli*

Zur Klonierung von rekombinanter DNA wurde der *E. coli* Stamm DH5 $\alpha$  ( $\Phi$ 80 *lacZ* $\Delta$ M15) $\Delta$ [*lacZ*YA-argF] U196 *recA1 endA1 r<sup>-</sup> m<sup>+</sup> gyrA thi-1 hsdR17 rsupE44 relA1*; Hanahan, 1983) verwendet. Für Expressionsplasmide wurde der Stamm XL1-blue (*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac[F' proA<sup>+</sup>B<sup>+</sup> laqI<sup>q</sup>Z* $\Delta$ M15 Tn10(Tet<sup>r</sup>)) eingesetzt.

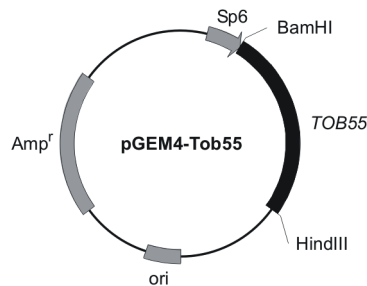
Zur Herstellung kompetenter Zellen wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml einer über Nacht-Kultur des entsprechenden Stammes angeimpft und bei 37°C unter Schütteln auf eine OD<sub>578</sub> von 0.5-0.8 angezogen. Anschließend wurden die Bakterien 30 min auf Eis inkubiert und durch Zentrifugation (15 min, 4.400xg, 4°C) sedimentiert. Alle verwendeten Behälter und Lösungen wurden bei 4°C vorgekühlt. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit absteigenden Mengen von kaltem 10% (v/v) Glycerol (500 ml, 250 ml, 50ml) wurden diese in 500  $\mu$ l 10% (v/v) Glycerol aufgenommen und in 40  $\mu$ l Portionen bei -80°C aufbewahrt.

Zur Transformation der kompetenten Zellen wurde ein Aliquot auf Eis aufgetaut und mit 1  $\mu$ l eines Ligationsansatzes versetzt. Die Bakteriensuspension wurde in eine vorgekühlte Elektroporationsküvette (0.2 cm Elektrodenabstand; Invitrogen) überführt und durch einen elektrischen Puls (2.5 kV, 400  $\Omega$ , 25  $\mu$ F; Gene-Pulser, Bio-Rad) transformiert (Dower *et al.*, 1988). Der Ansatz wurde sofort mit 1 ml SOC-Medium (0.5% (w/v) Hefeextrakt, 0.2% (w/v) Trypton, 20 mM Glucose, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 10 mM NaCl) gemischt und 30-60 min bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurden kurz abzentrifugiert, in 200  $\mu$ l SOC-Medium resuspendiert und auf einer LB<sub>amp</sub>-Platte (LB<sub>amp</sub> mit 1.5 (w/v) Agar) ausgestrichen und bei 37°C inkubiert.

### 5.1.7. Klonierung von pGEM4-Tob55

Die kodierende Sequenz von Tob55 wurde mittels PCR (Kap. 5.1.2) aus genomischer Hefe-DNA (Kap. 5.2.3) mit den Primern "YNL026w fwd" (GGG GGG GAA TTC GGA TCC GCC ATG ACC TCA TCA TCT GGT GTT) und "YNL026w rev" (GGG GGG AAG CTT TTA TAA AAA TGC CAG ACC AAG ACC) amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt mit den

Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Hind*III verdaut. Nach Ligation mit dem Vektor pGEM4, der mit denselben Enzymen geschnitten war, wurde das entstandene Konstrukt pGEM4-Tob55 in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und anschließend isoliert (Abb. 40). Dieses Konstrukt diente zur Synthese von radioaktiv markiertem Tob55-Protein durch *in vitro* Transkription/Translation (Kap. 5.3.5). Um eine bessere Ausbeute bei der *in vitro*-Translation zu erhalten wurde vor das Start-AUG-Kodon ein GCC-Basentriplett eingefügt, um eine der Kozak-Sequenz CCRCCAUGG entsprechende optimale Umgebung für das Initiations-Kodon zu schaffen (Kozak, 1987). Die Kontrolle der rekombinanten DNA erfolgte durch Sequenzierung durch die Firma TopLab (Martinsried) auf einem Perkin Elmer Cylce Sequencer (ABI377).

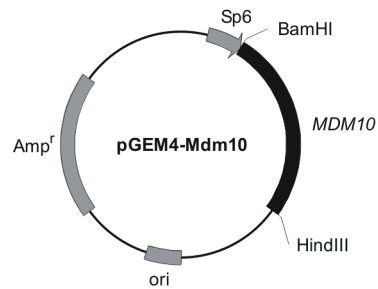


**Abb. 40. Schematische Darstellung des pGEM4-Tob55-Plasmids.**

Amp<sup>r</sup>, Gen für die Ampicillin-Resistenz; Sp6, Promotor für die Sp6-Polymerase; ori, Replikationsursprung.

### 5.1.8. Klonierung von pGEM4-Mdm10

Die kodierende Sequenz von Mdm10 wurde mittels PCR (Kap. 5.1.2) aus genomischer Hefe-DNA (Kap. 5.2.3) mit den Primern "MDM\_Nter-Bam" (TTT TTT GGA TCC GCC ATG CTA CCC TAT ATG GAC CAA GTA CTA AGG) und "MDM10\_Cter-Pst" (TTT TTT CTG CAG TCA TGT GGA GTA CTG GAA TTG TAT GCC) amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI und *Pst*I verdaut. Nach Ligation mit dem Vektor pGEM4, der mit denselben Enzymen geschnitten war, wurde das entstandene Konstrukt pGEM4-Mdm10 in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert und anschließend isoliert (Abb. 41). Dieses Konstrukt enthält ebenfalls eine Kozak-Sequenz und wurde in Zusammenarbeit mit Tincuta Stan hergestellt.

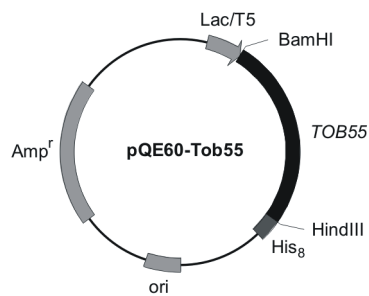


**Abb. 41. Schematische Darstellung des pGEM4-Mdm10-Plasmids.**

Amp<sup>r</sup>, Gen für die Ampicillin-Resistenz; Sp6, Promotor für die Sp6-Polymerase; ori, Replikationsursprung.

### 5.1.9. Klonierung von pQE60-Tob55

Der pQE60-Vektor erlaubt mittels des enthaltenen Lac-Operator/T5-Promotor-Systems die induzierte Überexpression eines Proteins in *E. coli*. Über ein C-terminal angefügtes oktamer Histidiny-Epitop (His<sub>8</sub>-Tag) konnte das Protein mittels Metalchelataffinitätschromatographie aufgereinigt werden (Hochuli *et al.*, 1987). Die kodierende Sequenz von Tob55 wurde mittels PCR (Kap. 5.1.2) aus genomischer Hefe-DNA (Kap. 5.2.3) mit den Primern "YNL026w fwd" (GGG GGG GAA TTC GGA TCC GCC ATG ACC TCA TCA TCT GGT GTT) und "YNL026w rev his8" (GGG GGG AAG CTT TTA GTG ATG GTG ATG GTG ATG TAA AAA TGC CAG ACC AAG ACC) amplifiziert und das erhaltene PCR-Produkt mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII verdaut. Der Reverse-Primer enthielt die entsprechenden Basentriplets für den C-terminalen His<sub>8</sub>-Tag. Nach Ligation mit dem Vektor pQE60, der mit denselben Enzymen geschnitten war, wurde das entstandene Konstrukt pQE60-Tob55 in XL1-blue-Zellen transformiert und anschließend isoliert (Abb. 42). Dieses Konstrukt wurde in Zusammenarbeit mit Tincuta Stan hergestellt.



**Abb. 42. Schematische Darstellung des pQE60-Tob55-Plasmids.**

Amp<sup>r</sup>, Gen für die Ampicillin-Resistenz; His<sub>8</sub>, oktamerer His-Tag; Lac/T5, IPTG-induzierbarer Lac-Operator mit T5-Promotor für die Sp6-Polymerase; ori, Replikationsursprung.

## 5.2. Methoden der Hefegenetik

### 5.2.1. Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Anzucht von Hefezellen erfolgte in YP- oder Laktat-Medium bei 30°C (Guthrie und Fink, 1991). Bei Selektionierung auf einen Auxotrophiemarker wurde SD-Medium verwendet, welches entsprechend mit Markersubstanzen komplementiert wurde. Stammkulturen wurden in 15% (v/v) Glycerol bei -80°C gelagert. Aus diesen wurde eine Vorkultur angeimpft und diese über Nacht bei 30°C und 130 rpm geschüttelt. Tob55(Gal10) wurde in YPGal oder Laktat-Medium mit 0.5% (w/v) Galactose kultiviert. Um die Expression von Tob55 über den GAL10-Promotor zu reprimieren wurde dem Medium anstelle der Galaktose 0.5% (w/v) Glucose zugesetzt.

Laktat-Medium:	3 g Hefeextrakt, 1 g Glucose, 1 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 1 g NH <sub>4</sub> Cl, 0.5 g CaCl <sub>2</sub> x2 H <sub>2</sub> O, 0.5 g NaCl, 1.1 g MgSO <sub>4</sub> x6 H <sub>2</sub> O, 0.3 ml 1% (w/v) FeCl <sub>3</sub> , 22 ml 90% (v/v) Milchsäure, H <sub>2</sub> O ad 1 l, pH 5.5 mit 10 M KOH einstellen
SD-Medium:	1.7 g Hefe-Stickstoff-Base, 5 g Ammoniumsulfat, H <sub>2</sub> O ad 900 ml; nach Autoklavieren: Zugabe von 100 ml 20% (w/v) Glucose (SD) oder 100 ml 20% (w/v) Raffinose und 5 ml 20% (w/v) Galaktose (SGal). Von den Markersubstanzen wurden je nach Selektionsbedingungen je 2 ml Tryptophan und Histidin, bzw. je 3 ml Leucin und Lysin (10 g/l), sowie je 10 ml Adenin- und Uracil-Lösung (2 g/l) pro Liter Medium zugesetzt
YP-Medium:	10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Pepton, H <sub>2</sub> O ad 900 ml; nach Autoklavieren: 100 ml 20% (w/v) Galaktose (YPGal) oder 100 ml 20% (w/v) Glucose (YPD)



### 5.2.2. Transformation von *S. cerevisiae*

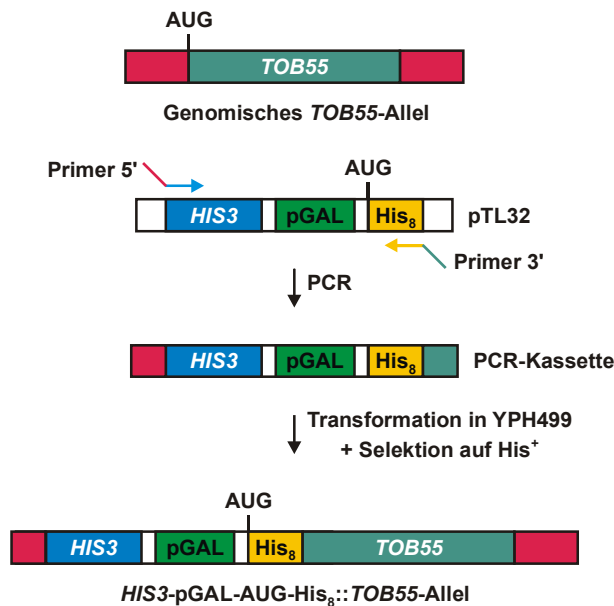
Zur Transformation von *S. cerevisiae* wurde die Lithiumacetat-Methode verwendet (Gietz *et al.*, 1995). Dazu wurde eine 50 ml Hefekultur in YPD-Medium bei 30°C bis zu einer OD<sub>578</sub> von 0.5 inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (3 min, 3.000xg, RT) geerntet, mit sterilem Wasser gewaschen und in 1 ml 100 mM Lithiumacetat resuspendiert. Nach Überführung in ein 1.5 ml Reaktionsgefäß wurden die Hefen sedimentiert, das Zellpellet in 400 µl 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und zu 50 µl Portionen aliquotiert. Ein Aliquot dieser Zellsuspension wurde kurz zentrifugiert, das Zellpellet mit 240 µl 50% (w/v) PEG-3350, 36 µl 1 M Lithiumacetat, 5 µl hitzedenaturierter Lachsspermien-DNA (5 mg/ml) sowie 70 µl Wasser, in dem die zu transformierende DNA (1-10 µg) gelöst war, versetzt und gemischt. Die Probe wurde für 30 min bei 30°C unter Schütteln und anschließend für 20 min bei 42°C inkubiert. Die Hefezellen wurden durch Zentrifugation (15 s, 6.000 rpm, RT, Tischzentrifuge) pelletiert, in 150 µl sterilem Wasser resuspendiert und auf Selektivmedium ausplattiert.

### 5.2.3. Isolierung von chromosomaler DNA aus *S. cerevisiae*

Zur Präparation von chromosomaler Hefe-DNA wurden Hefezellen aus einer stationären 50 ml YPD-Kultur durch Zentrifugation (5 min, 2.500xg, RT) geerntet, in 1 ml Zymolyase-Lösung (100 µg/ml Zymolyase, 1 M Sorbitol, 100 mM EDTA) resuspendiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Nach Waschen mit 1 ml 1 M Sorbitol/100 mM EDTA wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer (50 mM Tris/HCl, 20 mM EDTA, 1% (w/v) SDS, pH 7.5) für 30 min bei 65°C inkubiert. Dann wurden 400 µl 5 M Kaliumacetat zugesetzt, die Probe 1 h auf Eis inkubiert und anschließend die Zellwände und Membranen durch Zentrifugation (15 min, 20.000xg, 4°C) abgetrennt, bevor die DNA aus dem Überstand durch Zugabe eines gleichen Volumens Isopropanol gefällt wurde. Die pelletierte DNA wurde mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 100 µl TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) resuspendiert. Die chromosomale DNA diente als Matrize für die PCR.

#### 5.2.4. Tob55(Gal10)-Hefestamm

Der haploide Tob55(Gal10)-Stamm enthielt Tob55 unter der Kontrolle eines GAL10-Promotors. Zusätzlich war an den N-Terminus von Tob55 ein oktamerer His<sub>8</sub>-Tag (His-Tob55) angefügt. Zur Konstruktion des Stammes wurde ein DNA-Fragment, das ein *HIS3*-Markergen, den GAL10-Promotor sowie die kodierende Sequenz für das His<sub>8</sub>-Epitop enthielt, mittels PCR aus dem Plasmid pTL32 amplifiziert (Abb. 43) (Lafontaine und Tollervey, 1996). Dazu wurden die Primer "pTL26-5'-YNL026wHIS3" (TTA TTT TTG TTT TTT TAA GCT TTG AAT AGG AAT TTT TTT TTT CTA TAT AAT AAA TAT GTA *CTC TTG GCC TCC TCT AGT*) sowie "pTL32-3'-YNL026wHis8" (GAA AAT TGG CAT CGG GCT GTC TAA GGA AAT CTC ATT ATC AAC ACC AGA TGA TGA GGT CAT *ATG GTG ATG GTG ATG GTG ATG GTG AGA*) verwendet. Der 5'-Primer enthielt 60 Nukleotide der *TOB55*-Promotorregion, der 3'-Primer eine Sequenz, die zu den ersten 60 Basen des kodierenden Abschnittes des *TOB55*-Gens komplementär war. Die kursiv markierten Basen sind homolog zu dem als Matrize dienenden pTL32-Plasmid. Das erhaltende PCR-Produkt wurde in den haploiden Hefestamm YPH499 (*MATa ura3-52 lys2-801<sup>amber</sup> ade2-101<sup>ochre</sup> trp1-Δ63 his3-Δ200 leu2-Δ1*; Sikorski und Hieter, 1989) transformiert (Kap. 5.2.2) und über Nacht in 1 ml YP-Medium mit 2% (w/v) Raffinose und 0.1% (w/v) Galactose kultiviert. Zur Selektion von Transformanten wurden die Zellen mittels kurzer Zentrifugation sedimentiert und auf selektivem SGal-Medium (2% (w/v) Raffinose, 0.1% (w/v) Galactose) auf Histidin-Prototrophie selektioniert (Kap. 5.2.1). Homologe Rekombination führte zur Integration der PCR-Kassette in den *TOB55*-Wildtyp-Locus, wodurch der Stamm Tob55(Gal10) entstand der nun ein chromosomales *HIS3*-pGAL10-AUG-His<sub>8</sub>::*TOB55*-Allel enthielt (Abb. 43).



**Abb. 43. Schematische Darstellung der Herstellung des Tob55(Gal10)-Stammes.**

Einzelheiten siehe Text. AUG, Startcodon; *HIS3*, Markergen für die Histidin-Biosynthese; pGAL, GAL10-Promotor; *His<sub>8</sub>*, oktamerer His-Tag; *His<sup>+</sup>*, Hefeklone, die das *HIS3*-Gen enthielten.

Die Insertion der PCR-Kassette in das Hefegenom wurde mittels PCR überprüft. Ein Primer hybridisierte auf der 5'-Seite des *TOB55*-Lokus auf dem GAL10-Promotor (CAA AAA TCA TCG CTT CGC TG), der zweite Primer auf dem 3'-Ende des *TOB55*-Gens ("YNL026w rev Hind"; GGG GGG AAG CTT TTA TAA AAA TGC CAG ACC AAG ACC). Nur bei korrekter Integration der PCR-Kassette wurde ein entsprechendes Fragment erhalten. Zur Durchführung der PCR wurden Hefezellen direkt zu dem PCR-Ansatz gegeben (Kap. 5.1.2). Diese wurde mit einer Vorinkubation von 5 min bei 95°C gestartet. Nach erfolgter Reaktion wurden 10 µl des Überstands auf einem Agarosegel analysiert (Kap. 5.1.3).

### 5.2.5. Mas37-Deletionsstamm

Der haploide Mas37-Deletionsstamm (Y06069; *MATa*, *his3*, *leu2*, *met15*, *ura3 ymr060c::kanMX4*) basierte auf dem Wildtyp-Stamm BY4741 (*MATa*, *his3*, *leu2*, *met15*, *ura3*) und wurde von der EUROSCARF-Stammsammlung (<http://www.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/>) bezogen (Brachmann *et al.*, 1998).

### 5.3. Proteinchemische Methoden

#### 5.3.1. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Proteine wurden durch diskontinuierliche vertikale SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrer Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970). Es wurden zwei Elektrophorese-Systeme unterschiedlicher Größe verwendet. Große Gele setzten sich aus Bodengel (0.5 x 15 x 0.8 cm), Trenngel (8 x 15 x 0.8 cm) und Sammelgel (2 x 15 x 0.8 cm) zusammen, Minigele (Mini-PROTEAN II, Bio-Rad) aus Sammelgel (1 x 7.2 x 0.75 cm) und Trenngel (7 x 7.2 x 0.75 cm).

Trenngel:	10-16% (w/v) Acrylamid, 0.11% (w/v) Bisacrylamid, 375 mM Tris/HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat (APS), 0.05% (v/v) <i>N,N,N',N'</i> -Tetramethylethyldiamin (TEMED)
Sammelgel:	5% (w/v) Acrylamid, 0.033% (w/v) Bisacrylamid, 60 mM Tris/HCl pH 6.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.05% (w/v) APS, 0.1% (v/v) TEMED

Proben wurden in 1x Laemmli-Puffer (60 mM Tris/HCl, 2% (w/v) SDS, 5% (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 10% (v/v) Glycerol, 0.02% (w/v) Bromphenolblau, pH 6.8) aufgenommen und 3 min auf 95°C erhitzt. Die Elektrophorese erfolgte in 50 mM Tris/HCl, 384 mM Glycin und 0.1% (w/v) SDS, pH 8.3, bei 27 mA pro Gel (Minigele 25 mA). Als Größenstandard wurde ein LMW-Proteinmarker (Sigma) verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Proteine entweder mit Coomassie Blau gefärbt (Kap. 5.3.2) oder auf Nitrocellulose transferiert (Kap. 5.3.4).

#### 5.3.2. Coomassie-Färbung von Gelen

Zur Anfärbung von Proteinen wurden die Gele für 30 min in Färbelösung (0.1% (w/v) Coomassie Brilliant Blue R-250, 10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol) geschüttelt und anschließend der Hintergrund mit Entfärberlösung (10% (v/v) Essigsäure, 30% (v/v) Methanol) entfernt. Die Gele wurden zwischen wasserdurchlässiger Folie (Gel Drying Film, Promega) im Spannrahmen getrocknet.

### 5.3.3. Blaue Nativgelelektrophorese

Proteinkomplexen wurden unter nativen Bedingungen mittels Blauer Nativgelelektrophorese (BNGE) analysiert (Schagger *et al.*, 1994). Isolierte Mitochondrien (100 µg Protein) wurden in 40 µl Puffer (1% (w/v) Digitonin, 150 mM Kaliumacetat, 10% (v/v) Glycerol, 30 mM *N*-2-Hydroxyethylpiperazino-*N'*-2-ethansulfonsäure (HEPES)/KOH, pH 7.4, 1 mM Phenylmethyl-sulfonylchlorid (PMSF)) für 30 min auf Eis lysiert. Aggregiertes Material wurde durch Zentrifugation (30 min, 100.000xg, 2°C) abgetrennt, der Überstand mit 4 µl Probenpuffer (5% (w/v) Serva Blau G in 500 mM 6-Aminocaprinsäure) versetzt und auf ein lineares 6-13% Gradientengel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 4°C zunächst bei konstanten 100 V durchgeführt. Sobald die Proteine in das Sammelgel eingelaufen waren (~1 h), wurde die Spannung auf 500 V (bei maximal 15 mA) erhöht. Nach etwa der Hälfte des Gellaufs wurde der Kathodenpuffer gegen einen Puffer gleicher Zusammensetzung, jedoch ohne Farbstoff, ausgetauscht. Im Anschluss an die Elektrophorese wurden die Proteine auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran (PVDF) transferiert (5.3.4). Als Längenstandard wurden Apoferritin (443 kDa) und Rinderserumalbumin (Monomer 66 kDa, Dimer 132 kDa) verwendet.

Bodengel:	20% (w/v) Acrylamid, 0.13% (w/v) Bisacrylamid, 0.5 M 6-Aminocaprinsäure, 50 mM Bistris/HCl pH 7.0, 0.05% (w/v) APS, 0.025% (v/v) TEMED
Trenngel:	linearer Gradient aus 6-13% (w/v) Acrylamid, 0.15-0.3% (w/v) Bisacrylamid, 5% (w/v) Glycerol, 0.5 M 6-Aminocaprinsäure, 50 mM Bistris/HCl pH 7.0, 0.04% (w/v) APS, 0.04% (v/v) TEMED
Sammelgel:	3.8% (w/v) Acrylamid, 0.12% (w/v) Bisacrylamid, 0.5 M 6-Aminocaprinsäure, 50 mM Bistris/HCl pH 7.0), 0.08% (w/v) APS, 0.08% (v/v) TEMED
Kathodenpuffer:	50 mM Tricine, 15 mM Bistris/HCl pH 7.0, 0.02% (w/v) Serva Blau G
Anodenpuffer:	50 mM Bistris/HCl pH 7.0

### 5.3.4. Transfer von Proteinen auf Membranen

Nach Auftrennung von Proteinen wurden diese elektrophoretisch auf eine Membran transferiert ("Western Blotting") (Towbin *et al.*, 1979). Dazu wurde ein Gel zusammen mit einer Nitrocellulose-Membran (0.2 µm Porengröße; Protran BA83, Schleicher & Schuell) zwischen mehrere mit Puffer (20 mM Tris-Base, 150 mM Glycin, 20% (v/v) Methanol,

0.08% (w/v) SDS) getränkten Whatman-3MM Filterpapieren gelegt und diese zwischen zwei Graphitelektroden angeordnet. Der Transfer erfolgte für 75 min bei 1 mA/cm<sup>2</sup> (200 mA). Die transferierten Proteine wurden mit 0.2% (w/v) Ponceau S in 3% (w/v) TCA auf der Membran angefärbt. Nativgele (Kap. 5.3.3) wurden auf eine PVDF-Membran transferiert. Diese wurde zuerst 1 min in Methanol, 2 min in Wasser und abschließend in Blotpuffer voräquilibriert. Der Transfer wurde für 1 h bei 220 mA und 4°C durchgeführt.

### 5.3.5. *In vitro* Synthese mitochondrialer Vorstufenproteine

Für die *in vitro* Synthese radioaktiv markierter mitochondrialer Vorstufenproteine wurde das "TNT Coupled Reticulocyte Lysate"-System von Promega verwendet, welches die gekoppelte Transkription und Translation von komplementärer DNA ermöglicht. Als Matrize wurden Derivate des pGEM4-Plasmids (Promega) verwendet, welche die kodierende Sequenz des jeweiligen Proteins unter Kontrolle eines SP6-Promotors enthielten. Ein 100 µl Standardansatz bestand aus 50 µl TNT-Kaninchen-Retikulozytenlysat, 4 µl TNT-Reaktionspuffer, 2 µl TNT-SP6-RNA-Polymerase, 2 µl Aminosäuremix (alle proteinogenen Aminosäuren außer Methionin, je 1 mM), 4 µl [<sup>35</sup>S]Methionin (10 µCi/µl), 2 µl RNasin (40 U/µl), 4 µl Plasmid-Template (~0.5 µg/µl) und 32 µl H<sub>2</sub>O. Nach Inkubation für 90 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Zusatz von 5 µl 0.2 M Methionin beendet. Anschließend wurden aggregierte Anteile durch Zentrifugation (30 min, 100.000xg, 2°C) abgetrennt, der Überstand aliquotiert und nach Schockgefrieren mit flüssigem Stickstoff bei -80°C gelagert.

### 5.3.6. Autoradiographie

Radioaktiv markierte Proteine wurden nach Auftrennung durch SDS-PAGE (Kap. 5.3.1) oder BNGE (Kap.5.3.3) und Western Blotting (Kap. 5.3.4) durch Autoradiographie nachgewiesen. Dazu wurde ein Röntgenfilm (BioMax MR, Kodak) auf eine Blotmembran aufgelegt und nach entsprechender Inkubationsdauer anschließend entwickelt (Gevamatic 60, Agfa-Gevaert). Die Signale der Autoradiogramme wurden mit Hilfe eines Phosphorimagers (Bas3000, Fuji) quantifiziert.

### 5.3.7. Gelfiltration

Die Bestimmung des nativen Molekulargewichtes von Proteinkomplexen erfolgte durch Gelfiltration unter Verwendung eines ÄKTA-Chromatographiesystems (Pharmacia). 350 µg Mitochondrien wurden in einer Proteinkonzentration von 1.5 mg/ml in Lysepuffer (1% (w/v) Digitonin, 150 mM Kaliumacetat, 10% (v/v) Glycerol, 20 mM 3-(*N*-Morpholino)-ethansulfonsäure (MOPS)/KOH, pH 7.2, 0.5 mM PMSF) resuspendiert und 30 min bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurden unlösliche Aggregate durch Zentrifugation (20 min, 30.000xg, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde auf eine Superose 12-Gelfiltrationssäule (Pharmacia) aufgetragen (250 µl Lysat, 200 µl Probenschleife), die mit zwei Säulenvolumina (0.1% (w/v) Digitonin, 150 mM Kaliumacetat, 10% (v/v) Glycerol, 20 mM MOPS/KOH, pH 7.2) voräquilibriert war. Der Lauf wurde mit einer Flussrate von 0.3 ml/min durchgeführt. Es wurden Fraktionen zu 0.5 ml gesammelt, die Proteine mit Trichloressigsäure (TCA) ausgefällt (Kap. 5.3.8) und mittels Immunoblot analysiert (Kap. 5.5.3). Das Molekulargewicht der Proteinkomplexe wurde anhand einer Eichgeraden aus Markerproteinen bestimmt (Thyreoglobulin (669 kDa), Apoferritin (443 kDa), β-Amylase (200 kDa) und Carboanhydrase (29 kDa)).

### 5.3.8. TCA-Fällung von Proteinen

Um Proteine aus wässrigen Lösungen auszufällen wurde 12% (w/v) TCA zugesetzt. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die denaturierten Proteine durch Zentrifugation sedimentiert (20 min, 20.000xg, 2°C), das Pellet mit -20°C kaltem Aceton gewaschen, 5 min bei 56°C getrocknet und in 1x Laemmli-Puffer (Kap. 5.3.1) aufgenommen.

### 5.3.9. Reinigung von rekombinantem Tob55

Tob55-His<sub>8</sub> wurde mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie aus *E. coli* unter nicht-nativen Bedingungen gereinigt (Hochuli *et al.*, 1987). Das pQE60-Tob55-Plasmid (Kap. 5.1.9) wurde in XL1-blue-Zellen transformiert und ein Klon über Nacht in LB<sub>amp</sub>-Medium bei 37°C angezogen. Mit dieser Vorkultur wurde eine 1 l Kultur mit einer OD von 0.05 angeimpft. Bei einer OD von 0.6 erfolgte die Induktion durch Zugabe von 1 mM Isopropyl-β,D-thio-

galactopyranosid (IPTG) für 2 h bei 37°C. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (5 min, 3.000xg, RT) geerntet, mit Wasser gewaschen und bei -80°C eingefroren.

Tob55-His<sub>8</sub> wurde von den *E. coli* Zellen nur in unlöslicher Form exprimiert und in Einschlusskörperchen abgelagert. Nach Auftauen der Zellen wurden diese in 20 ml Lysozym-Puffer (1 mg/ml Lysozym, 50 mM NaCl, 1 mM PMSF, 50 mM Natriumphosphat, pH 8.0) resuspendiert und für 20 min auf Eis inkubiert. Die erhaltenen Sphäroblasten wurden mittels Zentrifugation (5 min, 3.000xg, 4°C) reisoliert und in 20 ml Puffer (8 M Harnstoff, 1 mM PMSF, 100 mM Natriumphosphat, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) aufgenommen und zur vollständigen Solubilisierung für 30 min bei RT gerührt. Unter Eiskühlung wurden die Sphäroblasten durch Ultraschallbehandlung (Stufe 3, 30% Leistung, 10x 10 s Impulse durch je 10 s Intervalle unterbrochen; Branson Sonifier 250, G. Heinemann) aufgeschlossen und die intakt gebliebenen Einschlusskörperchen abzentrifugiert (15 min, 15.000xg, 4°C). Diese wurden mit 5 ml/(g Nassgewicht der Zellen) in Harnstoff-Puffer (8 M Harnstoff, 20 mM Imidazol, 100 mM Natriumphosphat, 10 mM Tris/HCl, pH 8.0) resuspendiert und die Suspension für 30 min bei RT gerührt. Nach Zentrifugation (20 min, 15.000xg, RT) wurde der Überstand mit Hilfe einer Peristaltik-Pumpe (P-1, Pharmacia) bei RT und einer Flussrate von 0.3 ml/min auf eine äquilibrierte Ni-NTA-Säule (2 ml Bettvolumen; Ni-NTA-Agarose, Quiagen) aufgetragen. Anschließend wurde mit 10 Säulenvolumina Harnstoff-Puffer gewaschen und das gebundene Tob55-His<sub>8</sub>-Protein mit 300 mM Imidazol in Harnstoff-Puffer eluiert. Die proteinhaltigen Fraktionen wurden vereinigt, 10% (v/v) Glycerol hinzugefügt, auf eine Proteinkonzentration von 3 mg/ml eingestellt und bei -80°C gelagert.

### 5.3.10. Aufkonzentrierung von Proteinlösungen

Zur Umpufferung und zur Aufkonzentrierung von Proteinlösungen wurden die Probe in einer Ultrafiltrationszelle (Nanosep Centrifugal Devices, Pall Life Sciences) zentrifugiert (10.000xg, 4°C). Die Zellen hatten ein maximales Volumen von 500 µl und besaßen je nach Protein verschiedene Ausschlussgrößen (30 oder 100 kDa). Zur Umpufferung der Proteinlösung wurde nach Einengung auf etwa 50 µl mit einem entsprechenden Puffer auf 500 µl aufgefüllt und erneut zentrifugiert.



### 5.3.11. Rückfaltung von rekombinantem Tob55

Etwa 2.5 mg gereinigtes, rekombinantes Tob55-His<sub>8</sub>-Protein (Kap. 5.3.9) wurde bei 37°C aufgetaut und Proteinaggregate durch Zentrifugation (20 min, 20.000xg, 4°C) abgetrennt. Das Volumen wurde mit Harnstoff-Puffer (8 M Harnstoff, 0.05% (w/v) DDM, 5 mM Natriumphosphat, pH 7.4) auf 0.5 ml eingestellt und die Proteinlösung mit einer Kanüle in eine Dialysekammer (0.1-0.5 ml, Cutoff 10 kDa, Slide-A-Lyzer Dialysis Units, Pierce) gefüllt und gegen absteigende Harnstoff-Konzentrationen des Dialysepuffers (4, 2, 1, 0.5, 0.2, 0 M Harnstoff, 0.05% (w/v) DDM, 5 mM Natriumphosphat, pH 7.4) dialysiert. Die Inkubation erfolgte bei 4°C für jeweils zweimal 4 h gegen 1 l des jeweiligen Puffers. Anschließend wurde erneut zentrifugiert und der Überstand auf 1/20-Volumen aufkonzentriert (Kap. 5.3.10).

### 5.3.12. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinbestimmung wurde nach Bradford durchgeführt (Bradford, 1976). Alle Proben wurden mit je 1 ml eines 1:5 verdünnten Farbstoffkonzentrats (Proteinassay-Kit, Bio-Rad) versetzt, 10 min bei RT inkubiert und anschließend die Absorption bei 595 nm bestimmt. Die Quantifizierung wurde mit Hilfe einer Eichkurve eines Proteinstandard (Immunglobulin G aus Rind, Bio-Rad) vorgenommen.

### 5.3.13. Circular-Dichroismus

Die Circular-Dichroismus-Messungen (CD) von Tob55 wurden an einem J-715 Spektrophotometer (Jasco, Tokyo, Japan) in einer Quarzküvette mit einer Schichtdicke von 1 cm (Hellma, Baden) bei 4°C durchgeführt. Die spektrale Bandbreite betrug 1 nm. Es wurden je Probe acht Spektren zwischen 190 und 260 nm aufgenommen und mittels der mitgelieferten Software gemittelt und ausgewertet. Die Anteile der Sekundärstrukturen wurden nach Raussens bestimmt (Raussens *et al.*, 2003). Dazu musste die Proteinkonzentration der Probe nicht bekannt sein. Zur Probenvorbereitung wurde rekombinantes rückgefaltetes Tob55-His<sub>8</sub> (100 µg; Kap. 5.3.11) zweimal für je 8 h gegen Dialysepuffer (0.05% (w/v) DDM, 50 mM NaCl, 5 mM Natriumphosphat, pH 7.4) dialysiert.

### 5.3.14. Elektrophysiologische Methoden

Die Leitfähigkeit des TOB-Komplexes wurde in einer *Black-Lipid-Membrane*-Apperatur bestimmt. Als Messzelle diente eine Teflonkammer mit einer Zwischenwand, in der sich ein Loch von 0.5 mm Durchmesser befand. Die Kammer wurde mit einer ungepufferten 1 M KCl-Lösung befüllt. Über zwei Ag-AgCl/KCl-Elektroden (Metrohm) konnte eine Gleichspannung von bis zu 500 mV angelegt und ein Stromfluss abgeleitet werden. Mittels eines Strom/Spannungsverstärkers (428 Current Amplifier, Keithley) wurden die Ströme um den Faktor  $10^9$  V/A verstärkt und über ein Oszilloskop (HM 407, Hameg) und einen Einkanalschreiber (PM 8100, Philips) aufgezeichnet.

Künstliche Lipiddoppelschichten ("Schwarze Membranen") wurden aus einem in *n*-Decan und Butanol gelösten synthetischen Phospholipid hergestellt (Mueller *et al.*, 1962). Dazu wurde das Chloroform/Methanol (1:1)-Lösungsmittelgemisch des Lipids Diphytanoylphosphatidylcholin (DPPC, Avanti Polar Lipids, Alabaster, AL) unter Stickstoffatmosphäre verdampft und eine 1% (v/v) Lösung in *n*-Decan und Butanol (9:1 (v/v)) hergestellt. Nach Füllung der Messzelle mit 1 M KCl-Lösung wurde die Öffnung der Messzelle mit 5  $\mu$ l der DPPC-Lösung mittels einer Teflonöse beschichtet, bis sich eine Lipidmembran zwischen die Ränder spannte. Die mittels einer Vergrößerungsoptik beobachtete Totalreflexion dieser Membran (Schwärzung nach Verschwinden der Newtonschen Ringe) zeigte an, dass sich eine Lipiddoppelmembran gebildet hatte.

Zur Messung der Ionenleitfähigkeit von isoliertem Tob55 (Kap. 5.3.9) wurde dieses zu beiden Seiten der Messzellen hinzugefügt. Die Insertion der Kanäle wurde durch das Anlegen einer Spannung von 80 mV induziert. Die eigentliche Messung wurde bei 20 mV durchgeführt. Ein Insertionsereignis wurde über eine Erhöhung der Leitfähigkeit über der Membran mittels des Schreibers registriert. Um das spannungsabhängige Schließverhalten der Kanäle zu messen wurden an die Membran mit inserierten Kanälen verschiedene Spannungen zwischen -120 und +120 mV angelegt.

## 5.4. Zellbiologische Methoden

### 5.4.1. Proteinextraktion aus Hefe

Die Gewinnung von Gesamtzellprotein aus Hefe erfolgte durch alkalische Lyse (Kushnirov, 2000). Dazu wurden die Zellen einer Hefekultur ( $2.5 \text{ OD}_{578}$ ) mittels Zentrifugation sedimentiert (20 s,  $10.000xg$ , RT), in 100  $\mu\text{l}$  Wasser resuspendiert und mit 100  $\mu\text{l}$  einer 200 mM NaOH-Lösung versetzt. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurden die Zellen pelletiert, in 50  $\mu\text{l}$  Laemmli-Puffer aufgenommen und für 3 min auf  $95^\circ\text{C}$  erhitzt. Es wurde erneut zentrifugiert und 10  $\mu\text{l}$  des Überstandes mittels SDS-PAGE analysiert (Kap. 5.3.1).

### 5.4.2. Subfraktionierung von Hefezellen

Die Isolierung von Cytosol und Mikrosomen erfolgte im Wesentlichen wie von Caplan und Douglas beschrieben (Caplan und Douglas, 1991). Hefezellen wurden in Sphäroblasten überführt (Kap. 5.4.3), in Lysepuffer (20 mM HEPES/KOH, 600 mM Sorbitol, 1 mM DTT, 3 mM EDTA, pH 7.4, 0.5 mM PMSF, je 1  $\mu\text{g/ml}$  Leupeptin, Aprotinin und Chymostatin) resuspendiert und mit einem Dounce-Homogenisator auf Eis aufgebrochen. Das Lysat wurde zentrifugiert (10 min,  $10.000xg$ ,  $2^\circ\text{C}$ ), das Pellet in Lysepuffer resuspendiert und erneut Mal homogenisiert und zentrifugiert. Die Überstände aus beiden Zentrifugationsschritten wurden vereinigt, bei  $10.000xg$  zentrifugiert und der Überstand in zwei Hälften geteilt. Die eine Hälfte wurde auf einen 30% (v/v) Percoll-Gradienten in Lysepuffer aufgetragen und zentrifugiert (50 min,  $76.000xg$ ,  $2^\circ\text{C}$ ). Die obere der beiden Banden dieses Gradienten wurde gesammelt und durch Zentrifugation (1 h,  $150.000xg$ ,  $2^\circ\text{C}$ ) aufkonzentriert. Die mikrosomale Fraktion befand sich direkt oberhalb des sedimentierten Percoll-Kissens, das aus dem vorherigen Gradienten stammte. Die zweite Hälfte des  $10.000xg$ -Überstandes wurde bei  $150.000xg$  zentrifugiert (1 h,  $2^\circ\text{C}$ ), der Überstand enthielt die löslichen cytosolischen Proteine.

Mitochondrien wurden aus dem Hefestamm D273-10B (ATCC, Nr. 24657) isoliert (Kap. 5.4.3) und über einen Saccharose-Stufengradienten weiter aufgereinigt. Dazu wurden sie auf einen Gradienten bestehend aus 20%, 30%, 40%, 50% und 60% Saccharose (w/v) (in

20 mM HEPES, 80 mM KCl, 1 mM EDTA, pH 7.4, 1 mM PMSF) geladen und zentrifugiert (15 min, 240.000xg, 2°C). Die Mitochondrien auf der Höhe zwischen der 40%- und 50% Saccharose-Stufe wurden gesammelt, durch Zentrifugation (10 min, 12.000xg, 2°C) aufkonzentriert, mit SEH-Puffer (20 mM HEPES/KOH, 600 mM Sorbitol, 1 mM EDTA, pH 7.4) gewaschen und schließlich in SEH-Puffer aufgenommen.

#### 5.4.3. Isolierung von Mitochondrien aus *S. cerevisiae*

WT-Mitochondrien wurden aus dem Hefestamm D273-10B (ATCC, Nr. 24657) isoliert. Die Isolierung der Mitochondrien erfolgte im Wesentlichen nach Daum (Daum *et al.*, 1982). Dazu wurde ein Hefestamm bis zu einer OD<sub>578</sub> von 1-1.8 kultiviert (Kap. 5.2.1), die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4.400xg, RT) geerntet und mit Wasser gewaschen. Nach Bestimmung des Feuchtgewichtes der Zellen wurden diese in DTT-Puffer (100 mM Tris/H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 10 mM DTT, pH 9.4) in einer Konzentration von 0.5 g/ml resuspendiert und 15 min bei 30°C geschüttelt. Die Zellen wurden reisoliert, mit 200 ml 1.2 M Sorbitol gewaschen und für den enzymatischen Aufschluss der Zellwände in Zymolyase-Puffer (2 mg Zymolyase pro g Feuchtgewicht, 1.2 M Sorbitol, 20 mM Kaliumphosphat, pH 7.4) in einer Konzentration von 0.15 g/ml aufgenommen. Die Suspension wurde unter Bewegung für 30-60 min bei 30°C inkubiert und die Sphäroplastenbildung durch osmotische Lyse verfolgt. Dazu wurden 50 µl der Zellsuspension mit 1 ml Wasser bzw. 1.2 M Sorbitol gemischt und die OD<sub>578</sub> bestimmt. Die Sphäroplastenbildung war beendet, wenn die OD<sub>578</sub> des Wassergemisches 10-20% der OD<sub>578</sub> des Sorbitolgemisches betrug. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Die Sphäroplasten wurden durch Zentrifugation (5 min, 4.400xg, 4°C) reisoliert, mit 1.2 M Sorbitol gewaschen und für den anschließenden Zellaufschluss mittels eines Dounce-Homogenisators (Stempel B, 10 Stöße) in eiskaltem Homogenisierungspuffer (0.6 M Sorbitol, 10 mM Tris/HCl, 0.2% (w/v) fettsäurefreies Rinderserumalbumin (BSA), pH 7.4, 1 mM PMSF) in einer Konzentration von 0.15 g/ml resuspendiert. Nicht aufgeschlossene Zellen sowie Zelltrümmer wurden durch zweimaliges Zentrifugieren (5 min, 4.400xg, 4°C) abgetrennt und aus dem Überstand die Mitochondrien durch Zentrifugation (12 min, 17.400xg, 4°C) sedimentiert. Diese wurden mit 10 ml SEM-Puffer (0.25 M Saccharose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH, pH 7.2) gewaschen, erneut von ganzen Zellen und Zelltrümmern gereinigt (5 min, 4.400xg, 4°C) und reisoliert (12 min, 17.400xg, 4°C). Die Mitochondrien wurden in SEM-Puffer

aufgenommen, auf eine Proteinkonzentration (Kap. 5.3.12) von 10 mg/ml eingestellt, aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C aufbewahrt.

#### 5.4.4. *In vitro* Proteinimport in Mitochondrien

Ein Standardimportansatz enthielt isolierte Mitochondrien (1 mg/ml, 50 µg pro Gelspur) in Importpuffer (600 mM Sorbitol, 50 mM HEPES/KOH, 80 mM KCl, 10 mM Magnesiumacetat, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 mM EDTA, 1 mg/ml fettsäurefreies BSA, pH 7.2) sowie 2.5 mM ATP, 10 mM Kreatinphosphat, 0.1 mg/ml Kreatinkinase und 5 mM NADH. Um das mitochondriale Membranpotential zu zerstören, wurde das NADH durch 1 µM Valinomycin A und 25 µM Carboxy-cyanid-*p*-trifluoromethoxy-phenylhydrazon (FCCP) ersetzt (Heytler und Prichard, 1962). Die Importreaktion wurde bei 25°C durch Zugabe von 2-10% (v/v) Retikulozytenlysat, welches das radioaktiv markierte Vorstufenprotein enthielt (Kap. 5.3.5), gestartet und durch Abkühlung der Proben auf Eis anschließend gestoppt. Um nicht importierte Vorstufenproteine abzubauen, wurde der Importansatz mit isotonischem HS-Puffer (600 mM Sorbitol, 20 mM HEPES/KOH, pH 7.4) 1:10 verdünnt, mit 1-100 µg/ml Proteinase K (PK) oder 1-50 µg/ml Trypsin und für 20 min auf Eis inkubiert. Die Reaktion wurde mit 2 mM PMSF bzw. 10-500 µg/ml Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor (STI) abgestoppt. Um Mitoplasten zu erhalten wurden die Mitochondrien nach dem Import 1:10 mit hypotonem Puffer (20 mM HEPES/KOH, pH 7.4) verdünnt. Die Mitochondrien oder Mitoplasten wurden durch Zentrifugation (10 min, 18.000xg, 2°C) reisoliert, mit HS-Puffer, der 0.1 mM PMSF enthielt, gewaschen und anschließend in 20 µl 2x Laemmli-Puffer lysiert. Die Proben wurden mittels SDS-PAGE (Kap. 5.3.1) oder BN-GE (Kap. 5.3.3), Autoradiographie (Kap. 5.3.6) oder mittels Immunoblot (Kap. 5.5.3) analysiert. Als Referenz wurden 10% des eingesetzten radioaktiv markierten Vorstufenproteins aufgetragen.

#### 5.4.5. Alkalische Extraktion von mitochondrialen Membranen

Mittels alkalischer Extraktion lassen sich lösliche und peripher mit der Membran assoziierte Proteine von integralen Membranproteinen trennen (Fujiki *et al.*, 1982). Mitochondrien wurden durch Zentrifugation (7 min, 18.000xg, 4°C) sedimentiert und in

einer 0.1 M Natriumcarbonat-Lösung (pH 11.5) in einer Proteinkonzentration von 0.1 mg/ml resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis wurden die integralen Membranproteine durch Zentrifugation (30 min, 100.000xg, 2°C) sedimentiert und in 2x Laemmli-Puffer resuspendiert. Im Überstand befanden sich die löslichen und peripher membranassoziierten Proteine, die mit TCA gefällt (5.3.8) und in 2x Laemmli-Puffer aufgenommen wurden.

#### **5.4.6. Ni-NTA-Affinitätsfällung von Tob55**

Zur Kopräzipitation von importierten mitochondrialen Vorstufenproteinen mit Tob55 wurden isolierte Mitochondrien des Tob55(Gal10)-Stammes verwendet, der His-Tob55 exprimiert. Die Mitochondrien (150 µg) wurden mit 1% (w/v) Digitonin für 30 min bei 4°C in Lysepuffer (300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% (v/v) Glycerol, 50 mM Natriumphosphat, pH 8.0, 1 mM PMSF) solubilisiert. Nach Zentrifugation (20 min, 100.000xg, 2°C) wurden 15% als Kontrolle abgenommen und die Proteine mit TCA ausgefällt (Kap. 5.3.8). Das restliche Lysat wurde mit 40 µl Ni-NTA-Agarose (Quiagen), die zuvor mit 0.1% (w/v) Digitonin/Lysepuffer äquilibriert wurde, für 1 h bei 4°C inkubiert. Das sedimentierte Material wurde zweimal mit 0.1% (w/v) Digitonin/Lysepuffer und einmal mit TBS (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5) gewaschen. Gebundene Proteine wurden durch Zusatz von 2x Laemmli-Puffer, der zusätzlich 500 mM Imidazol enthielt, eluiert und mit Hilfe von SDS-PAGE (Kap. 5.3.1) und Immunoblotting (Kap. 5.5.3) analysiert.

Zur präparativen Isolierung von Tob55 unter nativen Bedingungen wurden 15 mg Mitochondrien eingesetzt und diese in 2 ml 1% (w/v) DDM bei 4°C für 30 min in Lysepuffer (300 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 10% (w/v) Glycerol, 50 mM Natriumphosphat, pH 8.0, 1 mM PMSF) solubilisiert. Nach Zentrifugation (20 min, 100.000xg, 2°C) wurde das solubilisierte Material auf eine mit drei Säulenvolumen 0.1% (w/v) DDM/Lysepuffer voräquilibrierte Ni-NTA-Säule (300 µl Bettvolumen; Ni-NTA-Agarose, Quiagen) geladen. Anschließend wurde mit 10 Säulenvolumen 0.1% (w/v) DDM/Lysepuffer gewaschen und spezifisch gebundenes Material mit 300 mM Imidazol in Lysepuffer eluiert. Es wurden drei 1 ml Fraktionen gesammelt. Mittels Ultrafiltration (Kap. 5.3.10) wurde der Puffer gegen 0.1% (w/v) DDM, 10% (v/v) Glycerol, 50 mM Natriumphosphat, pH 7.4 ausgetauscht und auf 100 µl Volumen eingeeengt. Aliquots wurden bei -80°C aufbewahrt.

#### 5.4.7. Antikörper-Depletion und Antikörper-Shift

Nach *in vitro* Import von radioaktiv markierten Vorstufenproteinen (Kap. 5.4.4) wurden die reisolierten Mitochondrien in 1% (w/v) Digitonin-Puffer (Kap. 5.3.3) solubilisiert. Nach klärender Zentrifugation wurde das Lysat mit 30  $\mu$ l Serum oder gereinigten Antikörpern gegen das jeweilige Antigen für 1 h bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Im Falle eines Antikörper-Shifts wurden die Proben direkt mittels BNGE analysiert (Kap. 5.3.3). Um Antigen-Antikörper-Komplexe vor BNGE-Analyse zu entfernen, wurden Seren (30  $\mu$ l) oder gereinigte Antikörper (30  $\mu$ l) vorher an je 30  $\mu$ l Protein A-Sepharose Matrix (PAS-Beads, Pharmacia) für 1 h bei 4°C gebunden. Zuvor wurden diese zweimal mit TBS und einmal mit Digitonin-haltigem Lysepuffer voräquilibriert. Anschließend wurden die an die PAS-Beads gebundenen Antikörper mit dem Digitonin-Lysat des jeweiligen Imports für 1 h bei 4°C unter Bewegung inkubiert. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit den Beads sedimentiert (1 min, 13.000xg, 4°C) und der Überstand mittels BNGE (Kap. 5.3.3) analysiert.

#### 5.4.8. Fluoreszenzmikroskopie von Hefezellen

Die Analyse der Morphologie von Mitochondrien erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenzmikroskops. Um die Mitochondrien sichtbar zu machen, wurde Tob55(Gal10) mit einem pVT100U-mtGFP-Plasmid transformiert. Dieses enthält vor dem grünfluoreszierenden Protein (mtGFP; S65T-Mutante) die mitochondriale Matrix-Signalsequenz der Untereinheit 9 der  $F_0$ -ATPase aus *N. crassa* (pSu9(1-69)) (Westermann und Neupert, 2000). Das Plasmid enthält einen URA3-Marker sowie einen konstitutiven Alkohol-Dehydrogenase-Promotor.

Ein Hefeklon wurde über Nacht in YPGal-Medium angezogen und anschließend für 40 h in YPD-Medium inkubiert, um die Expression von Tob55 zu reprimieren. Zur zusätzlichen Anfärbung der Mitochondrien wurden die Hefezellen mit 0.1  $\mu$ M Rhodamin B-hexylester (Molecular Probes) für 15 min bei RT im Drehrad inkubiert. Für die Analyse im Mikroskop wurden 100  $\mu$ l dieser Zellsuspension und des isogenen Wildtyps durch Zugabe von 0.5% (m/v) Low Melting Point Agarose auf einem Objektträger fixiert. Fluoreszenz- und

Phasenkontrastaufnahmen wurden an einem Axioplan Mikroskop mit einem Plan-Neofluar 100x/1,30 Öl-Objektiv (Carl Zeiss, Jena GmbH) unter Verwendung einer 100 W Quecksilber-Lampe erstellt. Für die Analyse von GFP wurde Filtersatz Nr. 09 verwendet (Anregung: 450-490 nm, Emission: >515 nm), für Rhodamin B-hexylester Filtersatz Nr. 15 (Anregung: 534-558 nm, Emission: >590 nm) (Heim und Tsien, 1996). Zur Aufnahme der Bilder wurde eine SPOT-gekühlte Digitalkamera (Diagnostic Instruments, Sterling Heights, MI) verwendet und mit der MetaMorph Imaging Software (Universal Imaging Corporation, West Chester, PA) prozessiert.

#### 5.4.9. Elektronenmikroskopische Methoden

Elektronenmikroskopische Aufnahmen des TOB-Komplexes wurden mit einem CM200-FEG-Transmissionselektronenmikroskop (FEI-Eindhoven) bei einer Beschleunigungsspannung von 160 kV angefertigt. Dies geschah in Zusammenarbeit mit Dr. Marek Cyrklaff in der Abteilung von Prof. Baumeister am MPI für Biochemie in Martinsried. Zur Kontrasterhöhung der Probe wurde eine Kryonegativ-Anfärbung mit 16% (w/v) Ammoniummolybdat durchgeführt (De Carlo *et al.*, 2002). Ammoniummolybdat hat eine Dichte von  $2.28 \text{ g/cm}^3$  und ist ein anionisches Kontrastmittel mit einer Löslichkeit von 44 g in 100 ml Wasser. Der pH-Wert der Färbelösung wurde mit NaOH auf 7.2 eingestellt.

3  $\mu\text{l}$  der jeweiligen Probe (Kap. 5.3.9/4 & 5.4.6) wurden auf einem Gitter platziert und für 10-30 s inkubiert um die Partikel an die Oberfläche des kontinuierlichen amorphen Kohlefilms des Gitters zu absorbieren. Überschüssiges Detergenz wurde durch kurzes Eintauchen des Gitters in einen Puffertropfen ohne Detergenz entfernt. Anschließend wurde das Gitter für 20-30 s sofort in 100-200  $\mu\text{l}$  einer Ammoniummolybdat-Lösung (16% (w/v), pH 7.2) überführt und dies zweimal mit frischer Lösung wiederholt. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch ein Stück Filterpapier (Whatman) entfernt und die Probe in flüssigem Stickstoff konserviert. Das Gitter wurde in einer Gatan 626 Kryo-Probenhalterung (Gatan) platziert und während der Analyse mit flüssigem Stickstoff umspült. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden mit einer 2k-Slow Scan CCD Kamera (Tietz) durchgeführt. Defokus-Paare von 0.8 und 1.6  $\mu\text{m}$  wurden bei einer nominellen Vergrößerung von 38.000 aufgenommen. Die Verarbeitung der gewonnenen Daten erfolgte mit Hilfe des EM-Programmpakets (Hegerl, 1996). Die Auswertung beruht



im Wesentlichen auf einer wiederholten Überlagerung von Einzelpartikelbildern und einer daraus errechneten Mittelung der für jeden Bildpunkt erhaltenen Graustufenwerte. Partikel für die weitere Analyse wurden interaktiv selektioniert und zweidimensional gemittelte Projektionsbilder wurden ohne Korrektur der Kontrast-Transfer-Funktion berechnet. Ein erstes Referenzmuster wurde durch einen referenzfreien Vergleich ermittelt und anschließend einem iterativen rotationalen und translationalen Vergleich unterworfen. Die Partikel mit dem geringsten Korrelationskoeffizienten wurden jeweils aussortiert. Dadurch wurde der Datensatz auf etwa 60% der Originaldaten verfeinert. Für die Symmetrieanalyse wurden den erhaltenen Durchschnittsbildern rotationale Symmetrien zwischen 2 und 10 zugrunde gelegt. Die am besten passende Symmetrie wurde nicht-interaktiv mittels des höchsten Kreuzkorrelationskoeffizienten berechnet.

## **5.5. Immunologische Methoden**

### **5.5.1. Gewinnung polyklonaler Antikörper**

Um polyklonale Antikörper gegen Tob55 zu erhalten, wurden Kaninchen mit zwei verschiedenen Peptiden immunisiert. Mittels eines Oberflächenprofils von Tob55 wurden zwei Epitope ausgewählt. Das erste Antigen entsprach den ersten 15 Aminosäureresten des Proteins, das zweite einer internen Sequenz (Aminosäuren 91-104). Die Peptide enthielten zusätzlich ein endständiges Cystein um durch kovalente Kopplung an eine Matrix eine Affinitätsreinigung der Antikörper zu ermöglichen. Die Synthese der Peptide sowie die Immunisierung der Kaninchen wurden von der Firma Pineda Antikörper Service durchgeführt.

Als weiteres Antigen diente ein rekombinantes Tob55-His<sub>8</sub>-Protein, welches in *E. coli* exprimiert wurde (Kap. 5.3.9). Das Antigen wurde vor einer Injektion mit 200 µl Immunstimulans (für die Erstinjektion TiterMax (CytRX), für folgende Injektionen Freund's inkomplettes Adjuvans (Behringwerke)) gemischt und die homogene Emulsion subkutan injiziert (Harlow und Lane, 1988). Das Kaninchen wurde zunächst zweimal im Abstand von zwei Wochen immunisiert, bevor die erste Blutung vorgenommen wurde. Anschließend wurde alle vier Wochen erneut immunisiert. Zehn Tage nach jeder Immunisierung wurde dem Kaninchen 30-40 ml Blut aus der Ohrvene entnommen. Um eine vollständige

Blutgerinnung zu gewährleisten, wurde das Blut etwa 2 h bei RT inkubiert, bevor das Serum durch zwei Zentrifugationsschritte (5 min, 3.500xg, RT; danach 15 min, 12.000xg, RT) von den partikulären Blutbestandteilen abgetrennt und das Komplementsystem durch 30 min Inkubation bei 56°C inaktiviert wurde. Das Serum wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert.

### 5.5.2. Affinitätsreinigung von Antikörpern

Um unspezifische Kreuzreaktionen der Peptidantiseren zu entfernen, wurden die antigenspezifischen Antikörper (Kap. 5.5.1) mittels Affinitätschromatographie aus dem Serum aufgereinigt. Zur Herstellung der Antigensäule wurde ein Peptidantigen über den enthaltenen Cystein-Rest an ein "SulfoLink Coupling Gel" (Pierce) kovalent gebunden, das immobilisierte Iodoacetyl-Gruppen trägt. Die Säule mit dem SulfoLink Gel (1 ml Bettvolumen) wurde zuerst mit sechs Säulenvolumina Puffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM EDTA, pH 8.5) äquilibriert und anschließend mit 1 mg des jeweiligen Peptidantigens in 1 ml Puffer zunächst für 15 min unter Rotation, dann 30 min ohne bei RT inkubiert. Dann wurde mit drei Säulenvolumina Puffer gewaschen und die unspezifischen Bindungsstellen mittels Inkubation mit 50 mM Cystein in 1 ml Puffer wie oben beschrieben abgesättigt. Anschließend wurde mit je 16 Säulenvolumina 1 M NaCl-Lösung und Wasser gewaschen und die Säule unter 0.05% (w/v) Natriumazid bei 4°C gelagert.

Zur Reinigung der Tob55-spezifischen Antikörper wurde die jeweilige Affinitätssäule zuerst mit den folgenden Puffern (jeweils zehn Säulenvolumina) gewaschen: 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 100 mM Glycin/HCl pH 2.5, 10 mM Tris/HCl pH 8.8, 100 mM Natriumphosphat pH 11.5 und 10 mM Tris/HCl pH 7.5. 6 ml des Antiserums wurden mit 24 ml TBS verdünnt und mit Proteaseninhibitoren versetzt (1 mM PMSF, 1 mM EDTA, 0.5 mM *o*-Phenanthrolin). Mit Hilfe einer peristaltischen Pumpe (P-1, Pharmacia) wurde das verdünnte Serum dreimal mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min auf die vorbereitete Säule aufgetragen. Anschließend wurde die Affinitätssäule mit jeweils 20 Säulenvolumina 10 mM Tris/HCl pH 7.5, 500 mM NaCl in 10 mM Tris/HCl pH 7.5 und 100 mM Zitronensäure/NaOH pH 4.0 gewaschen. Die Elution erfolgte durch Zugabe von 10x 1 ml 100 mM Glycin/HCl pH 2.5. Anschließend wurde mit 10 ml 100 mM Natriumphosphat pH 11.5 und 10 mM Tris/HCl pH 7.5 neutralisiert. Je 10 µl der Glycin-Eluat wurden mit 50 µl

Bradford-Reagenz vermischt um die Protein-enthaltenden Fraktionen zu identifizieren. Diese wurden vereint und mit 2 M Tris-Base neutralisiert.

### 5.5.3. Immunologischer Nachweis von Proteinen auf Membranen

Um Proteine immunologisch nachzuweisen (Western Blotting, Immunoblotting) wurden diese mittels SDS-PAGE (Kap. 5.3.1) oder BNGE (5.3.3) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran transferiert (Kap. 5.3.4). Alle folgenden Inkubationen wurden unter Schütteln bei RT durchgeführt. Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation für 40 min mit 5% (w/v) Magermilchpulver in TBS (10 mM Tris/HCl, 150 mM NaCl, pH 7.4) abgesättigt. Anschließend wurden die Proteine durch eine 1-18 h Inkubation mit spezifischen Antisera oder gereinigten Antikörpern (Kap. 5.5.2) immunodekoriert, die je nach Titer 1:250 bis 1:10.000 in 5% (w/v) Milchpulver/TBS verdünnt worden waren. Die Membran wurde nacheinander für jeweils 10 min in TBS, 0.05% (w/v) Triton X-100/TBS und TBS gewaschen. Bei Verwendung des Anti-Penta-His-Antikörpers aus Maus ( $\alpha$ His5; Qiagen) wurde anstelle von Milchpulver BSA benutzt. Zum Nachweis der gebundenen Antikörper wurde ein gegen Kaninchen-Immunglobulin G gerichteter Antikörper aus Ziege oder Maus verwendet, die mit Meerrettich-Peroxidase konjugiert waren (Bio-Rad). Der Sekundärantikörper wurde 1:10.000 in 5% (w/v) Milchpulver oder BSA/TBS verdünnt und 1 h mit der Membran inkubiert. Anschließend wurden die Waschschrte wiederholt. Die gebundene Peroxidase wurde mit einem auf Chemolumineszenz basierenden Detektionssystem (ECL, Amersham) auf einem Röntgenfilm nachgewiesen (Vacherau, 1989). Dazu wurden je 4 ml ECL-Lösung 1 und 2 für 1 min mit der Membran vorinkubiert.

ECL-Lösung 1:           80 ml H<sub>2</sub>O  
                          10 ml 1 M Tris/HCl pH 8.5  
                          1 ml Luminol-Lösung (0.44 g Luminol/10 ml DMSO)  
                          440  $\mu$ l *p*-Coumarinsäure-Lösung (150  $\mu$ g *p*-Coumarinsäure/10 ml DMF)  
                          ad 100 ml H<sub>2</sub>O

ECL-Lösung 2:           80 ml H<sub>2</sub>O  
                          10 ml 1 M Tris/HCl pH 8.5  
                          60  $\mu$ l 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>  
                          ad 100 ml H<sub>2</sub>O

## 5.6. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Agfa-Gevaert (München)	Entwickler und Fixierer für Röntgenfilme
Amersham Biosciences (Braunschweig)	ECL-Reagenz, Protein A-Sepharose Matrix, Superose 12
Avanti Polar Lipids (Alabaster, USA)	Diphytanoyl-Phosphatidycholin
Behringwerke (Marburg)	Freunds inkomplettes Adjuvans
Bio-Rad (München)	Meerrettich-Peroxidase-gekoppelte Anti-Kaninchen- und Anti-Maus-IgGs aus Ziege, Proteinreagenz und Standard für die Proteinbestimmung
Boehringer (Mannheim)	ATP, Desoxyribonukleotide, Kreatinkinase, Kreatinphosphat, Proteinase K, Restriktionsenzyme, Tris
Calbiochem (Darmstadt)	Digitonin
CytRX (Norcross, USA)	TiterMax
DIFCO (Detroit, USA)	Bacto-Agar, Bacto-Pepton, Bacto-Trypton, Hefeextrakt, Hefe-Stickstoff-Base
Fluka (Buchs, Schweiz)	Genapol X-080
Fuji (Tokyo, Japan)	Super RX Fuji Medical X-Ray Film 100 MF 13 x 18 cm
Genomed (Bad Oeyenhausen)	Jetstar-Kit für Plasmid-DNA-Präparation
Gerbu (Gaiberg)	Acrylamid, DTT, NADH
GIBCO-BRL (Eggenstein)	Agarose, Restriktionsenzyme, T4-DNA-Ligase
GL BioTech (Hude)	GLtaq PCR-Kit
Glycon Biotech (Luckenwalde)	<i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltopyranosid
Kodak (München)	Bio Max MR Kodak TR-1 Film 13 x 18 cm
Metabion (München)	Primer
ICN Pharmaceuticals (Eschwege)	[ <sup>35</sup> S]Methionin
Invitrogen (Karlsruhe)	DH5 $\alpha$ , Elektroporationsküvetten, SeeBlue Plus 2 Pre-Stained Protein Standard
Molecular Probes (Eugene, USA)	Rhodamin B-hexylester
Nestle-Alete (München)	Magermilchpulver
New England Biolabs (Schwalbach)	Restriktionsenzyme
Pall Life Sciences (New York, USA)	Nanosep Centrifugal Devices
Pierce (Rockford, USA)	Slide-A-Lyzer Dialysis Unit, Sulfolink Coupling Gel
Pineda Antikörper Service (Berlin)	Tob55-Antikörper
Promega (Heidelberg)	Gel Drying Film, pGEM4-Vektor, TNT Coupled Reticulocyte Lysate
Quiagen (Hilden)	Ni-NTA-Agarose, QIAexpress Penta-His-Antikörper, QIAquick Gel Extraction Kit

Serva (Heidelberg)	Bisacrylamid, Bromphenolblau, Coomassie Brilliant Blau R-250, Ethanol, Harnstoff, HEPES, Lysozym, Ponceau S, SDS, Serva Blau G, TEMED, Xylenyanol
Schleicher & Schuell (Kassel)	Protran Nitrocellulosemembran BA83, PVDF-Membran, Whatman Filterpapiere
Sigma (München)	Aminosäuren, APS, Ampicillin, BSA Grade VIII (fettsäurefrei), Ethidiumbromid, FCCP, Glycerol, Lachsspermien-DNA, $\beta$ -Mercaptoethanol, LMW Molekulargewichts-Standard, PMSF, STI, Trichloressigsäure, Triton X-100, Trypsin (Typ XIII aus Rinderpankreas), Valinomycin A
Seikagaku (Tokyo, Japan)	Zymolyase

Alle übrigen Chemikalien wurden als analysenreine Substanzen von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen.

## 5.7. Geräte

Agarosegel-Dokumentation	The Imager-Imaging-System, Appligene
Blot-Apparatur	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Brutschränke	Heraeus Christ
Black-Lipid-Membrane-Apperatur	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
CD-Spektrophotometer	J-715 Spektrophotometer, Jasco
Chromatographiesystem	ÄKTA Explorer, Amersham Biosciences
Digitalkamera	Diagnostic Instruments
Einkanalschreiber	PM 8100, Philips
Elektroden	Methrom
Elektronenmikroskop	CM200-FEG, FIN
Elektroporationssystem	Gene Pulser, Bio-Rad
Entwicklermaschine	Gevamatic 60, Agfa-Gevaert
Gelkammern	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München Mini-PROTEAN II Electrophoresis Cell, Bio-Rad
Feinwaagen	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop	Axioplan, Carl Zeiss Jena GmbH
Kolbenhubpipetten	Abimed
Kryohalter	Gatan 626, Gatan
Oszilloskop	HM407, Hameg
Peristaltische Pumpe	P-1, Amersham Biosciences
Phosphoimager	BAS-300, Fuji
Photometer	Eppendorf

Quarzküvetten	Hellma
Spannungsgeräte	Amersham Biosciences
Sterilbank	BDK
Strom/Spannungsverstärker	428 Current Amplifier, Keithley
Thermocycler	Primus 25/96, MWG-Biotech
Überkopfschüttler	Werkstatt Institut für Physiologische Chemie, München
Ultraschallgerät	Branson Sonifier 250, G. Heinemann
Vortex-Mixer	Bender und Hobein
Zentrifugen	Beckman Instruments
	Eppendorf
	Heraeus Christ
	Sigma

## 5.8. Abkürzungen

$\alpha$	Antikörper
Abb.	Abbildung
AM	mitochondriale Außenmembran
Amp	Ampicillin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BNGE	Blaue Nativgelelektrophorese
BSA	Rinderserumalbumin
C-	Carboxy-
DDM	<i>n</i> -Dodecyl- $\beta$ -D-maltosid
DHFR	Dihydrofolat-Reduktase
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DPPC	Diphytanoyl-phosphatidylcholin
DTT	Dithio-threitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamin-tetracetat
f	Fragment
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HEPES	<i>N</i> -2-Hydroxyethylpiperazino- <i>N'</i> -2-ethansulfonsäure
His <sub>8</sub>	oktamerer His-Tag
Hsp	Hitzeschockprotein
IgG	Immunglobulin G
IM	mitochondriale Innenmembran
IMR	mitochondrialer Intermembranraum
IPTG	Isopropyl- $\beta$ ,D-thio-galactopyranosid
Kap.	Kapitel
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolysaccharid
MOPS	3-( <i>N</i> -Morpholino)-ethansulfonsäure
N-	Amino-
<i>N.c.</i>	Neurospora crassa
<i>N. crassa</i>	Neurospora crassa
OD	optische Dichte

ORF	offenes Leseraster
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PAS	Protein A-Sepharose
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PK	Proteinase K
PMSF	Phenylmethyl-sulfonylchlorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S.c.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natrium-dodecylsulfat
STI	Sojabohnen-Trypsin-Inhibitor
Su9	Untereinheit 9 des F <sub>0</sub> -Untereinheit der F <sub>1</sub> F <sub>0</sub> -ATPase
SW	osmotische Schwellung von Mitochondrien
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	<i>N,N,N',N'</i> -Tetramethyldiamin
Tim	Protein des TIM-Komplexes
TIM	Translokationskomplex der Innenmembran
Tom	Protein des TOM-Komplexes
TOM	Translokationskomplex der Außenmembran
U	enzymatische Einheiten (units)
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen

## 6. LITERATUR

- Abdul, K.M., Terada, K., Yano, M., Ryan, M.T., Streimann, I., Hoogenraad, N.J. und Mori, M. (2000) Functional analysis of human metaxin in mitochondrial protein import in cultured cells and its relationship with the Tom complex. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **276**, 1028-1034.
- Adrian, M., Dubochet, J., Fuller, S.D. und Harris, J.R. (1998) Cryo-negative staining. *Micron* **29**, 145-160.
- Ahting, U., Thieffry, M., Engelhardt, H., Hegerl, R., Neupert, W. und Nussberger, S. (2001) Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* **153**, 1151-1160.
- Ahting, U., Thun, C., Hegerl, R., Typke, D., Nargang, F.E., Neupert, W. und Nussberger, S. (1999) The TOM core complex: the general protein import pore of the outer membrane of mitochondria. *J. Cell Biol.* **147**, 959-968.
- Alder, N.N. und Theg, S.M. (2003) Energy use by biological protein transport pathways. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 442-451.
- Andersen, C., Hughes, C. und Koronakis, V. (2002) Electrophysiological Behavior of the TolC Channel-Tunnel in Planar Lipid Bilayers. *J. Membr. Biol.* **185**, 83-92.
- Andersson, S.G., Karlberg, O., Canback, B. und Kurland, C.G. (2003) On the origin of mitochondria: a genomics perspective. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **358**, 165-177.
- Antos, N., Budzinska, M. und Kmita, H. (2001a) An interplay between the TOM complex and porin isoforms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *FEBS Lett.* **500**, 12-16.
- Antos, N., Stobienia, O., Budzinska, M. und Kmita, H. (2001b) Under conditions of insufficient permeability of VDAC1, external NADH may use the TOM complex channel to cross the outer membrane of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 119-126.
- Armstrong, L.C., Komiya, T., Bergman, B.E., Mihara, K. und Bornstein, P. (1997) Metaxin is a component of a preprotein import complex in the outer membrane of the mammalian mitochondrion. *J. Biol. Chem.* **272**, 6510-6518.
- Bainbridge, G., Gokce, I. und Lakey, J.H. (1998) Voltage gating is a fundamental feature of porin and toxin beta-barrel membrane channels. *FEBS Lett.* **431**, 305-308.
- Baker, K.P., Schaniel, A., Vestweber, D. und Schatz, G. (1990) A yeast mitochondrial outer membrane protein essential for protein import and cell viability. *Nature* **348**, 605-609.
- Bauer, M.F., Hofmann, S., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Protein translocation into mitochondria: the role of TIM complexes. *Trends Cell Biol.* **10**, 25-31.
- Bauer, M.F. und Neupert, W. (2001) Import of proteins into mitochondria: a novel pathomechanism for progressive neurodegeneration. *J. Inherit. Metab. Dis.* **24**, 166-180.
- Bauer, M.F., Sirrenberg, C., Neupert, W. und Brunner, M. (1996) Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* **87**, 33-41.
- Bay, D.C. und Court, D.A. (2002) Origami in the outer membrane: the transmembrane arrangement of mitochondrial porins. *Biochem. Cell Biol.* **80**, 551-562.
- Beddoe, T. und Lithgow, T. (2002) Delivery of nascent polypeptides to the mitochondrial surface. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 35-39.
- Behrens, S. (2002) Periplasmic chaperones - new structural and functional insights. *Structure* **10**, 1469-1471.
- Benz, R. (1985) Porin from bacterial and mitochondrial outer membranes. *CRC Crit. Rev. Biochem.* **19**, 145-190.
- Benz, R., Schmid, A. und Dihanich, M. (1989) Pores from mitochondrial outer membranes of yeast and a porin-deficient yeast mutant: a comparison. *J. Bioenerg. Biomembr.* **21**, 439-450.
- Berger, K.H., Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1997) Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J. Cell Biol.* **136**, 545-553.
- Bernstein, H.D. (2000) The biogenesis and assembly of bacterial membrane proteins. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 203-209.
- Berthold, J., Bauer, M.F., Schneider, H.C., Klaus, C., Dietmeier, K., Neupert, W. und 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.
- Beveridge, T.J. (1999) Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *J. Bacteriol.* **181**, 4725-4733.
- Birnboim, H. und Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Acids Res.* **11**, 4077-4092.



- Blachly-Dyson, E. und Forte, M. (2001) VDAC channels. *IUBMB Life* **52**, 113-118.
- Blachly-Dyson, E., Song, J., Wolfgang, W.J., Colombini, M. und Forte, M. (1997) Multicopy suppressors of phenotypes resulting from the absence of yeast VDAC encode a VDAC-like protein. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 5727-5738.
- Bogsch, E.G., Sargent, F., Stanley, N.R., Berks, B.C., Robinson, C. und Palmer, T. (1998) An essential component of a novel bacterial protein export system with homologues in plastids and mitochondria. *J. Biol. Chem.* **273**, 18003-18006.
- Boldogh, I., Vojtov, N., Karmon, S. und Pon, L.A. (1998) Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J. Cell Biol.* **141**, 1371-1381.
- Boldogh, I.R., Nowakowski, D.W., Yang, H.C., Chung, H., Karmon, S., Royes, P. und Pon, L.A. (2003) A Protein Complex Containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p Links Mitochondrial Membranes and DNA to the Cytoskeleton-based Segregation Machinery. *Mol. Biol. Cell* **14**, 4618-4627.
- Bordier, C. (1981) Phase separation of integral membrane proteins in Triton X-114 solution. *J. Biol. Chem.* **256**, 1604-1607.
- Borgese, N., Colombo, S. und Pedrazzini, E. (2003) The tale of tail-anchored proteins: coming from the cytosol and looking for a membrane. *J. Cell Biol.* **161**, 1013-1019.
- Borst, P. und Grivell, L.A. (1978) The mitochondrial genome of yeast. *Cell* **15**, 705-723.
- Bowie, J.U. (2004) Membrane proteins: A new method enters the fold. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 3995-3996.
- Brachat, A., Liebundguth, N., Rebischung, C., Lemire, S., Scharer, F., Hoepfner, D., Demchyshyn, V., Howald, I., Dusterhoft, A., Mostl, D., Pohlmann, R., Kotter, P., Hall, M.N., Wach, A. und Philippsen, P. (2000) Analysis of deletion phenotypes and GFP fusions of 21 novel *Saccharomyces cerevisiae* open reading frames. *Yeast* **16**, 241-253.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. und Boeke, J.D. (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast* **14**, 115-132.
- Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brenner, S. und Horne, R.W. (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. *Biochim. Biophys. Acta* **34**, 103-110.
- Brok, R., Van Gelder, P., Winterhalter, M., Ziese, U., Koster, A.J., de Cock, H., Koster, M., Tommassen, J. und Bitter, W. (1999) The C-terminal domain of the *Pseudomonas* secretin XcpQ forms oligomeric rings with pore activity. *J. Mol. Biol.* **294**, 1169-1179.
- Buchanan, S.K. (1999) Beta-barrel proteins from bacterial outer membranes: structure, function and refolding. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 455-461.
- Buchanan, S.K., Smith, B.S., Venkatramani, L., Xia, D., Esser, L., Palnitkar, M., Chakraborty, R., van der Helm, D. und Deisenhofer, J. (1999) Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **6**, 56-63.
- Burgess, S.M., Delannoy, M. und Jensen, R.E. (1994) MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J. Cell Biol.* **126**, 1375-1391.
- Cameron, C.E., Lukehart, S.A., Castro, C., Molini, B., Godornes, C. und Van Voorhis, W.C. (2000) Oponic potential, protective capacity, and sequence conservation of the *Treponema pallidum* subspecies *pallidum* Tp92. *J. Infect. Dis.* **181**, 1401-1413.
- Caplan, A.J. und Douglas, M.G. (1991) Characterization of YDJ1: a yeast homologue of the bacterial dnaJ protein. *J. Cell Biol.* **114**, 609-621.
- Clausen, T., Southan, C. und Ehrmann, M. (2002) The HtrA family of proteases: implications for protein composition and cell fate. *Mol. Cell* **10**, 443-455.
- Collet, J.F. und Bardwell, J.C. (2002) Oxidative protein folding in bacteria. *Mol. Microbiol.* **44**, 1-8.
- Court, D.A., Kleene, R., Neupert, W. und Lill, R. (1996) Role of the N- and C-termini of porin in import into the outer membrane of *Neurospora* mitochondria. *FEBS Lett.* **390**, 73-77.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Oppliger, W. und Koehler, C.M. (2002a) The Tim9p-Tim10p complex binds to the transmembrane domains of the ADP/ATP carrier. *EMBO J.* **21**, 942-953.
- Curran, S.P., Leuenberger, D., Schmidt, E. und Koehler, C.M. (2002b) The role of the Tim8p-Tim13p complex in a conserved import pathway for mitochondrial polytopic inner membrane proteins. *J. Cell Biol.* **158**, 1017-1027.
- Da Cruz, S., Xenarios, I., Langridge, J., Vilbois, F., Parone, P.A. und Martinou, J.C. (2003) Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. *J. Biol. Chem.* **278**, 41566-41571.

- Danese, P.N. und Silhavy, T.J. (1998) Targeting and assembly of periplasmic and outer-membrane proteins in *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 59-94.
- Daum, G., Bohni, P.C. und Schatz, G. (1982) Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **257**, 13028-13033.
- De Carlo, S., El-Bez, C., Alvarez-Rua, C., Borge, J. und Dubochet, J. (2002) Cryo-negative staining reduces electron-beam sensitivity of vitrified biological particles. *J. Struct. Biol.* **138**, 216-226.
- de Cock, H., Struyve, M., Kleerebezem, M., van der Krift, T. und Tommassen, J. (1997) Role of the carboxy-terminal phenylalanine in the biogenesis of outer membrane protein PhoE of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol.* **269**, 473-478.
- de Keyzer, J., van der Does, C. und Driessen, A.J. (2003) The bacterial translocase: a dynamic protein channel complex. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 2034-2052.
- Dekker, P.J., Muller, H., Rassow, J. und Pfanner, N. (1996) Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biol. Chem.* **377**, 535-538.
- Dekker, P.J., Ryan, M.T., Brix, J., Muller, H., Honlinger, A. und Pfanner, N. (1998) Preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane: molecular dissection and assembly of the general import pore complex. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 6515-6524.
- DiMauro, S. und Schon, E.A. (2003) Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N. Engl. J. Med.* **348**, 2656-2668.
- Dimmer, K.S., Fritz, S., Fuchs, F., Messerschmitt, M., Weinbach, N., Neupert, W. und Westermann, B. (2002) Genetic Basis of Mitochondrial Function and Morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **13**, 847-853.
- Dobberstein, B. (1994) Protein transport. On the beaten pathway. *Nature* **367**, 599-600.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* **101**, 401-412.
- Dower, W.J., Miller, J.F. und Ragsdale, C.W. (1988) High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acids Res.* **16**, 6127-6145.
- Dyall, S.D., Lester, D.C., Schneider, R.E., Delgadillo-Correa, M.G., Plumper, E., Martinez, A., Koehler, C.M. und Johnson, P.J. (2003) *Trichomonas vaginalis* Hmp35, a putative pore-forming hydrogenosomal membrane protein, can form a complex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **278**, 30548-30561.
- Ellis, R.J. (1996) Revisiting the Anfinsen cage. *Fold Des.* **1**, R9-15.
- Embley, T.M., van Der Giezen, M., Horner, D.S., Dyal, P.L., Bell, S. und Foster, P.G. (2003) Hydrogenosomes, mitochondria and early eukaryotic evolution. *IUBMB Life* **55**, 387-395.
- Emelyanov, V.V. (2001) Rickettsiaceae, rickettsia-like endosymbionts, and the origin of mitochondria. *Biosci. Rep.* **21**, 1-17.
- Endo, T. und Kohda, D. (2002) Functions of outer membrane receptors in mitochondrial protein import. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 3-14.
- Endo, T., Yamamoto, H. und 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.
- Eppens, E.F., Nouwen, N. und Tommassen, J. (1997) Folding of a bacterial outer membrane protein during passage through the periplasm. *EMBO J.* **16**, 4295-4301.
- Errington, J., Daniel, R.A. und Scheffers, D.J. (2003) Cytokinesis in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 52-65.
- Esaki, M., Kanamori, T., Nishikawa, S., Shin, I., Schultz, P.G. und Endo, T. (2003) Tom40 protein import channel binds to non-native proteins and prevents their aggregation. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 988-994.
- Freitag, H., Benz, R. und Neupert, W. (1983) Isolation and properties of the porin of the outer mitochondrial membrane from *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.* **97**, 286-294.
- Frey, T.G. und Mannella, C.A. (2000) The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 319-324.
- Fujiki, Y., Hubbard, A.L., Fowler, S. und Lazarow, P.B. (1982) Isolation of intracellular membranes by means of sodium carbonate treatment: application to endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **93**, 97-102.
- Gabriel, K., Buchanan, S.K. und Lithgow, T. (2001) The alpha and the beta: protein translocation across mitochondrial and plastid outer membranes. *Trends Biochem. Sci.* **26**, 36-40.
- Gasser, S.M. und Schatz, G. (1983) Import of proteins into mitochondria. In vitro studies on the biogenesis of the outer membrane. *J. Biol. Chem.* **258**, 3427-3430.
- Genevrois, S., Steeghs, L., Roholl, P., Letesson, J.J. und van der Ley, P. (2003) The Omp85 protein of *Neisseria meningitidis* is required for lipid export to the outer membrane. *EMBO J.* **22**, 1780-1789.
- Gentle, I., Gabriel, K., Beech, P., Waller, R. und Lithgow, T. (2004) The Omp85 family of proteins is essential for outer membrane biogenesis in mitochondria and bacteria. *J. Cell Biol.* **164**, 19-24.

- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. und Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**, 355-360.
- Glick, B.S. und von Heijne, G. (1996) *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria lack a bacterial-type secretion machinery. *Protein Sci.* **5**, 2651-2652.
- Gratzer, S., Lithgow, T., Bauer, R.E., Lamping, E., Paltauf, F., Kohlwein, S.D., Haucke, V., Junne, T., Schatz, G. und Horst, M. (1995) Mas37p, a novel receptor subunit for protein import into mitochondria. *J. Cell Biol.* **129**, 25-34.
- Gray, M.W., Burger, G. und Lang, B.F. (1999) Mitochondrial evolution. *Science* **283**, 1476-1481.
- Guedin, S., Willery, E., Tommassen, J., Fort, E., Drobecq, H., Loch, C. und Jacob-Dubuisson, F. (2000) Novel topological features of FhaC, the outer membrane transporter involved in the secretion of the *Bordetella pertussis* filamentous hemagglutinin. *J. Biol. Chem.* **275**, 30202-30210.
- Guthrie, C. und Fink, G.R. (eds.). (1991) *Guide to yeast genetics and molecular biology*.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988) *Antibodies: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor; NY.
- Hartl, F.U. und Hayer-Hartl, M. (2002) Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**, 1852-1858.
- Hazbun, T.R., Malmstrom, L., Anderson, S., Graczyk, B.J., Fox, B., Riffle, M., Sundin, B.A., Aranda, J.D., McDonald, W.H., Chiu, C.H., Snydsman, B.E., Bradley, P., Muller, E.G., Fields, S., Baker, D., Yates, J.R., 3rd und Davis, T.N. (2003) Assigning function to yeast proteins by integration of technologies. *Mol. Cell* **12**, 1353-1365.
- Hegerl, R. (1996) The EM Program Package: A Platform for Image Processing in Biological Electron Microscopy. *J. Struct. Biol.* **116**, 30-34.
- Heim, R. und Tsien, R.Y. (1996) Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Curr. Biol.* **6**, 178-182.
- Herrmann, J.M. (2003) Converting bacteria to organelles: evolution of mitochondrial protein sorting. *Trends Microbiol.* **11**, 74-79.
- Herrmann, J.M. und Neupert, W. (2000) What fuels polypeptide translocation? An energetical view on mitochondrial protein sorting. *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 331-338.
- Heuck, A.P., Tweten, R.K. und Johnson, A.E. (2001) Beta-barrel pore-forming toxins: intriguing dimorphic proteins. *Biochemistry* **40**, 9065-9073.
- Heytler, P.G. und Prichard, W.W. (1962) A new class of uncoupling agents--carbonyl cyanide phenylhydrazones. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **7**, 272-275.
- Hill, K., Model, K., Ryan, M.T., Dietmeier, K., Martin, F., Wagner, R. und Pfanner, N. (1998) Tom40 forms the hydrophilic channel of the mitochondrial import pore for preproteins. *Nature* **395**, 516-521.
- Hochuli, E., Dobeli, H. und Schacher, A. (1987) New metal chelate adsorbent selective for proteins and peptides containing neighbouring histidine residues. *J. Chromatogr.* **411**, 177-184.
- Honlinger, A., Bomer, U., Alconada, A., Eckerskorn, C., Lottspeich, F., Dietmeier, K. und Pfanner, N. (1996) Tom7 modulates the dynamics of the mitochondrial outer membrane translocase and plays a pathway-related role in protein import. *EMBO J.* **15**, 2125-2137.
- Hoogenraad, N., Ward, L. und Ryan, M. (2002) Import and assembly of proteins into mitochondria of mammalian cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 97-105.
- Hoppins, S.C. und Nargang, F.E. (2004) The Tim8-Tim13 complex in *Neurospora crassa* functions in the assembly of proteins into both mitochondrial membranes. *J. Biol. Chem.*
- Ize, B., Stanley, N.R., Buchanan, G. und Palmer, T. (2003) Role of the *Escherichia coli* Tat pathway in outer membrane integrity. *Mol. Microbiol.* **48**, 1183-1193.
- Jacob-Dubuisson, F., Loch, C. und Antoine, R. (2001) Two-partner secretion in Gram-negative bacteria: a thrifty, specific pathway for large virulence proteins. *Mol. Microbiol.* **40**, 306-313.
- Jensen, R. und Dunn, C. (2002) Protein import into and across the mitochondrial inner membrane: role of the TIM23 and TIM22 translocases. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 25-34.
- Johnson, A.E. und Jensen, R.E. (2004) Barreling through the membrane. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 113-114.
- Kamath, R.S., Fraser, A.G., Dong, Y., Poulin, G., Durbin, R., Gotta, M., Kanapin, A., Le Bot, N., Moreno, S., Sohrmann, M., Welchman, D.P., Zipperlen, P. und Ahringer, J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**, 231-237.
- Karlberg, O., Canback, B., Kurland, C.G. und Andersson, S.G. (2000) The dual origin of the yeast mitochondrial proteome. *Yeast* **17**, 170-187.
- Kaur, H. und Raghava, G.P. (2002) BetaTPred: prediction of beta-TURNS in a protein using statistical algorithms. *Bioinformatics* **18**, 498-499.
- Kerscher, O., Holder, J., Srinivasan, M., Leung, R.S. und Jensen, R.E. (1997) The Tim54p-Tim22p complex mediates insertion of proteins into the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* **139**, 1663-1675.

- Kerscher, O., Sepuri, N.B. und Jensen, R.E. (2000) Tim18p is a new component of the Tim54p-Tim22p translocon in the mitochondrial inner membrane. *Mol. Biol. Cell* **11**, 103-116.
- Kleinschmidt, J.H. (2003) Membrane protein folding on the example of outer membrane protein A of *Escherichia coli*. *Cell. Mol. Life Sci.* **60**, 1547-1558.
- Kmita, H. und Budzinska, M. (2000) Involvement of the TOM complex in external NADH transport into yeast mitochondria depleted of mitochondrial porin1. *Biochim. Biophys. Acta* **1509**, 86-94.
- Koch, K.V., Suelmann, R. und Fischer, R. (2003) Deletion of *mdmB* impairs mitochondrial distribution and morphology in *Aspergillus nidulans*. *Cell. Motil. Cytoskeleton* **55**, 114-124.
- Koehler, C.M., Leuenberger, D., Merchant, S., Renold, A., Junne, T. und Schatz, G. (1999a) Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 2141-2146.
- Koehler, C.M., Merchant, S. und Schatz, G. (1999b) How membrane proteins travel across the mitochondrial intermembrane space. *Trends Biochem. Sci.* **24**, 428-432.
- Koehler, C.M., Murphy, M.P., Bally, N.A., Leuenberger, D., Oppliger, W., Dolfini, L., Junne, T., Schatz, G. und 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.
- Kozak, M. (1987) At least six nucleotides preceding the AUG initiator codon enhance translation in mammalian cells. *J. Mol. Biol.* **196**, 947-950.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C. und Pfanner, N. (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J. Biol. Chem.* **278**, 48520-48523.
- Krimmer, T., Rapaport, D., Ryan, M.T., Meisinger, C., Kassenbrock, C.K., Blachly-Dyson, E., Forte, M., Douglas, M.G., Neupert, W., Nargang, F.E. und Pfanner, N. (2001) Biogenesis of porin of the outer mitochondrial membrane involves an import pathway via receptors and the general import pore of the TOM complex. *J. Cell Biol.* **152**, 289-300.
- Kuhn, A., Stuart, R., Henry, R. und Dalbey, R.E. (2003) The Alb3/Oxa1/YidC protein family: membrane-localized chaperones facilitating membrane protein insertion? *Trends Cell Biol.* **13**, 510-516.
- Kumar, A., Agarwal, S., Heyman, J.A., Matson, S., Heidtman, M., Piccirillo, S., Umansky, L., Drawid, A., Jansen, R., Liu, Y., Cheung, K.H., Miller, P., Gerstein, M., Roeder, G.S. und Snyder, M. (2002) Subcellular localization of the yeast proteome. *Genes Dev.* **16**, 707-719.
- Kunkele, K.P., Heins, S., Dembowski, M., Nargang, F.E., Benz, R., Thieffry, M., Walz, J., Lill, R., Nussberger, S. und Neupert, W. (1998) The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria. *Cell* **93**, 1009-1019.
- Kushnirov, V.V. (2000) Rapid and reliable protein extraction from yeast. *Yeast* **16**, 857-860.
- Kuwana, T. und Newmeyer, D.D. (2003) Bcl-2-family proteins and the role of mitochondria in apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **15**, 691-699.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lafontaine, D. und Tollervey, D. (1996) One-step PCR mediated strategy for the construction of conditionally expressed and epitope tagged yeast proteins. *Nucleic Acids Res.* **24**, 3469-3471.
- Lill, R. und Kispal, G. (2000) Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 352-356.
- Ludwig, O., Krause, J., Hay, R. und Benz, R. (1988) Purification and characterization of the pore forming protein of yeast mitochondrial outer membrane. *Eur. Biophys. J.* **15**, 269-276.
- Mannella, C.A., Neuwald, A.F. und Lawrence, C.E. (1996) Detection of likely transmembrane beta strand regions in sequences of mitochondrial pore proteins using the Gibbs sampler. *J. Bioenerg. Biomembr.* **28**, 163-169.
- Manning, D.S., Reschke, D.K. und Judd, R.C. (1998) Omp85 proteins of *Neisseria gonorrhoeae* and *Neisseria meningitidis* are similar to *Haemophilus influenzae* D-15-Ag and *Pasteurella multocida* Oma87. *Microb. Pathog.* **25**, 11-21.
- Marcotte, E.M., Xenarios, I., van Der Blik, A.M. und Eisenberg, D. (2000) Localizing proteins in the cell from their phylogenetic profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 12115-12120.
- Matouschek, A. und Glick, B.S. (2001) Barreling through the outer membrane. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 284-286.
- Matouschek, A., Pfanner, N. und Voos, W. (2000) Protein unfolding by mitochondria. The Hsp70 import motor. *EMBO Rep.* **1**, 404-410.
- Mayer, A., Driessen, A., Neupert, W. und Lill, R. (1995) Purified and protein-loaded mitochondrial outer membrane vesicles for functional analysis of preprotein transport. *Methods Enzymol.* **260**, 252-263.
- Mayer, A., Lill, R. und Neupert, W. (1993) Translocation and insertion of precursor proteins into isolated outer membranes of mitochondria. *J. Cell Biol.* **121**, 1233-1243.
- Mayer, M.P. (2004) Timing the catch. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **11**, 6-8.

- Meisinger, C., Ryan, M.T., Hill, K., Model, K., Lim, J.H., Sickmann, A., Muller, H., Meyer, H.E., Wagner, R. und Pfanner, N. (2001) Protein import channel of the outer mitochondrial membrane: a highly stable Tom40-Tom22 core structure differentially interacts with preproteins, small tom proteins, and import receptors. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2337-2348.
- Milisav, I., Moro, F., Neupert, W. und Brunner, M. (2001) Modular structure of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 25856-25861.
- Missiakas, D. und Raina, S. (1997) Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* **179**, 2465-2471.
- Model, K., Meisinger, C., Prinz, T., Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfanner, N. und Ryan, M.T. (2001) Multistep assembly of the protein import channel of the mitochondrial outer membrane. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 361-370.
- Model, K., Prinz, T., Ruiz, T., Radermacher, M., Krimmer, T., Kuhlbrandt, W., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2002) Protein Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane: Role of Import Receptors in the Structural Organization of the TOM Complex. *J. Mol. Biol.* **316**, 657-666.
- Mueller, P., Rudin, D.O., Tien, H.T. und Wescott, W.C. (1962) Reconstitution of cell membrane structure in vitro and its transformation into an excitable system. *Nature* **194**, 979-980.
- Muller, A., Rassow, J., Grimm, J., Machuy, N., Meyer, T.F. und Rudel, T. (2002) VDAC and the bacterial porin PorB of *Neisseria gonorrhoeae* share mitochondrial import pathways. *EMBO J.* **21**, 1916-1929.
- Neupert, W. (1997) Protein import into mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 863-917.
- Neupert, W. und Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **3**, 555-565.
- Nikaido, H. (2003) Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **67**, 593-656.
- Notredame, C., Higgins, D.G. und Heringa, J. (2000) T-Coffee: A novel method for fast and accurate multiple sequence alignment. *J. Mol. Biol.* **302**, 205-217.
- Nouwen, N., Stahlberg, H., Pugsley, A.P. und Engel, A. (2000) Domain structure of secretin PulD revealed by limited proteolysis and electron microscopy. *EMBO J.* **19**, 2229-2236.
- Orth, M. und Schapira, A.H. (2001) Mitochondria and degenerative disorders. *Am. J. Med. Genet.* **106**, 27-36.
- Palmer, T. und Berks, B.C. (2003) Moving folded proteins across the bacterial cell membrane. *Microbiology* **149**, 547-556.
- Paschen, S.A. und Neupert, W. (2001) Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* **52**, 101-112.
- Paschen, S.A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J.* **19**, 6392-6400.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D. und Neupert, W. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins. *Nature* **426**, 862-866.
- Pavlov, E.V., Priault, M., Pietkiewicz, D., Cheng, E.H., Antonsson, B., Manon, S., Korsmeyer, S.J., Mannella, C.A. und Kinnally, K.W. (2001) A novel, high conductance channel of mitochondria linked to apoptosis in mammalian cells and Bax expression in yeast. *J. Cell Biol.* **155**, 725-731.
- Pfaller, R., Freitag, H., Harmey, M.A., Benz, R. und Neupert, W. (1985) A water-soluble form of porin from the mitochondrial outer membrane of *Neurospora crassa*. Properties and relationship to the biosynthetic precursor form. *J. Biol. Chem.* **260**, 8188-8193.
- Pfaller, R., Kleene, R. und Neupert, W. (1990) Biogenesis of mitochondrial porin: the import pathway. *Experientia* **46**, 153-161.
- Pfaller, R., Pfanner, N. und Neupert, W. (1989) Mitochondrial protein import. Bypass of proteinaceous surface receptors can occur with low specificity and efficiency. *J. Biol. Chem.* **264**, 34-39.
- Pfanner, N. und Chacinska, A. (2002) The mitochondrial import machinery: preprotein-conducting channels with binding sites for presequences. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 15-24.
- Pfanner, N., Douglas, M.G., Endo, T., Hoogenraad, N.J., Jensen, R.E., Meijer, M., Neupert, W., Schatz, G., Schmitz, U.K. und Shore, G.C. (1996) Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 51-52.
- Pfanner, N. und Wiedemann, N. (2002) Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 400-411.
- Popp, B., Court, D.A., Benz, R., Neupert, W. und Lill, R. (1996) The role of the N and C termini of recombinant *Neurospora* mitochondrial porin in channel formation and voltage-dependent gating. *J. Biol. Chem.* **271**, 13593-13599.
- Ramage, L., Junne, T., Hahne, K., Lithgow, T. und Schatz, G. (1993) Functional cooperation of mitochondrial protein import receptors in yeast. *EMBO J.* **12**, 4115-4123.
- Rapaport, D. (2002) Biogenesis of the mitochondrial TOM complex. *Trends Biochem. Sci.* **27**, 191-197.

- Rapaport, D. (2003) Finding the right organelle. Targeting signals in mitochondrial outer-membrane proteins. *EMBO Rep.* **4**, 948-952.
- Rapaport, D., Kunkele, K.P., Dembowski, M., Ahting, U., Nargang, F.E., Neupert, W. und Lill, R. (1998) Dynamics of the TOM complex of mitochondria during binding and translocation of preproteins. *Mol. Cell. Biol.* **18**, 5256-5262.
- Rapaport, D. und Neupert, W. (1999) Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J. Cell Biol.* **146**, 321-331.
- Rapaport, D., Taylor, R.D., Kaser, M., Langer, T., Neupert, W. und Nargang, F.E. (2001) Structural requirements of Tom40 for assembly into preexisting TOM complexes of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **12**, 1189-1198.
- Rassow, J., Hartl, F.U., Guiard, B., Pfanner, N. und Neupert, W. (1990) Polypeptides traverse the mitochondrial envelope in an extended state. *FEBS Lett.* **275**, 190-194.
- Raussens, V., Ruyschaert, J.M. und Goormaghtigh, E. (2003) Protein concentration is not an absolute prerequisite for the determination of secondary structure from circular dichroism spectra: a new scaling method. *Anal. Biochem.* **319**, 114-121.
- Rehling, P., Model, K., Brandner, K., Kovermann, P., Sickmann, A., Meyer, H.E., Kuhlbrandt, W., Wagner, R., Truscott, K.N. und Pfanner, N. (2003a) Protein insertion into the mitochondrial inner membrane by a twin-pore translocase. *Science* **299**, 1747-1751.
- Rehling, P., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2003b) Insertion of hydrophobic membrane proteins into the inner mitochondrial membrane - a guided tour. *J. Mol. Biol.* **326**, 639-657.
- Reichert, A. und Neupert, W. (2002) Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria- role in protein transport. *Biochim. Biophys. Acta* **1592**, 41-49.
- Rizzitello, A.E., Harper, J.R. und Silhavy, T.J. (2001) Genetic evidence for parallel pathways of chaperone activity in the periplasm of Escherichia coli. *J. Bacteriol.* **183**, 6794-6800.
- Robb, C.W., Orihuela, C.J., Ekkelenkamp, M.B. und Niesel, D.W. (2001) Identification and characterization of an in vivo regulated D15/Oma87 homologue in Shigella flexneri using differential display polymerase chain reaction. *Gene* **262**, 169-177.
- Rohl, T., Motzkus, M. und Soll, J. (1999) The outer envelope protein OEP24 from pea chloroplasts can functionally replace the mitochondrial VDAC in yeast. *FEBS Lett.* **460**, 491-494.
- Roise, D. und Schatz, G. (1988) Mitochondrial presequences. *J. Biol. Chem.* **263**, 4509-4511.
- Ruffolo, C.G. und Adler, B. (1996) Cloning, sequencing, expression, and protective capacity of the oma87 gene encoding the Pasteurella multocida 87-kilodalton outer membrane antigen. *Infect. Immun.* **64**, 3161-3167.
- Rutter, G.A. und Rizzuto, R. (2000) Regulation of mitochondrial metabolism by ER Ca<sup>2+</sup> release: an intimate connection. *Trends Biochem. Sci.* **25**, 215-221.
- Ryan, M.T., Muller, H. und Pfanner, N. (1999) Functional staging of ADP/ATP carrier translocation across the outer mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* **274**, 20619-20627.
- Ryan, M.T., Wagner, R. und Pfanner, N. (2000) The transport machinery for the import of preproteins across the outer mitochondrial membrane. *Int J Biochem. Cell Biol.* **32**, 13-21.
- Sambrook, J. und Russel, D.W. (2001) *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. CSHL Press, Cold Spring Harbor.
- Sanchez-Pulido, L., Devos, D., Genevrois, S., Vicente, M. und Valencia, A. (2003) POTRA: a conserved domain in the FtsQ family and a class of beta-barrel outer membrane proteins. *Trends Biochem. Sci.* **28**, 523-526.
- Sargent, F., Berks, B.C. und Palmer, T. (2002) Assembly of membrane-bound respiratory complexes by the Tat protein-transport system. *Arch. Microbiol.* **178**, 77-84.
- Schagger, H., Cramer, W.A. und von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.* **217**, 220-230.
- Schatz, G. (1997) Just follow the acid chain. *Nature* **388**, 121-122.
- Schatz, G. und Dobberstein, B. (1996) Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**, 1519-1526.
- Scheffler, I.E. (2001) Mitochondria make a come back. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **49**, 3-26.
- Schleiff, E., Silvius, J.R. und Shore, G.C. (1999) Direct membrane insertion of voltage-dependent anion-selective channel protein catalyzed by mitochondrial Tom20. *J. Cell Biol.* **145**, 973-978.
- Schleiff, E., Soll, J., Kuchler, M., Kuhlbrandt, W. und Harrer, R. (2003) Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *J. Cell Biol.* **160**, 541-551.
- Schlossmann, J., Lill, R., Neupert, W. und Court, D.A. (1996) Tom71, a novel homologue of the mitochondrial preprotein receptor Tom70. *J. Biol. Chem.* **271**, 17890-17895.
- Schulz, G.E. (2003) Transmembrane beta-barrel proteins. *Adv. Protein Chem.* **63**, 47-70.

- Shannon, J.L. und Fernandez, R.C. (1999) The C-terminal domain of the Bordetella pertussis autotransporter BrkA forms a pore in lipid bilayer membranes. *J. Bacteriol.* **181**, 5838-5842.
- Shaw, J.M. und Nunnari, J. (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* **12**, 178-184.
- Shore, G.C., McBride, H.M., Millar, D.G., Steenaart, N.A. und Nguyen, M. (1995) Import and insertion of proteins into the mitochondrial outer membrane. *Eur. J. Biochem.* **227**, 9-18.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Sikorski, R.S. und 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. und Brunner, M. (1996) Import of carrier proteins into the mitochondrial inner membrane mediated by Tim22. *Nature* **384**, 582-585.
- Sirrenberg, C., Endres, M., Folsch, H., Stuart, R.A., Neupert, W. und Brunner, M. (1998) Carrier protein import into mitochondria mediated by the intermembrane proteins Tim10/Mrs11 and Tim12/Mrs5. *Nature* **391**, 912-915.
- Smith, M., Hicks, S., Baker, K. und McCauley, R. (1994) Rupture of the mitochondrial outer membrane impairs porin assembly. *J. Biol. Chem.* **269**, 28460-28464.
- Sogo, L.F. und Yaffe, M.P. (1994) Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* **126**, 1361-1373.
- Soll, J. und Schleiff, E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 198-208.
- Stebbins, C.E. und Galan, J.E. (2001) Maintenance of an unfolded polypeptide by a cognate chaperone in bacterial type III secretion. *Nature* **414**, 77-81.
- Struyve, M., Moons, M. und Tommassen, J. (1991) Carboxy-terminal phenylalanine is essential for the correct assembly of a bacterial outer membrane protein. *J. Mol. Biol.* **218**, 141-148.
- Takahashi, K., Ono, H., Yoshida, T. und Tuboi, S. (1993) Integration of porin into the outer mitochondrial membrane through the common import machinery located in contact sites. *Biochem. Mol. Biol. Int.* **29**, 429-434.
- Tamm, L.K., Arora, A. und Kleinschmidt, J.H. (2001) Structure and assembly of beta-barrel membrane proteins. *J. Biol. Chem.* **276**, 32399-32402.
- Taylor, K.A. und Glaeser, R.M. (1974) Electron diffraction of frozen, hydrated protein crystals. *Science* **186**, 1036-1037.
- Taylor, R.D., McHale, B.J. und Nargang, F.E. (2003a) Characterization of *Neurospora crassa* Tom40-deficient Mutants and Effect of Specific Mutations on Tom40 Assembly. *J. Biol. Chem.* **278**, 765-775.
- Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W. und Ghosh, S.S. (2003b) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat. Biotechnol.* **21**, 281-286.
- Thomas, K.L., Leduc, I., Olsen, B., Thomas, C.E., Cameron, D.W. und Elkins, C. (2001) Cloning, overexpression, purification, and immunobiology of an 85-kilodalton outer membrane protein from *Haemophilus ducreyi*. *Infect. Immun.* **69**, 4438-4446.
- Thomas, W.R., Callow, M.G., Dilworth, R.J. und Audesho, A.A. (1990) Expression in *Escherichia coli* of a high-molecular-weight protective surface antigen found in nontypeable and type b *Haemophilus influenzae*. *Infect. Immun.* **58**, 1909-1913.
- Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79**, 267-271.
- Tranel, P.J. und Keegstra, K. (1996) A novel, bipartite transit peptide targets OEP75 to the outer membrane of the chloroplastic envelope. *Plant Cell* **8**, 2093-2104.
- Truscott, K.N., Kovermann, P., Geissler, A., Merlin, A., Meijer, M., Driessen, A.J., Rassow, J., Pfanner, N. und Wagner, R. (2001) A presequence- and voltage-sensitive channel of the mitochondrial preprotein translocase formed by Tim23. *Nat. Struct. Biol.* **8**, 1074-1082.
- Vacherau, A. (1989) Luminescent immunodetection of Western-blotted proteins from Coomassie-stained polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.* **179**, 206-208.
- van Heel, M., Gowen, B., Matadeen, R., Orlova, E.V., Finn, R., Pape, T., Cohen, D., Stark, H., Schmidt, R., Schatz, M. und Patwardhan, A. (2000) Single-particle electron cryo-microscopy: towards atomic resolution. *Q. Rev. Biophys.* **33**, 307-369.
- 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. und Pfanner, N. (1999) Tom22 is a multifunctional organizer of the mitochondrial preprotein translocase. *Nature* **401**, 485-489.
- von Heijne, G. (1989) Control of topology and mode of assembly of a polytopic membrane protein by positively charged residues. *Nature* **341**, 456-458.

- Voos, W. (2003) Tom40: more than just a channel. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 981-982.
- Voulhoux, R., Bos, M.P., Geurtsen, J., Mols, M. und Tommassen, J. (2003) Role of a highly conserved bacterial protein in outer membrane protein assembly. *Science* **299**, 262-265.
- Wattenberg, B. und Lithgow, T. (2001) Targeting of C-terminal (tail)-anchored proteins: understanding how cytoplasmic activities are anchored to intracellular membranes. *Traffic* **2**, 66-71.
- Westermann, B. und Neupert, W. (2000) Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **16**, 1421-1427.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Chacinska, A., Schonfisch, B., Rospert, S., Ryan, M.T., Pfanner, N. und Meisinger, C. (2003) Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane. *Nature* **424**, 565-571.
- Wiedemann, N., Pfanner, N. und Ryan, M.T. (2001) The three modules of ADP/ATP carrier cooperate in receptor recruitment and translocation into mitochondria. *EMBO J.* **20**, 951-960.
- Wiedemann, N., Truscott, K.N., Pfannschmidt, S., Guiard, B., Meisinger, C. und 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.
- Wimley, W.C. (2003) The versatile beta-barrel membrane protein. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **13**, 404-411.
- Xu, X. und Colombini, M. (1996) Self-catalyzed insertion of proteins into phospholipid membranes. *J. Biol. Chem.* **271**, 23675-23682.
- Yen, M.R., Peabody, C.R., Partovi, S.M., Zhai, Y., Tseng, Y.H. und Saier, M.H. (2002) Protein-translocating outer membrane porins of Gram-negative bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **1562**, 6-31.
- Young, J.C., Hoogenraad, N.J. und Hartl, F.U. (2003) Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**, 41-50.
- Youngman, M.J., Hobbs, A.E., Burgess, S.M., Srinivasan, M. und Jensen, R.E. (2004) Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J. Cell Biol.* **164**, 677-688.
- Zizi, M., Thomas, L., Blachly-Dyson, E., Forte, M. und Colombini, M. (1995) Oriented channel insertion reveals the motion of a transmembrane beta strand during voltage gating of VDAC. *J. Membr. Biol.* **144**, 121-129.



## Veröffentlichungen:

- Waizenegger, T., Habib, S.J., Lech, M., Mokranjac, D., Paschen, S.A., Hell, K., Neupert, W. und Rapaport, D. (2004) Tob38, an essential novel component in the biogenesis of  $\beta$ -barrel proteins of mitochondria. *EMBO Rep.*, im Druck.
- Paschen, S.A., Waizenegger, T., Stan, T., Preuss, M., Cyrklaff, M., Hell, K., Rapaport, D. und Neupert, W. (2003) Evolutionary conservation of biogenesis of  $\beta$ -barrel membrane proteins. *Nature* **426**, 862-866.
- Mokranjac, D., Paschen, S.A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S.C., Nargang, F.E., Neupert, W. und Hell, K. (2003) Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *EMBO J.* **22**, 816-825.
- Okamoto, K., Brinker, A., Paschen, S.A., Moarefi, I., Hayer-Hartl, M., Neupert, W. und Brunner, M. (2002) The protein import motor of mitochondria: a targeted molecular ratchet driving unfolding and translocation. *EMBO J.* **21**, 3659-3671.
- Rothbauer, U., Hofmann, S., Muhlenbein, N., Paschen, S.A., Gerbitz, K.D., Neupert, W., Brunner, M. und Bauer, M.F. (2001) Role of the deafness dystonia peptide 1 (DDP1) in import of human Tim23 into the inner membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **276**, 37327-37334.
- Paschen, S.A. und Neupert, W. (2001) Protein import into mitochondria. *IUBMB Life* **52**, 101-112.
- Paschen, S.A., Rothbauer, U., Kaldi, K., Bauer, M.F., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) The role of the TIM8-13 complex in the import of Tim23 into mitochondria. *EMBO J.* **19**, 6392-6400.
- Donzeau, M., Kaldi, K., Adam, A., Paschen, S., Wanner, G., Guiard, B., Bauer, M.F., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Tim23 links the inner and outer mitochondrial membranes. *Cell* **101**, 401-412.
- Bauer, M.F., Paschen, S., Neupert, W. und Brunner, M. (2000) Mechanisms of mitochondrial protein import. *Protoplasma* **213**, 1-10.

## Danksagung

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Dr. Walter Neupert. Sein stetiges Interesse und seine wertvollen Erfahrungen und Anregungen sowie auch die kritische Beurteilung haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Sein "Herr Paschen, was gibt's Neues?" wird mir immer in Erinnerung bleiben. Auch seine Unterstützung in Dingen des wissenschaftlichen Alltags neben dem Pipettieren hat meine wissenschaftliche Entwicklung wesentlich gefördert. Nicht unerwähnt lassen möchte ich auch seine unermüdlichen Bemühungen aus Dr. Riemer einen Menschen mit anständigem Lebenswandel zu machen.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Grosschedl bedanke ich mich für seine Bereitschaft, meine Dissertation an der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten sowie bei Herrn Prof. Dr. P. Cramer für die freundliche Übernahme des Prüfungsvorsitzes.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Brunner, in dessen Arbeitsgruppe diese Arbeit begonnen wurde und als dessen "Überbleibsel" ich diese beende, für sein fachliches und persönliches Engagement. Besonders beeindruckt haben mich sein Ideenreichtum und seine Begeisterung an der Wissenschaft, die er bestens vermitteln konnte und so wesentlich zu meiner Motivation beigetragen hat. Von seiner Diskussionsbereitschaft, die sich nicht nur auf wissenschaftliche Belange beschränkte, habe ich viel gelernt.

Bei Ulrike Gärtner und Melanie Honcia möchte ich mich ganz herzlich für ihre ausgezeichnete Mitarbeit bedanken. Sie haben einen nicht unerheblichen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet. Dr. Kai Hell möchte ich meinen Dank für die Übernahme der Rolle des "Ersatz-Brunners" aussprechen. Dr. Marek Cyrklaff danke ich für seine überaus freundliche und fruchtbare Kooperation bei den EM-Aufnahmen.

Dank gebührt auch dem Boehringer Ingelheim Fonds für die Unterstützung sowie den Mitarbeitern für ihre freundliche Betreuung.

Den alten und neuen Kollegen des Labors möchte ich für alles danken, was das tägliche Laborleben so ausmacht. Ebenso sei auch allen nichtwissenschaftlichen Kollegen für ihre freundliche Unterstützung gedankt.

Gustav Mahler möchte ich für sein Werk danken, das mir in allen Lagen stets ein verständnisvoller Begleiter war und ist.

Dank gebührt natürlich auch meinen Eltern, die mir durch ihre umfassende Unterstützung diese Arbeit überhaupt erst ermöglicht haben.

Der letzte Dank gebührt Dir, Sandi. Deine Unterstützung und vor allem Dein Verständnis für meine Nacht- und Wochenendschichten, auch wenn ich mal wieder später kam als ich es eigentlich vorgehabt hatte, haben mir die den nötigen Rückhalt für den entscheidenden Teil dieser Arbeit gegeben. Danke.

# CURRICULUM VITAE

## Stefan Alexander Paschen

- 2000-2004 Promotion im Labor von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert unter Anleitung von Prof. Dr. Michael Brunner am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München
- 2001-2003 Stipendiat des Boehringer Ingelheim Fonds
- 1999-2000 Diplomarbeit im Labor von Prof. Dr. Dr. Walter Neupert unter Anleitung von Prof. Dr. Michael Brunner am Adolf-Butenandt-Institut für Physiologische Chemie der Ludwig-Maximilians-Universität München: "Funktion von Tim8 und Tim13 beim Import von Proteinen in die mitochondriale Innenmembran".
- 1995-2000 Studium der Biochemie an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen
- 1994-1995 Studium der Chemie an der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
- 1984-1994 Hölderlin Gymnasium in Heidelberg, Abschluss Abitur
- 1980-1984 Grundschule in Edingen
- 08.04.1974 Geboren in Mannheim